

М.В. Оробей, В.П. Куликов

Локальный мозговой кровоток и маркеры повреждения при ишемии/реперфузии головного мозга на фоне модулирования активности кининовой системы

ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, 656038, Алтайский край, Барнаул, пр. Ленина, 40

Методом водородного клиренса исследовали состояние мозговой гемодинамики у крыс в условиях экспериментальной ишемии и последующей реперфузии головного мозга на фоне фармакологического модулирования кининообразования, угнетения кининовой системы, а также при торможении кининоразрушения. В период гипоперфузии реперфузионного периода оценивали выраженность повреждения головного мозга, исследуя маркеры его повреждения. Было установлено, что активация кининообразования трипсином оказывает неблагоприятное воздействие при ишемии/реперфузии головного мозга, вызывая раннее развитие гипоперфузии в реперфузионном периоде и отягощая повреждения головного мозга. Угнетение кининоразрушения ингибитором АПФ приводит к выраженному снижению локального мозгового кровотока в период гипоперфузии реперфузионного периода. Торможение кининообразования контрикалом улучшает течение реперфузионного периода, предотвращая возникновение гипоперфузии и уменьшая выраженность повреждения головного мозга в сравнении с контролем. В целом активация кининовой системы при ишемии/реперфузии головного мозга играет в большей степени патогенетическую роль, ухудшая течение реперфузионного периода и утяжеляя степень повреждения головного мозга.

Ключевые слова: калликреин-кининовая система, ишемия, реперфузия, мозговая гемодинамика, маркеры повреждения

M.V. Orobei, V.P. Kulikov

Cerebral blood flow and damage markers during ischemia/reperfusion of brain against a background of modulation of the kinin system's activity

Altay State Medical University

Cerebral hemodynamics' status under condition of experimental ischemia and following reperfusion of brain against a background of pharmacological modulation of kinins' formation, the kinin system's inhibition and depression of kinins' disruption was investigated by the method of hydrogenous clearance. The brain damage intensity during hypoperfusion of reperfusion period was measured by analyzing its damage markers. It was determined that the activation of kinins' formation by trypsin has a detrimental effect during ischemia/reperfusion of brain, producing an early development of hypoperfusion in reperfusion period, aggravating a brain damage. The depression of kinins' disruption by ACE-inhibitors leads to superfluous decreasing of local cerebral blood flow during hypoperfusion of reperfusion period. The inhibition of kinins' formation by contrykal improves the flow of reperfusion period, preventing the appearance of hypoperfusion and decreasing the brain damage intensity in comparison with a control group. On the whole an activation of the kinin system during ischemia/reperfusion of brain plays mostly pathogenetic role making worse the flow of reperfusion period and aggravating a brain damage.

Key words: the kallikrein-kinin system, ischemia, reperfusion, cerebral hemodynamics, damage markers

Существенную роль в патогенезе нейродеструктивных процессов при ишемии и реперфузии головного мозга играет калликреин — кининовая система (ККС) [11]. Активация ККС у пациентов в остром периоде после перенесенного инсульта [7], а также при реперфузии после глубокой ишемии головного мозга у крыс [6]

способствует увеличению размеров инфаркта и отягощению течения реперфузионного периода. Эти данные указывают на патогенетическую роль активации кининовой системы при ишемии/реперфузии головного мозга. Другие исследователи подчеркивают нейропротективное значение активации кининовой системы при ишемии/реперфузии. Так, у крыс после фокальной ишемии и последующей реперфузии на фоне введения брадикинина был менее выражен отек мозга [5], а после введения каллектрина [12] уменьшалась выраженность

Для корреспонденции: Оробей Мария Владимировна, к.м.н., доцент, каф. патофизиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики АГМУ, e-mail: orobei@asmu.ru

апоптоза и воспаления, а также происходило стимулирование ангиогенеза [4].

Таким образом, окончательное представление о значимости активации кининовой системы не сформировано, постулируется как саногенетическая, так и патогенетическая роль активации кининовой системы при ишемии/реперфузии головного мозга.

Цель работы — исследование ишемии/реперфузии головного мозга в условиях модулирования активности кининовой системы.

Методика

Исследование выполнено на 40 крысах-самцах Wistar, массой 280 ± 30 г. Животные были наркотизированы внутрибрюшинным введением тиопентала натрия 50 мг/кг. В случае появления у животных признаков элиминации препарата в виде напряжения мышц и движения конечностей тиопентал натрия вводился повторно в той же дозе.

Работа была одобрена локальным этическим комитетом ГОУ ВПО Алтайского государственного медицинского университета Росздрава.

Локальный мозговой кровоток (ЛМК) измерялся методом водородного клиренса [3]. Для этого в теменной области выполнялось трепанационное отверстие, через которое в кору головного мозга на глубину 1 мм помещался платиновый игольчатый электрод с оголенной активной поверхностью 0,5 мм. Хлорсеребряный электрод применялся в качестве индифферентного. Измерения проводились на полярографе ПУ-1 (Россия). Для насыщения головного мозга водородом животное выполняло 3—4 вдоха смеси газов с высоким содержанием водорода (96%) через специально изготовленную маску. Запись кривых клиренса водорода проводилась сразу же после установки электрода. Расчёт ЛМК выполнялся стохастическим методом.

Все животные случайным образом были поделены на 4 группы (по 10 крыс в каждой). Препараты, модулирующие активность ККС вводились внутрибрюшинно за 20 мин до начала эксперимента. Крысам 1-й группы (контроль) вводили физиологический раствор. Животным 2-й группы для угнетения кининообразования применялся поливалентный ингибитор протеаз — контрикал (AWD.pharma GmbH & Co.KG, Германия) в дозе 5000 ЕД/кг [10], 3-й группе — угнетение кининообразования создавалось ингибитором ангиотензинпревращающего фермента — энапом (KRKA, Словения) в дозе 0,25 мг/кг [8]. Животным 4-й группы проводили активацию кининообразования трипсином (Самсон-Мед, Россия) в дозе 0,8 мг/кг [13]. К началу эксперимента АД у крыс всех групп значимо не различалось.

После измерения исходного ЛМК воспроизводили тяжёлую неполную ишемию головного мозга путём наложения лигатур на обе общие сонные артерии на

30 мин, после чего лигатуры аккуратно снимались. Измерение ЛМК проводили до ишемизации, на 1- и 30-й мин ишемии, на 1-, 5-, 10-й мин после восстановления кровотока, а затем через каждые 10 мин до конца реперфузионного периода. Периоды измерения мозгового кровотока были выбраны в соответствии с наиболее значимыми периодами гемодинамических изменений [9].

Уровень маркеров повреждения определяли в плазме крови. Забор венозной крови проводили из сагиттального мозгового синуса через трепанационное отверстие. У животных 1-й, 3-й и 4-й групп кровь забирали в период гипоперфузии, который определяли по кривой клиренса водорода. У крыс 2-й группы периода гипоперфузии не наблюдалось, поэтому кровь забирали в конце эксперимента на 60-й мин реперфузионного периода. Кровь в объёме 2 мл забирали в одноразовые шприцы (Стерин, Россия), содержащие 3,8% цитрат натрия в соотношении 1:9. Кровь с цитратом центрифугировали при 3000 об./мин (1200 г) 15 мин для получения плазмы. Плазму разливали в полистироловые пробирки и замораживали. Перед исследованием плазму размораживали при 37°C. Животных выводили из эксперимента декапитацией.

Активность лактата и креатинкиназы (КК) определяли фотометрически с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «Витал Диагностикс СПб», Санкт-Петербург. Малонилдальдегид (МДА) определяли фотометрически по методу Ю.А. Владимирова, А.И. Арчакова [2]. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-46, Россия.

Для каждой выборки вычислялась медиана и межквартильный интервал. Значимость различий исследуемых выборочных совокупностей оценивалась по критерию Манна—Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Для выявления связи между уровнем кровотока и выраженностью повреждения головного мозга при ишемии/реперфузии использовали коэффициент корреляции Спирмена. Результаты были обработаны с использованием пакета программ Statistica 6,0 для Windows.

Результаты и обсуждение

Параметры ЛМК при ишемии/реперфузии головного мозга у крыс контрольной группы представлены на рис. 1. Из рисунка видно, что у животных контрольной группы исходный мозговой кровоток составлял 132 мл/100 г/мин. После перевязке сонных артерий происходило его уменьшение в 1,6 раза. В реперфузионном периоде наблюдалась закономерная смена фаз гипер- и гипоперфузии. После снятия лигатур происходило нарастание ЛМК. На 20-й мин была зафиксирована максимальная постишемическая гиперперфузия, что выражалось в увеличении кровотока на 46%

по сравнению с исходным. Затем следовало прогрессивное уменьшение ЛМК, и на 60-й минуте реперфузионного периода развивалась гипоперфузия со снижением кровотока в 1,1 раза по сравнению с исходным. Полученные результаты отражают закономерное течение реперфузионного периода [1].

У животных, которым моделировалось угнетение ККС контрикалом (рис. 2), исходный ЛМК составлял 140 мл/100 г/мин. В ишемическом периоде мозговая перфузия снижалась в 1,4 раза по сравнению с исход-

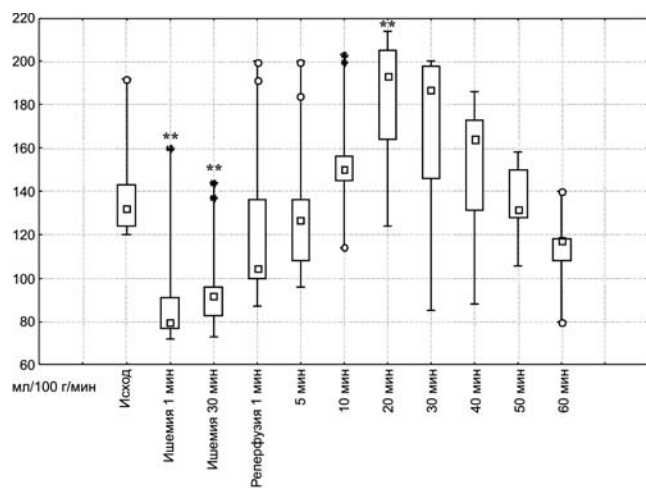


Рис. 1. Динамика локального мозгового кровотока у крыс в процессе ишемии/реперфузии головного мозга (контрольная группа): □ – Median; ◻ – 25%–75%; | – Min-Max; ** – $p < 0,01$ в сравнении с исходным ЛМК.

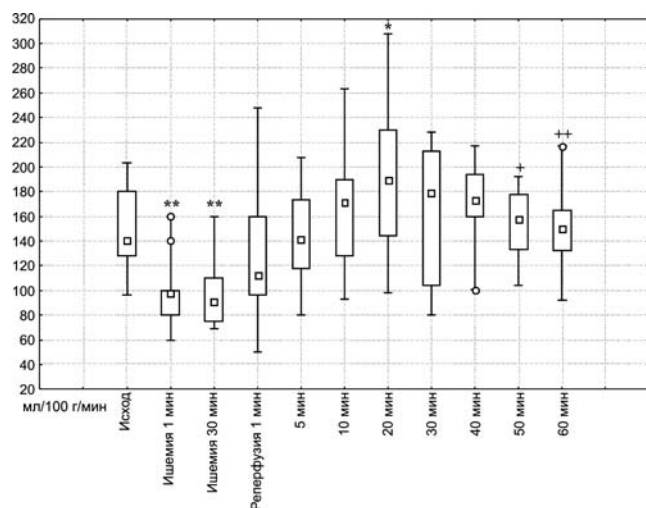


Рис. 2. Динамика локального мозгового кровотока у крыс в процессе ишемии/реперфузии головного мозга на фоне угнетения кининообразования контрикалом: □ – Median; ◻ – 25%–75%; | – Min-Max; * – $p < 0,05$ в сравнении с исходными данными; ** – $p < 0,01$ в сравнении с исходными данными; † – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой; †† – $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой.

ной. Максимальная реактивная гиперемия наблюдалась на 20-й мин реперфузионного периода с увеличением мозгового кровотока на 27,8% по сравнению с исходным. В дальнейшем происходило снижение ЛМК, однако периода гипоперфузии не наблюдалось до конца эксперимента. На основании этого можно предположить, что угнетение кининогенеза в реперфузионном периоде имеет адаптивное значение, устраняя развитие отсроченной гипоперфузии, тем самым поддерживая достаточное кровоснабжение головного мозга.

В группе животных с угнетением кининоразрушения энапом (рис. 3) исходный ЛМК был равен 118,5 мл/100 г/мин., а во время ишемии наблюдалось его снижение в 1,3 раза от исходного. Время развития реактивной гиперемии соответствовало контролю. Гипоперфузия развивалась к 60-й мин реперфузионного периода, при этом уровень ЛМК был ниже на 18% по сравнению с контролем. Из этого следует, что применение ингибиторов АПФ и накопление брадикинина при ишемии/реперфузии головного мозга приводит к выраженному снижению ЛМК в реперфузионном периоде.

В группе с активацией ККС трипсином исходный ЛМК (рис. 4) составлял 107 мл/100 г/мин. После возобновления кровотока происходило его нарастание, но периода постишемической гиперперфузии не наблюдалось. Однако на 50-й мин реперфузионного периода возникла гипоперфузия, ЛМК при этом был в 1,5 раза ниже по сравнению с исходным. Следовательно, активация ККС, так же как и угнетение разрушения брадикинина, приводила к снижению мозгового кровотока в реперфузионный период.

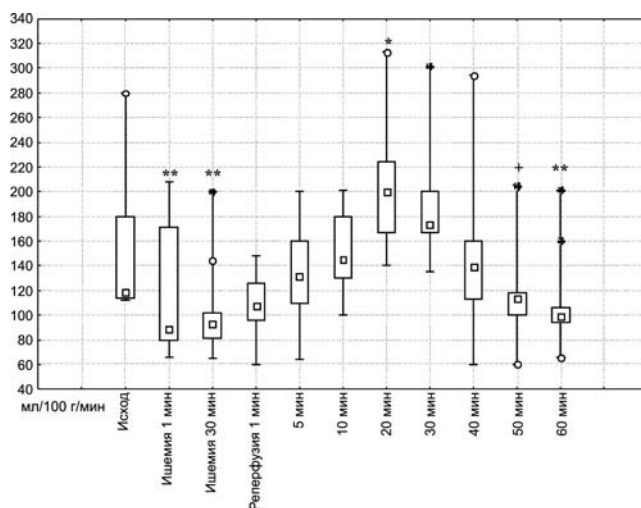


Рис. 3. Динамика локального мозгового кровотока у крыс в процессе ишемии/реперфузии головного мозга на фоне угнетения кининоразрушения энапом: □ – Median; ◻ – 25%–75%; | – Min-Max; * – $p < 0,05$ в сравнении с исходными данными; ** – $p < 0,01$ в сравнении с исходными данными; † – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой; †† – $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой.

Для оценки степени повреждения головного мозга исследовали маркеры повреждения, отражающие процессы перекисного окисления липидов, выраженность лактат-ацидоза и цитоллиза.

Активирование кининогенеза трипсином (рис. 5) способствовало интенсификации процессов свободно-радикального окисления (СРО) у крыс, что отражалось в возрастании концентрации МДА в плазме в 1,2 раза по сравнению с животными контрольной группы. Угнетение кининообразования уменьшало выраженность СРО, что отражалось в снижении уровня МДА в 2,7 раза в сравнении с контролем.

Интенсивность СРО у животных, которым модулировалось угнетение кининообразования энлапом, не отличалась от животных контрольной группы.

На рис. 6 показано содержание лактата в плазме крови животных подвергшихся ишемии/реперфузии головного мозга на фоне модулирования активности ККС. Из рисунка видно, что у животных при активации кининообразования усиливался анаэробный гликолиз, о чем можно было судить по увеличению уровня лактата в плазме на 30% по сравнению с животными контрольной группы. При этом угнетение кининообразования проявления лактат-ацидоза, что

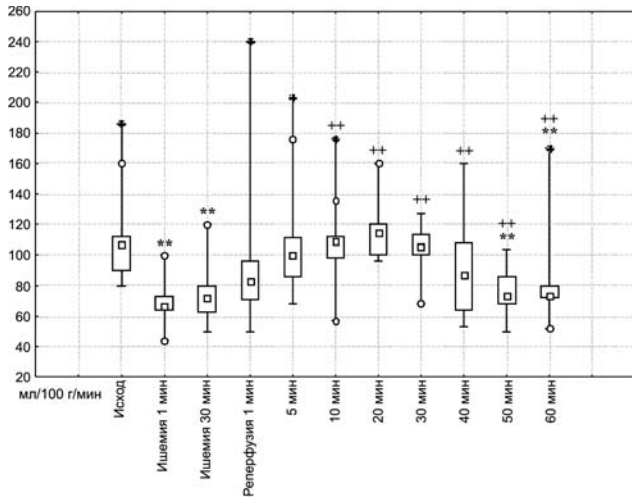


Рис. 4. Динамика локального мозгового кровотока у крыс в процессе ишемии/реперфузии головного мозга на фоне активации кининообразования трипсином:

□ — Median; □ — 25%–75%; I — Min-Max; ** — $p < 0,01$ в сравнении с исходными данными; ++ — $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой.

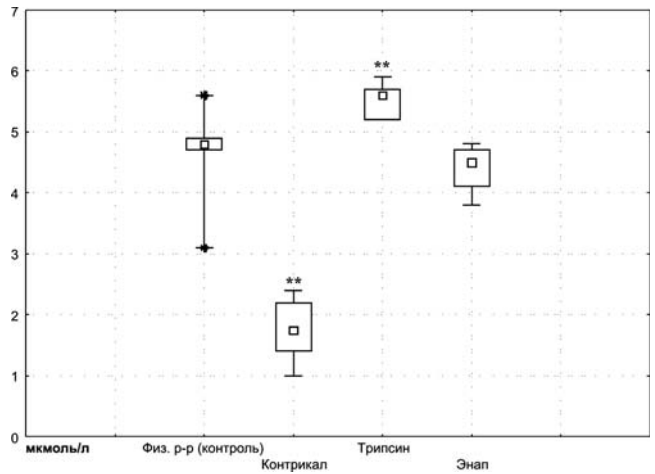


Рис. 5. Содержание малонового диальдегида в плазме крови при ишемии/реперфузии головного мозга у крыс на фоне модулирования активности кининовой системы:

□ — Median; □ — 25%–75%; I — Min-Max; ** — $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой.

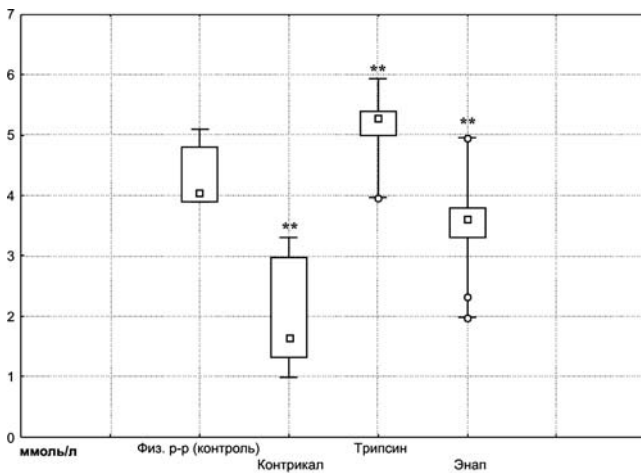


Рис. 6. Содержание лактата в плазме крови при ишемии/реперфузии головного мозга у крыс на фоне модулирования активности кининовой системы:

□ — Median; □ — 25%–75%; I — Min-Max; ** — $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой.

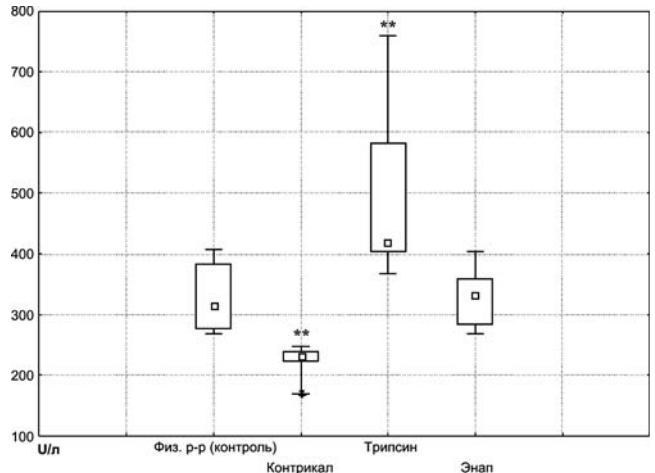


Рис. 7. Содержание креатинкиназы в плазме крови при ишемии/реперфузии головного мозга у крыс на фоне модулирования активности кининовой системы:

□ — Median; □ — 25%–75%; I — Min-Max; ** — $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой.

отражалось в снижении лактата в плазме на 59%. У животных, которым вводился энап, угнетающий кининоразрушение, уровень молочной кислоты был на 15% ниже, чем у животных контрольной группы.

Активация ККС и ее угнетение значительно изменяло концентрацию КК в плазме (рис. 7). Так, у животных, получавших трипсин, уровень этого маркера повреждения был на 33% выше, чем в контроле, что, вероятно, соответствовало выраженному повреждению биомембран клеток ЦНС. Применение контрикала, наоборот, уменьшало степень повреждения нейронов, на что указывало уменьшение активности КК на 39%.

Таким образом, угнетение кининообразования контрикалом уменьшало выраженность повреждения головного мозга при ишемии и реперфузии, в то время как активация кининовой системы трипсином, интенсифицировала свободно — радикальное окисление, метаболический ацидоз и усиливало повреждение нейронов.

Уровень ЛМК в период гипоперфузии был связан сильной отрицательной корреляционной связью с концентрацией маркеров повреждения в плазме. Так, у животных, получавших трипсин, была выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнем ЛМК в период гипоперфузии и содержанием МДА ($r = -0,6$; $p < 0,05$) и КК ($r = -0,7$; $p < 0,01$) в плазме, т.е., чем более выраженным было повреждение, тем интенсивнее снижался мозговой кровоток к концу реперфузионного периода. В группе крыс, получавших контрикал, уровень мозговой перфузии в конце реперфузионного периода коррелировал с активностью перекисного окисления липидов ($r = -0,7$; $p < 0,01$) и выраженностью лактат-ацидоза ($r = -0,7$; $p < 0,01$). При этом чем ниже была концентрация маркеров повреждения, тем лучше сохранялся мозговой кровоток в реперфузионном периоде.

Таким образом, модулирование активности кининовой системы изменяет течение реперфузионного периода и степень повреждения головного мозга при ишемии/реперфузии. Активация ККС при ишемии/реперфузии головного мозга играет в большей степени патогенетическую роль, ухудшая течение реперфузионного периода и увеличивая степень повреждения головного мозга. Торможение кининообразования предотвращает возникновение отсроченной гипоперфузии и уменьшает выраженность процессов перекисного окисления липидов, метаболического ацидоза и цитолиза клеток ЦНС.

Список литературы

1. **Александрин В.В., Кожура В.Л., Новодержкина И.С.** и др. Ранние постишемические нарушения мозгового кровотока и их коррекция перфтораном // 2006. — 3. — С. 12—17.
2. **Владимиров Ю.А., Арчаков Р.М.** Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
3. **Демченко И.Т.** Измерение органного кровотока с помощью водородного клиренса // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. — 1981. — 1. — С. 178—183.
4. **Chao J., Shen B., Gao L.** et al. Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing // Biol. Chem. — 2010. — 4. — P. 345—355.
5. **Chen Z.B., Huang D.Q., Niu F.N.** et al. Human urinary kallidinogenase suppresses cerebral inflammation in experimental stroke and downregulates nuclear factor-kappaB // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2010. — №7. — P. 1356—1365.
6. **Chiang W.C., Chien C.T., Lin W.W.** et al. Early activation of bradykinin B2 receptor aggravates reactive oxygen species generation and renal damage in ischemia/reperfusion injury // Free Radic. Biol. Med. — 2006. — 8. — P. 1304—1314.
7. **Groger M., Lebesgue D., Pruneau D.** et al. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice // J. Cereb. Blood. Flow Metab. — 2005. — 8. — P. 978—989.
8. **Lu J., Zhang Y., Shi J.** Effects of intracerebroventricular infusion of angiotensin-(1-7) on bradykinin formation and the kinin receptor expression after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats // Brain Res. — 2008. — 11. — P. 127—135.
9. **Molina C.A., Alvarez-Sabun J.** Recanalization and reperfusion therapies for acute ischemic stroke // Cerebrovasc. Dis. — 2009. — P. 162—167.
10. **Saxena P., Thompson P., d'Udekem Y.** et al. Kallikrein-kinin system: a surgical perspective in post-aprotinin era // J. Surg. Res. — 2011. — 1. — P. 70—77.
11. **Sobey C.** Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy // British J. Pharmacology. — 2003. — 139. — P. 1369—1371.
12. **Tang Y., Shao Y., Su J.** et al. The protein therapy of kallikrein in cerebral ischemic reperfusion injury // Curr. Med. Chem. — 2009. — 16. — P. 4502—4510.
13. **Viskunov V.G., Protzenko S.I., Fedorenko V.N.** et al. Pathogenetic aspects of proteolysis and hemorrhagic pancreatonecrosis and methods of their correction // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. — 2011. — №2. — P. 41—43.

Поступила 11.04.13

Сведения об авторах:

Куликов Владимир Павлович — д.м.н., проф., зав. каф. патофизиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики АГМУ, e-mail: kulikov@asmu.ru