

Влияние соединения АТАСЛ на противовоспалительный потенциал эндотелия сосудов головного мозга крыс в условиях экспериментальной ишемии

А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, Д.С. Золотых, М.П. Ефремова

The joint effect of atacl on anti-inflammatory capacities of the endothelium of brain vessels of rats under conditions of experimental cerebral ischemia

A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, D.S. Zolotykh, M.P. Efremova

Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ФГБОУ.УВ.О. Волгоградский государственный медицинский университет.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, эндотелиальная дисфункция, воспаление, эндотелиопротекция

Резюме

Влияние соединения АТАСЛ на противовоспалительный потенциал эндотелия сосудов головного мозга крыс в условиях экспериментальной ишемии

А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, Д.С. Золотых, М.П. Ефремова

Целью настоящего исследования являлось провести оценку влияния соединения АТАСЛ на противовоспалительную функцию эндотелия сосудов на фоне ишемии головного мозга у крыс. В результате проведения исследования установлено положительное влияние соединения АТАСЛ на противовоспалительную функцию эндотелия сосудов в условиях фокальной ишемии головного мозга у крыс. Введение данного соединения способствовало снижению (по отношению к животным, не получавшим фармакологической поддержки) содержания С-реактивного белка на 99,1% ($p < 0,05$), матриксной металлопротеиназы-1 на 37,7% ($p < 0,05$) и лейкоцитов в крови на 61,3% ($p < 0,05$). При этом фармакологический эффект от введения АТАСЛ был сопоставим с таковым у сулодексида и превосходил эффект от применения мексидола и тиоктовой кислоты.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, эндотелиальная дисфункция, воспаление, эндотелиопротекция.

Воронков Андрей Владиславович д.м.н., доцент. Заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института 357532, Пятигорск, пр. Калинина 11 e-mail: prohog77@mail.ru

Поздняков Дмитрий Игоревич, аспирант кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института (автор, ответственный за переписку). 357532, Пятигорск, пр. Калинина 11 e-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru тел: +7-918-756-08-89, *Золотых Денис Сергеевич* к.фарм. н., преподаватель кафедры аналитической химии Пятигорского медико-фармацевтического института. 357532, Пятигорск, пр. Калинина 11 e-mail: metronidazol@mail.ru

Ефремова Марина Павловна, преподаватель кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института. 357532, Пятигорск, пр. Калинина 11 e-mail: efremova.marinka26@gmail.ru

Abstract

The joint effect of ATACL on anti-inflammatory capacities of the endothelium of brain vessels of rats under conditions of experimental cerebral ischemia

A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, D.S. Zolotykh, M.P. Efremova

The purpose of this study was to assess the joint effect of ATACL anti-inflammatory on endothelial function of vessels on the background of cerebral ischemia in rats. As a result of the studies a positive joint effect of ATACL on anti-inflammatory function of vascular endothelium in conditions of focal cerebral ischemia in rats was found. The introduction of this connection contributed to the decline (relative to animals who did not receive pharmacological support) C-reactive protein by 99.1% ($p < 0.05$), matrix metalloproteinase-1 by 37.7% ($p < 0.05$) and leukocytes in blood by 61.3% ($p < 0.05$). In this case the pharmacological effect of the introduction of ATACL was comparable to that of the sulodexide and even surpassed the effect of mexidol and thioctic acid.

Keywords: cerebral ischemia, endothelial dysfunction, inflammation, endotheliopathy.

Ишемический инсульт представляет собой гетерогенный клинический синдром, объединяющий в себе целый ряд патофизиологических механизмов, формирующих «ишемический каскад» повреждения головного мозга. Немаловажным элементом этого «каскада» является воспалительный процесс [3, 8]. При этом ведущую роль в инициации и дальнейшем прогрессировании воспаления играет альтерация эндотелия сосудов – эндотелиальная дисфункция [1-3]. В условиях ишемии головного мозга на поврежденном эндотелии экспрессируется ряд молекул адгезии (P-селектин, E-селектин, L-селектин), что повышает коэффициент взаимодействия эндотелиоцитов с тромбоцитами и лейкоцитами, способствуя лейкоцитарной инфильтрации паренхимы мозга и активации тромбообразования [4, 9]. Кроме того, в условиях ишемического повреждения головного мозга активируется ряд протеолитических ферментов, среди которых наибольшую роль в прогрессировании дисфункции эндотелия, а, следовательно, и воспалительного процесса играет экспрессия матриксной металлопротеиназы-1 (ММП-1). Активация ММП-1 способствует деструкции коллагеновых волокон субэндотелиального слоя, что ведет к росту экстравазации воды, электролитов и белков, инициируя, таким образом, развитие отека головного мозга, усиление ангиогенеза с гиперпролиферацией сосудистой стенки, повышает продукцию хемокинов, способствуя, тем самым, повышению лейкоцитарной инфильтрации мозговой ткани [5, 7]. Таким образом, можно предположить, что коррекция дисфункции эндотелия сосудов в условиях ишемического повреждения головного мозга способна уменьшить проявление воспаления и способствовать, тем самым, церебропротекции. При этом, потенциальной «мишенью» для действия фармакологически активных субстанций может быть ММП-1. Ранее для соединения ATACL была установлена способность восстанавливать вазодилатирующую [2] и антитромботическую [1] функции эндотелия в условиях недостаточности мозгового кровообращения, что

может служить предпосылкой для изучения влияния данного соединения противовоспалительную функцию эндотелия сосудов на фоне ишемии головного мозга.

Материал и методы исследования

Эксперимент выполнен на 60-ти крысах – самцах линии Wistar массой 200-220 грамм, разделенных на 6 равных экспериментальных групп по 10 особей в каждой. Первая группа являлась ложнооперированной (Л/О). Вторая группа крыс – группа негативного контроля (НК) с фокальной ишемией головного мозга, не получавшая фармакологическую поддержку. Третьей и последующим группам животных также воспроизводили ишемическое повреждение головного мозга путем необратимой (коагуляция) правосторонней окклюзии средней мозговой артерии в условиях хлоралгидратной анестезии (350 мг/кг) [1], при этом третьей группе крыс вводили мексидол (Фармасофт, Россия) в дозе 30 мг/кг, четвертой – тиоктовую кислоту (Октолипен, Фармстандарт – Лексредства, Россия) в дозе 50 мг/кг, пятой и шестой – сулодексид (Вессел Дуэ Ф, Alfa Wasserman, Италия) и ATACL (4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричная кислота) в дозе 30 ЕВЛ (единицы высвобождения липопротеинлипазы) и 100 мг/кг, соответственно [1, 2]. Исследуемое соединение ATACL и препараты сравнения вводились *per os* непосредственно сразу после воспроизведения ишемии головного мозга и на протяжении 3-х суток. По истечении указанного времени производили оценку состояния противовоспалительной функции эндотелия путем определения концентрации С-реактивного белка (СРБ), содержания лейкоцитов в крови и активности ММП-1. Концентрацию СРБ оценивали методом латекс-агглютинации стандартным набором реактивов для качественного и количественного определения СРБ производства компании «АРБИС+» (Санкт-Петербург, Россия). Содержание лейкоцитов в крови определяли с использованием системы автоматического гематологического анализатора ВС-2800 vet (Mindray, КНР). Концентрацию ММП-1 оценивали методом твердо-

Изменение параметров, характеризующих противовоспалительную функцию эндотелия сосудов, у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга и применения соединения АТАСЛ

Группа	ЛО	НК	Сулодексид	Мексидол	Тиоктовая кислота	АТАСЛ
СРБ, мг/л	2,23±0,228	13,92±1,125Δ	7,46±0,527*	8,41±0,743*	11,21±1,261	6,99±0,446*
WBC, 10 ⁹ кл/л	8,26±1,325	11,16±1,178Δ	7,34±0,998*	6,88±0,959*	8,24±0,928*	6,92±0,817*
ММП-1, нг/мл	24,17±1,297	35,06±5,919Δ	28,86±2,315	32,11±0,025	24,67±2,604*	25,47±2,498*

Примечание: Δ – статистически значимо (t – критерий Стьюдента) относительно Л/О группы крыс (p<0,05); * – статистически значимо (U – критерий Манна – Уитни) относительно НК группы крыс (p<0,05).

фазного иммуноферментного анализа набором реактивов для видоспецифичного (крыса) определения матриксной металлопротеиназы-1 производства компании *Cloud Clone corp.* (США). Считывание результатов производили на микропланшетном ридере Infinite F50 (*Tecan*, Австрия).

Результаты экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows) и Microsoft Excel 2010. Полученные результаты проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения для сравнения средних использовали t-критерий Стьюдента. В противном случае дальнейшую статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Содержание СРБ (табл. 1) у ложнопериорированных животных составляло 2,23 ± 0,228 мг/л, при концентрации лейкоцитов в крови у данной группы крыс 8,26 ± 1,325 *10⁹кл/л. У Л/О группы животных концентрация ММП-1 составляла 24,17 ± 1,297 нг/мл. Полученные результаты согласуются с литературными данными [6].

На фоне фокальной ишемии головного мозга у НК группы животных отмечено повышение концентрации С-реактивного белка и ММП-1, относительно ложнопериорированных крыс в 6,2 (p<0,05) раза и на 45,1% (p<0,05), соответственно. Данные изменения сопровождались умеренным лейкоцитозом (содержание лейкоцитов у НК группы крыс превосходило аналогичный показатель Л/О животных на 35,1% (p<0,05), что согласуется с литературными данными [3].

Применение мексидола в условиях ишемического повреждения головного мозга способствовало уменьшению содержания С-реактивного (табл.1) белка относительно группы животных негативного контроля на 65,5% (p<0,05), при полном восстановлении лейкоцитарной концентрации (табл.1) (статистически значимых отличий относительно Л/О группы крыс установлено не было). Содержание ММП-1 (табл.1) на фоне введения крысам мексидола статистически значимо не изменилось по отно-

шению к НК группе животных.

На фоне введения тиоктовой кислоты содержание С-реактивного белка и ММП-1 (табл.1) статистически значимо не отличались от таковых у НК группы крыс. Концентрация лейкоцитов в крови у животных, получавших тиоктовую кислоту, было сопоставимо с группой ложнопериорированных крыс.

У животных, получавших сулодексид, концентрация С-реактивного белка (табл.1) относительно группы крыс негативного контроля снизилась на 86,3% (p<0,05). При этом у данной группы животных содержание лейкоцитов уменьшилось по отношению к НК группе крыс на 52% (p<0,05). Концентрация ММП-1 на фоне применения сулодексида снизилась относительно группы животных негативного контроля на 42,1% (p<0,05).

Применение соединения АТАСЛ на фоне ишемии головного мозга способствовало уменьшению (по сравнению с НК группой крыс) концентрации СРБ и ММП-1 на 99,1% (p<0,05) и 37,7% (p<0,05), соответственно. При этом содержание лейкоцитов у животных, получавших АТАСЛ, статистически значимо не отличалось от аналогичного значения Л/О группы крыс (табл.1).

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, соединение АТАСЛ может оказывать положительное влияние на противовоспалительную функцию эндотелия сосудов за счет уменьшения концентрации матриксной металлопротеиназы-1, снижения концентрации С-реактивного белка и лейкоцитов в крови у крыс на фоне фокальной ишемии головного мозга.

Выводы:

- Фокальная ишемия головного мозга приводит у крыс к угнетению противовоспалительного потенциала сосудистого эндотелия, сопровождаемым повышением концентрации С-реактивного белка (в 6,2 раза (p<0,05)), протеолитических ферментов, в частности, ММП-1 (на 45,1% (p<0,05)) и умеренным лейкоцитозом (содержание лейкоцитов у НК группы крыс увеличилось на 35,1% (p<0,05)).

- Из препаратов сравнения наиболее выраженное действие на состояние противовоспалительной функции эндотелия сосудов оказало введение сулодексида, на фоне применения которого снижалась концентрация СРБ (на 86,3% (p<0,05)), ММП-1 (на 42,1% (p<0,05)) и лейкоцитов в крови

(на 52% ($p < 0,05$)).

• Введение соединения АТАСЛ, практически в равной степени с сулодексидом, способствовало уменьшению содержания СРБ, лейкоцитов в крови и ММП-1, способствуя, тем самым, восстановлению противовоспалительного потенциала эндотелия сосудов на фоне ишемии головного мозга у крыс, превосходя по данному эффекту мексидол и тиоктовую кислоту.

Литература

1. Воронков А.В., Поздняков Д.П., Мамлеев А.В. Сравнительная оценка влияния АТАСЛ, мексидола и тиоктовой кислоты на антитромботическую функцию эндотелия и некоторые показатели состава периферической крови экспериментальных животных на фоне фокальной ишемии головного мозга // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 2.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24398> (дата обращения: 13.06.2017).
2. Воронков А.В., Поздняков Д.П., Мамлеев А.В. Эндотелиопротекторные свойства флоридина, 4-гидрокси-3,5-ди-*т*-р-бутил коричной кислоты и соединения VMA – 10-18 при экспериментально вызванной ишемии головного мозга // *Астраханский медицинский журнал*. – 2016. – Т.1, №3. – С. 58-64.
3. Elkind M.S.V., Luna J.M., McClure L.A. C-reactive Protein as

a Prognostic Marker after Lacunar Stroke: The Levels of Inflammatory Markers in the Treatment of Stroke (LIMITS) Study // *Stroke; a journal of cerebral circulation*. – 2014. – Vol. 45. – P. 707-716.

4. Henry B.L., Monien B.H., Bock P.E. A Novel allosteric pathway of thrombin inhibition: Exosite II mediated potent inhibition of thrombin by chemo-enzymatic, sulfated dehydropolymers of 4-hydroxycinnamic acids // *The Journal of biological chemistry*. – 2007. – Vol.282. – P.31891-31899.

5. Mazor R., Alsaigh T., Shaked H. Matrix Metalloproteinase-1-mediated Up-regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-2 in Endothelial Cells // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol.288. – P.598-607.

6. Singh U., Dasu M.R., Yancey P.G. Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats // *Journal of lipid research*. – 2008. – Vol.49. – P.1015-1023.

7. Struening I.T., Durham S.N., Barnett C.D. Enhanced Endothelial Cell Senescence by Lithium-induced Matrix Metalloproteinase-1 Expression // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol.284. – P.595-606.

8. Warner D.S., Sheng H. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain // *J. Exp. Biol.* – 2004. – Vol. 207. – P.21–31.

9. Yunoki T., Deguchi K., Omote Y. Anti-oxidative nutrient-rich diet protects against acute ischemic brain damage in rats // *Brain. Res.* – 2014. – Vol. 31. – P.1587- 1601.