

ГОРШКОВА О. П., ЛЕНЦМАН М. В.,
АРТЕМЬЕВА А. И., ДВОРЕЦКИЙ Д. П.

Динамика изменения реактивности пиальных сосудов после кратковременной ишемии головного мозга

*Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, наб. Макарова д. 6.
Санкт-Петербург, Россия
e-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

Реферат

Введение и цель работы. Одним из основных факторов, определяющих последствия ишемии, является состояние реактивности мозговых сосудов, которая предопределяет возможность к дополнительному увеличению мозговой перфузии и обозначается как перфузионный резерв. Для его оценки используется гиперкапническая проба. Целью работы было изучение реакций пиальных сосудов крыс на гиперкапнию до и через 7, 14 и 21 день после перенесенной ишемии.

Материалы и методы. Крысы линии Wistar подвергались ишемии путем окклюзии обеих сонных артерий на 12 мин с одновременной управляемой гипотензией на уровне 45 ± 3 мм рт. ст. и последующей реинфузией крови. Реакции пиальных сосудов в ответ на гиперкапнию, вызванную в/в введением ацетазоламида (1,3 мг/100 г массы тела), рассматривались через 7, 14 и 21 день после перенесенной ишемии. В трех отдельных группах крыс (7, 14 и 21 день после ишемии) методом прижизненной микрофотосъемки проводили сравнение реакций пиальных артериальных и венозных сосудов различных генераций на гиперкапнию с реакциями сосудов у интактных животных.

Результаты и их обсуждение. Сравнение реакций пиальных сосудов ишемизированных крыс на гиперкапнию с реакциями сосудов интактных животных показало, что на протяжении 21 дня после перенесенной ишемии наблюдается снижение реактивности пиальных артериальных сосудов, вероятно, связанное с развитием эндотелиальной дисфункции, являющейся следствием каскада реакций, запущенных при ишемии и сохраняющихся после реинфузии. Наибольшее уменьшение числа и степени дилататорных реакций наблюдалось у сосудов 1 и 2 генерации, преимущественно относящихся к группе крупных пиальных артерий. Наряду с угнетением дилататорных реакций пиальных артериальных сосудов, у ишемизированных крыс в ответ на гиперкапнию происходило уменьшение числа констрикторных реакций мелких пиальных вен и венул.

Выводы. Установлено, что кратковременная однократная ишемия головного мозга приводит к длительному (в течение 21 дня) снижению реактивности пиальных артериальных и венозных сосудов на гиперкапнию.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, гиперкапния, реактивность пиальных сосудов.

Введение

Одним из основных факторов, определяющих исход и последствия ишемии головного мозга, является состояние реактивности мозговых сосудов, под которой понимается способность сосудов к изменению своего просвета в ответ на воздействие различного рода специфических стимулов. Сосудистая реактивность, предопределяющая возможность к дополнительному увеличению мозговой перфузии, обозначается как цереброваскулярный, или перфузионный резерв [3]. Для оценки перфузионного резерва используется гиперкапническая проба, позволяющая оценить резервные возможности для дополнительной дилатации артериальных сосудов в условиях измененной оксигенации [5]. Эффективность церебрального кровообращения во многом зависит от состояния пиально-капиллярного русла. Поэтому целью данного исследования было изучение реактивности пиальных сосудов крыс в ответ на гиперкапнию до и через 7, 14 и 21 день после перенесенной ишемии.

Материал и методы исследования

Эксперименты проведены на крысах линии Wistar массой 230–300 г (Отдел лабораторного животноводства Института физиологии им. И. П. Павлова РАН), содержащихся по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения с циклом «12 часов свет/12 часов темнота».

Для воспроизведения ишемии мозга использовали технику окклюзии двух сосудов с управляемой гипотензией, известную в англоязычной литературе как «2-vessel occlusion+hypotension model» [11], с авторскими модификациями [10]. У наркотизированных комбинацией золетил/домитор крыс производилось пережатие обеих сонных артерий на 12 мин с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне 45 ± 3 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц). Прямое измерение АД производилось через катетер в бедренной

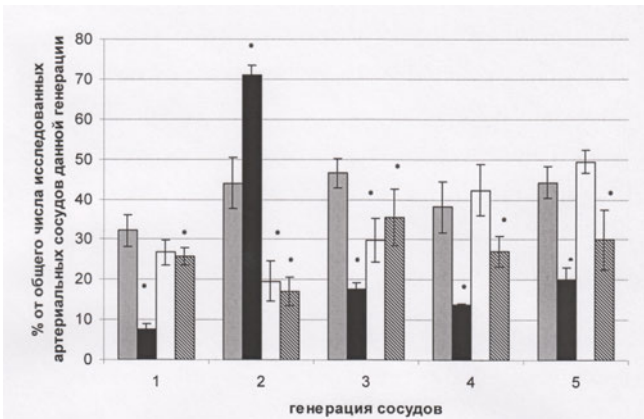


Рис. 1. Дилататорные реакции пиальных артериальных сосудов различных генераций в ответ на гиперкапнию у интактных и ишемизированных крыс, $p \leq 0.05$. По оси абсцисс: генерация артериальных сосудов. По оси ординат: % от общего числа исследованных артериальных сосудов данной генерации. Серая заливка — интактные крысы, черная заливка — крысы через 7 дней после перенесенной ишемии, белая заливка — крысы через 14 дней после перенесенной ишемии, штриховка — крысы через 21 день после перенесенной ишемии. * — по отношению к интактным крысам; различия достоверны на двустороннем уровне значимости

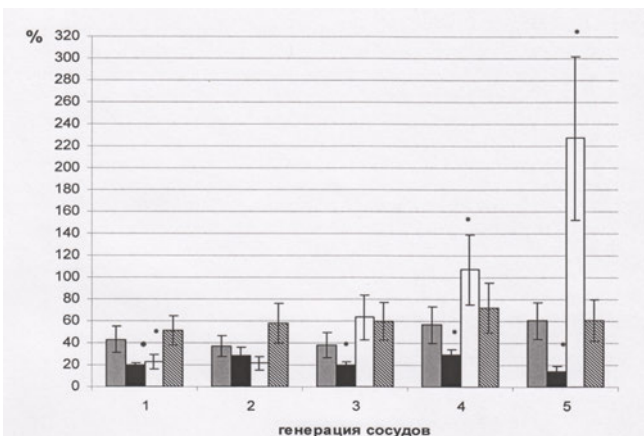


Рис. 2. Изменение средней площади сечения пиальных артериальных сосудов различных генераций, расширившихся в ответ на гиперкапнию, у интактных и ишемизированных крыс, $p \leq 0.05$. По оси абсцисс: генерация сосудов. По оси ординат: % от исходной средней площади сечения исследованных артериальных сосудов данной генерации. Серая заливка — интактные крысы, черная заливка — крысы через 7 дней после перенесенной ишемии, белая заливка — крысы через 14 дней после перенесенной ишемии, штриховка — крысы через 21 день после перенесенной ишемии. * — по отношению к интактным крысам; различия достоверны на двустороннем уровне значимости

артерии, соединенный с датчиком ПДП-400К (ВНИИМП, Москва), подключенным через стандартный усилитель к АЦП PCI 6023E (National Instruments, USA) в компьютере с программой ввода данных на базе системы LabView (National Instruments, USA). По окончании периода ишемии производилась полная реинфузия забранной крови. После ушивания операционных ран и выхода из наркоза (на подогреваемых столиках) животные возвращались в клетки своего обычного содержания.

Сравнение реакций пиальных артериальных и венозных сосудов на гиперкапнию с реакциями сосудов интактных животных проводили в трех отдельных группах крыс (7, 14 и 21 день после ишемии). Крыс наркотизировали уретаном (внутрибрюшинно, 125 мг/100 г массы тела). Среднее АД у наркотизированных интактных крыс составляло $96,2 \pm 11,8$ мм рт. ст., у ишемизированных — $93,5 \pm 10,9$ мм рт. ст. В теменной области черепа высверливалось отверстие площадью 1 см², твердая мозговая оболочка в пределах отверстия удалялась. Исследование осуществлялось методом прижизненной микрофотосъемки ($\times 470$) [6].

Фиксировалось фоновое изображение сосудов и их реакция на гиперкапнию. Гиперкапния вызывалась в/в-введением ацетазоламида (1,3 мг/100 г массы тела [8]). Механизм расширения сосудов при действии ацетазоламида связан с накоплением эндогенного CO₂ за счет ингибирования карбоангидразы эритроцитов и нарушения буферной системы CO₂ [3]. Реакции сосудов фиксировались через 10, 15 и 20 мин после введения ацетазоламида.

Проведено измерение 2225 участков сосудов. Рассматривались реакции сосудов 1–5-й генераций. Данная классификация являлась условной. Первой генерацией считали участок сосуда, выходящий непосредственно из-под кости на краю операционного поля. Ветвления 2–5 последовательно располагались (по току крови) за сосудом 1-й генерации. Исследовались сосуды следующих диаметров: артериальные — диаметром от 10 до 128 мкм, венозные — от 8 до 287 мкм. Измеряли ширину потока эритроцитов (примерно соответствующую внутреннему диаметру сосуда) и далее при помощи этой величины вычисляли площадь поперечного сечения сосуда по формуле: $S = \pi r^2$. Оценивали число участков и изменение средней площади сечения сосудов каждой генерации.

Линейные размеры сосудов определяли при помощи программы Inspector Matrox. Результаты статистически обрабатывались с помощью пакета Microsoft Excell 2003 с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что увеличение напряжения CO₂ в крови (гиперкапния) приводит к расширению мозговых артериальных сосудов, вызывая их почти максимальную дилатацию [4]. Наше исследование показало, что у интактных животных через 10 мин после введения ацетазоламида расширилось 45 % исследованных пиальных артериальных сосудов. На протяжении последующих 10 мин число дилатированных артериальных сосудов достоверно не менялось и составило в среднем $41,44 \pm 3,69$ % ($p \leq 0,05$). Число расширившихся артерий различных генераций отличалось незначительно. В каждой группе расширялось в среднем от 30 до 45 % исследованных сосудов (рис. 1). Увеличение средней площади сечения сосудов в ответ на гиперкапнический стимул составляло от 40 до 60 % (рис. 2).

Через 7 дней после перенесенной однократной кратковременной ишемии головного мозга общее число расширившихся в ответ на гиперкапнию

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

артерий уменьшилось. Расширилось в среднем $19,83 \pm 1,36$ % ($p \leq 0,05$) исследованных сосудов. Анализ реакций пиальных артериальных сосудов различных генераций показал, что число дилатированных сосудов практически всех генераций, за исключением 2-ой у ишемизированных крыс, было достоверно ниже, чем у интактных (рис. 1). Наименьшим ($7,71 \pm 1,32$ %, ($p \leq 0,05$)) оно было у артерий 1-й генерации, а в остальных генерациях расширилось от 17 до 20 % сосудов. Число расширившихся артерий 2-ой генерации значительно увеличилось (рис. 1). Степень дилатации пиальных артериальных сосудов у ишемизированных крыс была также достоверно ниже. Увеличение средней площади сечения сосудов в ответ на введение ацетазоламида составляло от 14 до 30 % (рис. 2).

На 14 день после перенесенной ишемии, также как и через 7 дней, общее число расширившихся в ответ на гиперкапнию пиальных артерий было достоверно ниже, чем у интактных животных, и составило в среднем $33,63 \pm 2,07$ % ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что количество дилатаций достоверно уменьшилось только в группах артерий 2-й и 3-й генераций (рис. 1). В остальных группах сосудов этот показатель достоверно не менялся, но отмечалось изменение степени дилатации. Средняя площадь сечения пиальных артериальных сосудов 1-й генерации, расширившихся в ответ на гиперкапнию, у ишемизированных крыс была достоверно ниже, чем у интактных ($22,87 \pm 6,95$ и $43,31 \pm 11,5$ % — соответственно, $p \leq 0,05$).

А в группах артерий 4–5-й генераций, напротив, значительно увеличивалась (соответственно в 2 и 3 раза). Средняя площадь сечения расширившихся в ответ на гиперкапнический стимул сосудов 2-й и 3-й генерации у интактных и ишемизированных крыс достоверно не отличалась (рис. 2).

Через 21 день после восстановления кровотока у ишемизированных крыс число сосудов, расширившихся в ответ на гиперкапнию, оставалось меньше, чем у интактных (соответственно $28,01 \pm 4,29$ %, $p \leq 0,05$ — ишемизированные; $41,44 \pm 3,69$ %, $p \leq 0,05$ — интактные). Достоверно уменьшалось число дилатированных сосудов всех генераций. Наибольшее уменьшение отмечалось в группе артерий 2-ой генерации (с $44,5 \pm 6,49$ % у интактных, до $17,12 \pm 3,53$ % у ишемизированных, $p \leq 0,05$). В остальных группах расширялось в среднем около 30 % исследованных сосудов (рис. 1). Степень дилатации сосудов у интактных и ишемизированных животных достоверно не отличалась (рис. 2).

Таким образом, нами было установлено, что кратковременная однократная ишемия головного мозга приводит к угнетению дилататорных реакций пиальных артериальных сосудов в ответ на гиперкапнию, сохраняющемуся в течение 21 дня после реинфузии. Это явление может быть связано с развитием эндотелиальной дисфункции, являющейся следствием каскада реакций, запущенных при ишемии и сохраняющихся после реинфузии [1]. Наиболее сильное снижение реактивности на гиперкапнию наблюда-

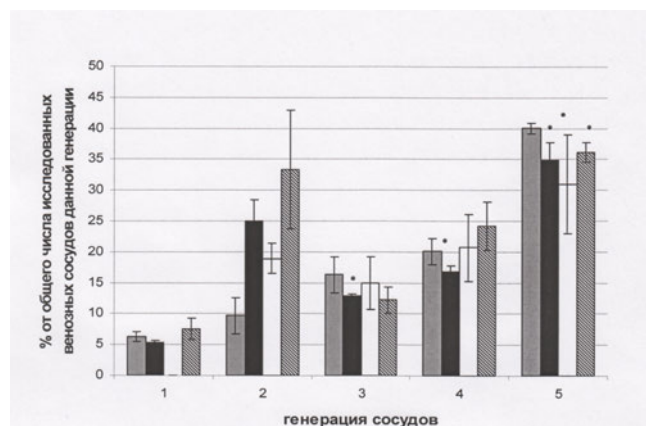


Рис. 3. Констрикторные реакции пиальных венозных сосудов различных генераций в ответ на гиперкапнию у интактных и ишемизированных крыс, $p \leq 0,05$. Серая заливка — интактные крысы, черная заливка — крысы через 7 дней после перенесенной ишемии, белая заливка — крысы через 14 дней после перенесенной ишемии, штриховка — крысы через 21 день после перенесенной ишемии. * — по отношению к интактным крысам; различия достоверны на двустороннем уровне значимости

лось у сосудов 1–2-й генераций, преимущественно относящихся к группе крупных пиальных артерий. Вероятно, эти сосуды наиболее подвержены ишемически-реинфузионным изменениям, связанным с дисфункцией эндотелия, так как имеют более выраженный эндотелиальный слой по сравнению с сосудами более мелких генераций [2].

Наряду с дилатацией артериальных сосудов головного мозга и увеличением артериального притока крови к мозгу, гиперкапния также вызывает реакцию мозговых вен. Для предотвращения гиперемии мозга увеличение притока крови требует усиления оттока, что достигается веноконстрикцией и выраженным ускорением венозного кровотока [4, 7]. При рассмотрении реакций пиальных вен нами не было обнаружено достоверных различий в степени их констрикции на гиперкапнический стимул у интактных и ишемизированных крыс. Однако анализ реакций сосудов различных генераций показал, что через 7 дней после перенесенной ишемии головного мозга число вен 3–5-й генераций, относящихся к группе мелких пиальных вен и венул, немного (в среднем на 3–6 %), но статистически значимо снижается (рис. 3). На протяжении последующих 2 недель это явление отмечалось только у венозных сосудов 5-й генерации.

Следовательно, было установлено, что на протяжении 21 дня после перенесенной ишемии головного мозга снижается реактивность на гиперкапнию как артериального, так и венозного звена пиального сосудистого русла. Наряду с угнетением дилататорных реакций пиальных артериальных сосудов, происходит уменьшение числа констрикторных реакций мелких пиальных вен и венул. Снижение CO_2 -реактивности отражает ограничение перфузионного резерва и неспособность к адекватному кровоснабжению головного мозга при возможном изменении перфузионного давления [9].

Выводы

1. Установлено что, кратковременная однократная ишемия головного мозга приводит к снижению реактивности пиальных сосудов в ответ на гиперкапнию, сохраняющемуся в течение 21 дня после реинфузии.
2. Происходит угнетение как артериального, так и венозного звена пиального сосудистого русла.

Литература

1. Волошин П. В., Малахов В. А., Завгородняя А. Н. Эндотелиальная дисфункция при цереброваскулярной патологии. Харьков, 2006.
2. Жулев Н. М., Пустозеров В. Г., Жулев С. Н. Цереброваскулярные заболевания. Профилактика и лечение инсультов. СПб.: Невский диалект, 2002.
3. Куликов В. П., Беспалов А. Г. Устройство и способ создания гиперкапнии для оценки перфузионного резерва мозгового кровообращения // Эхография. 2002. Т. 3. № 2. С. 160–164.
4. Куликов В. П. Артериовенозная церебральная реактивность на гиперкапнию в диагностике нарушений мозгового кровообращения // Клини. физиол. кровообращения. 2009. № 4. С. 5–15.
5. Лелюк В. Г., Лелюк С. Э. Ультразвуковая ангиология. М.: Реальное время, 2007.
6. Шуваева В. Н. Влияние He-Ne-лазерного излучения низкой мощности на адренореактивность пиальных артериальных сосудов и деформируемость эритроцитов у крыс / В. Н. Шуваева, А. В. Костылев, Н. С. Линькова,

3. В течение 21 дня после перенесенной ишемии головного мозга преимущественно наблюдается угнетение дилататорных реакций крупных пиальных артериальных сосудов и констрикторных реакций мелких пиальных вен и венул в ответ на гиперкапнию.

О. П. Горшкова // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2008. Т. 7. № 1 (25). С. 31–37.

7. Faraci F. M., Sobey C. G. Potassium channels and the cerebral circulation // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1996. Vol. 23. P. 1091–1095.

8. Grossman W. M., Koeberle B. The dose-response relationship of acetazolamide on the cerebral blood flow in normal subjects // Cerebrovasc. Dis. 2000. Vol. 10. P. 65–69.

9. Gueyffier F., Biossel J., Boutitie F. et al. Effect of antihypertensive treatment in patients having already suffered from stroke Gathering the evidence // Stroke. 1997. Vol. 28. № 12. P. 2557–2562.

10. Lensman M., Korzhhevskii D., Mourouets V. O. et al. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat // Brain Research. 2006. Vol. 1114. P. 187–194.

11. Smith M. L., Bendek G., Dahlgren N. et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: 2. A 2-vessel occlusion model // Acta Neurol. Scand. 1984. Vol. 69. P. 385–401.

UDK [616.831–005.4–06:612.127.3]–092.4

**Gorshkova O. P., Lensman M. V.,
Artem'eva A. I., Dvoretzky D. P. ¹**

Dynamics of pial vessels reactivity after brief cerebral ischemia

*I. P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science. 199034, Makarova nab., 6
St. Petersburg, Russia
e-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

Abstract

Cerebral blood vessel reactivity is one of the main determinants of final outcome of brain ischemia. Most of studies on the vascular mechanisms of ischemic brain injury, however, focus on the acute changes within ischemic period or several hours after it. Dilatatory capacity of cerebral arterioles (perfusion reservoir) is considered as an important factor of brain perfusion elevation in critical situations. The aim of the present study was to examine the pial vessel reactivity in response to hypercapnia in rats, subjected to transient global cerebral ischemia, at 7, 14 and 21 days after ischemia.

Materials and methods. Transient global cerebral ischemia was induced in anesthetized Wistar rats by bilateral common carotid artery occlusion for 12 min with simultaneous controlled hypotension to 45 ± 3 mm Hg, followed by blood reinfusion and recovery from anesthesia. Three different groups of rats were re-anesthetized at 7, 14 or 21 days after ischemia and subjected to microvascular reactivity studies using in vivo video microscopy. Hypercapnia was caused by i.v. injection of acetazolamide. The changes in diameter of pial arteries and veins in response to hypercapnia were measured.

Results and discussion. Global cerebral ischemia led to marked decrease in pial vessels (both arteries and veins) reactivity in response to hypercapnia, caused by i.v. injection of acetazolamide. In intact rats, i.v. injection of acetazolamide led to pial arteries dilation and pial veins constriction; in animals subjected to ischemia-reperfusion, the numbers of dilated large arteries and constricted small veins were much less, as well as the extent of arterial dilation. Reactivity changes were observed in all time points studied.

Conclusions. Thus, transient global cerebral ischemia cause marked and long lasting (3 weeks) decrease in pial vessel reactivity in response to hypercapnia.

Keywords: cerebral ischemia, pial vessels, hypercapnia.

1. Voloshin P.V., Malahov V.A., Zavgorodnjaja A.N. Jendotelial'naja disfunkcija pri cerebrovaskuljarnoj patologii. [Endothelial dysfunction at cerebrovascular pathology] // Kharkov. 2006. [In Russian].
2. Zhulev N.M., Pustozarov V.G., Zhulev S.N. Cerebrovaskuljarnye zabolevanija. Profilaktika i lechenie insul'tov. [Cerebrovascular diseases. Stroke prevention and treatment] // Saint-Petersburg: Nevsky dialect. 2002. [In Russian].
3. Kulikov V.P., Bepalov A.G. Ustrojstvo i sposob sozdaniya giperkapnii dlja ocenki perfuzionnogo rezerva mozgovogo krovoobrashhenija [The device and way of creation of a hypercapnia for an assessment of a perfusional reserve of brain blood circulation] // Jehokardiografija [Echocardiography]. 2002. V. 3, N2. P. 160-164. [In Russian].
4. Kulikov V.P. Arteriovenoznaja cerebral'naja reaktivnost' na giperkapniju v diagnostike narushenij mozgovogo krovoobrashhenija [Arteriovenous cerebral reactivity for hypercapnia in diagnostics of brain hemodynamics disorders] // Klinicheskaja fiziologija krovoobrashhenija [Clinical physiology of blood circulation]. 2009. N4. P. 5-15. [In Russian].
5. Leljuk V.G., Leljuk S.Je. Ul'trazvukovaja angiologija. [Ultrasonic angiology] // Moscow: Real time. 2007. [In Russian].
6. Shuvaeva V.N., Kostylev A.V., Lin'kova N.S., Gorshkova O.P. Vlijanie He-Ne-lazernogo izlucheniya nizkoj moshhnosti na adrenoreaktivnost' pial'nyh arterial'nyh sosudov i deformiruemost' jerytrocitov u krys [The influence of He-Ne low level laser irradiation on adrenoreactivity of pial arterial vessels and erythrocytes deformability in rats] // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija. [Regional hemodynamics and microcirculation]. 2008. V.7, N1(25). P.31-37. [In Russian].
7. Faraci F.M., Sobey C.G. Potassium channels and the cerebral circulation // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1996. V. 23. P.1091-1095.
8. Grossman W.M., Koeberle B. The dose-response relationship of acetazolamide on the cerebral blood flow in normal subjects // Cerebrovasc. Dis. 2000. V.10. P.65-69.
9. Gueyffier F., Biossel J., Boutitie F., et al. Effect of antihypertensive treatment in patients having already suffered from stroke Gathering the evidence // Stroke. 1997. V.28, N 12. P. 2557-2562.
10. Lensman M., Korzhevskii D., Mourovets V.O., Kostkin V., Izvarina N., Perasso L., Gandolfo C., Otellin V., Polenov S., Balestrino M. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat // Brain Research. 2006. V.1114. P.187-194.
11. Smith, M.L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosen, I., Wieloch, T., Siesjo, B.K., Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: 2. A 2-vessel occlusion model // Acta Neurol. Scand. 1984. V.69. P. 385-401.