

УДК 616-005.4-085.225.2/.451.13

СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ИНФУЗИОННЫХ РАСТВОРОВ ПРИ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ

А.И. Семененко

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова (21018, Украина, г. Винница, ул. Пирогова, 56)

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, HAES-LX-5 %, волювен, адениловые нуклеотиды.

CONDITION OF ENERGY METABOLISM OF RAT CEREBRUM ON THE BACKGROUND OF SOME LIQUIDS INFUSIONS UNDER ISCHEMIA REPERFUSION

A.I. Semenenko

N.I. Pirogov Vinnitsa National Medical University (56 Pirogov St. Vinnitsa 21018 Ukraine)

Background. Among the remedial measures that reduce the intensity of cerebral ischemia in acute cerebrovascular disorders, one of the main places takes infusion therapy.

Methods. An experimental model of ischemia reperfusion in rats was made by the putting of the clamp on the internal carotid artery for 20 minutes. Cerebroprotectors – 0.9 % NaCl, HAES-LX-5 % and Voluven – was injected intravenously 2.5 ml/kg 2 times per day for 7-days. Control Group does not receive any treatment. Cerebrum homogenate was tested for adenine nucleotides and glucose metabolites.

Results. Experimental therapy liquids of HAES-LX-5 % and Voluven suppress the formation of cerebrum energy deficiency. Compared with 0.9 % NaCl, useing of these drugs accompanied by a more essential reduction of energy deficiency, the processes of anaerobic glycolysis and by the improvement of aerobic glucose oxidation in ischemic cerebrum.

Cobclusions. HAES-LX-5 % and Voluven among themselves are almost equal in their ability to reduce the manifestations of energy deficiency and influence to the processes of anaerobic glycolysis and aerobic oxidation of glucose. The effect of the experimental treatment is the basis for further study of the protective effect of these drugs in acute cerebrovascular disorders.

Keywords: acute cerebrovascular disorder, HAES-LX-5 % Voluven, adenine nucleotides.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 4, p. 60–62.

Одним из немногих лечебных мероприятий с доказанной эффективностью при остром нарушении мозгового кровообращения (ОНМК) по ишемическому типу является тромболитическая терапия [4]. По данным литературы, реперфузия при ОНМК наиболее эффективна в первые минуты сосудистой катастрофы и в пределах следующих трех часов [5]. В дальнейшем значительно возрастает риск не только реперфузионного повреждения, но и геморрагических осложнений. Учитывая сложность диагностики и проведения реканализации, становится очевидным, что успешная реперфузионная терапия возможна в немногих случаях и только в крупных специализированных клиниках [10]. Среди лечебных мероприятий, снижающих вероятность прогрессирования ишемии головного мозга при острых нарушениях мозгового кровообращения, большой интерес представляет влияние на центральную гемодинамику. Важное место здесь

занимает церебропротекторная инфузионная терапия, выбор которой при заболеваниях и повреждениях головного мозга является одной из наиболее сложных проблем в комплексе консервативного лечения [13]. По мнению специалистов, схему лечения пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения следует дополнять препаратами, которые, воздействуя на отдельные звенья патофизиологического каскада в нейронах, способны продлить период «терапевтического окна» и создать защиту от реперфузионного повреждения [2, 6].

Материал и методы. В эксперименте проанализировано защитное действие при ОНМК коллоидно-гиперосмолярного раствора HAES-LX-5 % (зарегистрирован в Украине в 2013 г. под названием «Гекотон»), коллоидно-изоосмолярного раствора «Волювен» и изоосмолярного 0,9 % раствора NaCl. Опыты проведены на 70 белых крысах-самцах массой 160–170 г, которые содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением этических норм экспериментальных исследований в соответствии с «Общими принципами работы на животных», утвержденными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» от 26.02.2006 г.

Экспериментальную модель ишемии–реперфузии создавали путем наложения клипс на внутренние сонные артерии под пропофоловым наркозом (60 мг/кг) в течение 20 мин [8]. Животные были разделены на 5 групп по 14 особей в каждой. В первых трех группах крысам в катетеризированную бедренную вену вводили, соответственно, 0,9 % NaCl, HAES-LX-5 % и волювен (5 мл/кг в сутки). Первое введение выполняли через 30 мин после ишемии–реперфузии и далее ежесуточно через каждые 12 часов в течение 7 суток. Группа контроля не получала никакой терапии (ОНМК без лечения). Группу интактных животных сформировали псевдооперированные крысы, которым выделяли внутренние сонные артерии, но не накладывали лигатур. Животных выводили из опыта путем декапитации после предварительного пропофолового наркоза (60 мг/кг внутривенно).

Для биохимических исследований выделяли мозг, перфузировали его холодным 1,15 % раствором хлорида калия и гомогенизировали при 3000 об./мин (тефлон–стекло) в среде 1,15 % хлорида калия (соотношение 1:3). Гомогенаты центрифугировали в течение 30 мин при 600 g, отбирали аликвоты постядерного

супернатанта в микропробирки Eppendorf, которые хранили при температуре -20°C . Содержание адениловых нуклеотидов (аденозинтрифосфорной, аденозиндифосфорной и аденозинмонофосфорной кислот) и метаболитов глюкозы определяли в безбелковом трихлоруксусном экстракте тканей головного мозга 1:10 (10% раствор трихлоруксусной кислоты) хроматографическим методом [3]. Энергетический заряд адениловой системы головного мозга рассчитывали по D.E. Atkinson [11].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением средних арифметических величин и их ошибок и использованием t-критерия Стьюдента для сравнения групп наблюдения.

Результаты исследования. На 4-е сутки эксперимента содержание аденозинтрифосфата (АТФ) в мозге нелеченных крыс снизилось по сравнению с интактными животными на 56,9%, в то время как уровни аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинмонофосфата (АМФ) повысились в среднем на 153,5 и 73,2%, соответственно. На 7-е сутки в мозге крыс сохранились выраженные признаки угнетения окислительного фосфорилирования и его сопряжения с тканевым дыханием: уровень мозгового АТФ был на 45,4% меньше, а содержание АДФ и АМФ на 143 и 64,1% больше, чем у интактных животных. В условиях экспериментальной ишемии-реперфузии дисбаланс в системе АТФ/АДФ/АМФ ассоциировался со значительным падением энергетического заряда головного мозга на 4-е и 7-е сутки (табл. 1).

Инфузия 0,9% раствора NaCl не вызывала изменений в обмене адениловых нуклеотидов на 4-е сутки после реперфузии, и только на 7-е сутки изменения показателей достигали достоверных границ: снижение уровней АДФ и АМФ и увеличение содержания АТФ и энергетического заряда составило, по сравнению с контролем, 13,8, 15,9, 16,8 и 8,9%, соответственно. На фоне лечения HAES-LX-5% на 4-е сутки содержание АТФ в ткани мозга оказалось достоверно выше (в среднем на 26,4%), а АДФ и АМФ ниже (на 26,1 и 17,9%), чем у животных, которым вводили 0,9% NaCl. По состоянию на 7-е сутки в этой группе эффект инфузионной терапии становился более выраженным: содержание АТФ повышалось на 33,7%, а АДФ и АМФ – снижалось на 35,5 и 21,1%, соответственно, по сравнению с мозгом у крыс,

получавших 0,9% NaCl. Здесь также на 4-е и 7-е сутки был отмечен рост энергетического заряда: на 13,1 и 15,8% по сравнению с контролем. В условиях лечения волювеном на 3-и и 7-е сутки эксперимента отмечалось значимое повышение уровня АТФ и энергетического заряда мозга, а также снижение содержания АДФ и АМФ по сравнению с группой «0,9% NaCl» (табл. 1).

На 4-е сутки эксперимента в головном мозге крыс контрольной группы, по сравнению с интактными животными, достоверно повышался уровень лактата (в среднем на 322,4%), снижалось содержание пирувата (на 63,5%) и существенно (в 11,5 раза) возрастало соотношение «лактат/пируват». На 7-е сутки описанные изменения были менее выражены (табл. 2).

Таблица 1

Влияние церебропротекторов на содержание адениловых нуклеотидов в мозге крыс при ишемии-реперфузии ($M \pm m$)

Группа животных	Срок, сутки	Адениловые нуклеотиды, мкмоль/г сухой ткани			Энергетический заряд
		АТФ	АДФ	АМФ	
Интактные	4	2,88 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,02	0,589 $\pm$ 0,019	0,764 $\pm$ 0,004
	7	2,93 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,01	0,579 $\pm$ 0,019	0,767 $\pm$ 0,009
Контроль	4	1,24 $\pm$ 0,05 ¹	2,19 $\pm$ 0,07 ¹	1,020 $\pm$ 0,050 ¹	0,525 $\pm$ 0,005 ¹
	7	1,60 $\pm$ 0,12 ¹	2,09 $\pm$ 0,05 ¹	0,950 $\pm$ 0,037 ¹	0,569 $\pm$ 0,013 ¹
0,9% NaCl	4	1,40 $\pm$ 0,07 ¹	1,95 $\pm$ 0,10 ¹	0,910 $\pm$ 0,026 ¹	0,557 $\pm$ 0,008 ¹
	7	1,87 $\pm$ 0,05 ^{1,2}	1,80 $\pm$ 0,05 ^{1,2}	0,799 $\pm$ 0,032 ^{1,2}	0,620 $\pm$ 0,003 ¹
Волювен	4	1,74 $\pm$ 0,02 ^{1,3}	1,47 $\pm$ 0,06 ¹⁻³	0,770 $\pm$ 0,024 ¹⁻³	0,622 $\pm$ 0,005 ¹⁻³
	7	2,46 $\pm$ 0,06 ¹⁻³	1,20 $\pm$ 0,06 ¹⁻³	0,640 $\pm$ 0,014 ¹⁻³	0,712 $\pm$ 0,003 ¹⁻³
HAES-LX-5%	4	1,77 $\pm$ 0,03 ¹⁻³	1,44 $\pm$ 0,06 ¹⁻³	0,747 $\pm$ 0,019 ¹⁻³	0,630 $\pm$ 0,002 ¹⁻³
	7	2,50 $\pm$ 0,05 ¹⁻³	1,16 $\pm$ 0,08 ¹⁻³	0,630 $\pm$ 0,011 ¹⁻³	0,718 $\pm$ 0,005 ¹⁻³

¹ Разница с группой «интактные» статистически значима.

² Разница с группой «контроль» (без лечения) статистически значима.

³ Разница с группой «0,9% NaCl» статистически значима.

Таблица 2

Влияние церебропротекторов на метаболизм глюкозы в мозге крыс при ишемии-реперфузии ($M \pm m$)

Группа	Срок, сутки	Метаболиты, мкмоль/г сухой ткани		Лактат/пируват
		лактат	пируват	
Интактные	4	1,74 $\pm$ 0,07	0,280 $\pm$ 0,017	6,30 $\pm$ 0,34
	7	1,68 $\pm$ 0,06	0,293 $\pm$ 0,015	5,78 $\pm$ 0,26
Контроль	4	7,35 $\pm$ 0,21 ¹	0,102 $\pm$ 0,004 ¹	72,6 $\pm$ 3,14 ¹
	7	6,75 $\pm$ 0,11 ¹	0,150 $\pm$ 0,005 ¹	45,3 $\pm$ 1,65 ¹
0,9% NaCl	4	5,40 $\pm$ 0,05 ^{1,2}	0,124 $\pm$ 0,006 ^{1,2}	44,0 $\pm$ 1,66 ^{1,2}
	7	4,52 $\pm$ 0,06 ^{1,2}	0,189 $\pm$ 0,007 ^{1,2}	24,1 $\pm$ 0,86 ^{1,2}
Волювен	4	3,20 $\pm$ 0,06 ¹⁻³	0,160 $\pm$ 0,006 ^{1,3}	20,2 $\pm$ 0,82 ¹⁻³
	7	2,22 $\pm$ 0,05 ¹⁻³	0,261 $\pm$ 0,007 ^{1,3}	8,53 $\pm$ 0,27 ¹⁻³
HAES-LX-5%	4	3,28 $\pm$ 0,07 ¹⁻³	0,156 $\pm$ 0,006 ^{1,3}	21,20 $\pm$ 0,65 ¹⁻³
	7	2,33 $\pm$ 0,05 ¹⁻³	0,256 $\pm$ 0,009 ^{1,3}	9,15 $\pm$ 0,30 ¹⁻³

¹ Разница с группой «интактные» статистически значима.

² Разница с группой «контроль» (без лечения) статистически значима.

³ Разница с группой «0,9% NaCl» статистически значима.

Использование 0,9 % раствора NaCl уменьшало дисбаланс в системе «лактат/пируват», а при введении HAES-LX-5 % и волювена на 4-е сутки содержание лактата в ткани мозга становилось достоверно меньше, чем при лечении раствором хлорида натрия (на 39,2 и 40,7 %, соответственно). В этих условиях содержание пирувата оказалось достоверно выше – на 25,8 и 29 %, а соотношение «лактат/пируват» снижалось почти в 2 раза. Дальнейшее введение HAES-LX-5 % и волювена более существенно улучшало аэробный метаболизм глюкозы. Так, на 7-е в этих группах содержание лактата и соотношение «лактат/пируват» становились меньше, а содержание пирувата – больше, чем у крыс, которым вводили 0,9 % раствор хлорида натрия (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Как известно из литературных источников, в ишемизированных тканях в условиях гипоксии и энергодифицита существенно нарушается углеводный обмен: подавляются аэробные пути окисления, усиливается анаэробный гликолиз, накапливаются лактат и другие недоокисленные продукты, возникает ацидоз [1, 7]. В ходе эксперимента было установлено, что в условиях ишемии–реперфузии без фармакокоррекции в мозге крыс выявлялись существенные нарушения обмена адениловых нуклеотидов.

Выраженность нейродеструктивных процессов при ОНМК зависит от локального снижения кровоснабжения и на первом этапе характеризуется формированием энергетического дефицита и ацидоза. Состояние энергообеспечения клеток мозга связано с уровнем макроэргических фосфатов – АТФ, АДФ и АМФ. При этом изменения содержания адениловых нуклеотидов опережают изменения других функционально-метаболических показателей жизнедеятельности клетки [7, 9, 12].

Экспериментальная терапия острого нарушения мозгового кровообращения растворами HAES-LX-5 % и волювена сдерживала формирование энергодифицитного состояния мозга, что могло быть связано с улучшением перфузии в зоне ишемии за счет гиперперфузии, открытия коллатералей (триггер при увеличении кровотока) и повышения перфузионного давления за счет снижения вязкости крови [13]. По способности уменьшать проявления энергодифицита и влиять на процессы анаэробного гликолиза и аэробного окисления глюкозы HAES-LX-5 % и волювен между собой практически не отличались. Введение 0,9 % NaCl не вызывало достоверных различий в интенсивности обмена адениловых нуклеотидов на 4-е сутки эксперимента, и только на 7-е сутки изменения здесь достигали границ достоверности по сравнению с группой контроля. Применение HAES-LX-5 % и волювена сопровождалось более существенным уменьшением энергодифицита, процессов анаэробного гликолиза и улучшением аэробного окисления глюкозы в ишемизированном головном мозге животных.

Литература

1. Нечипуренко Н.И., Пашковская И.Д., Мусиенко Ю.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга // Медицинские новости. 2008. № 1. URL: <http://www.mednovosti.by/journal.aspx?article=767> (дата обращения 10.02.2014).
2. Никонов В.В., Савицкая И.Б. Роль антагонистов глутаматных рецепторов (ПК-Мерц) в лечении повреждений мозга // Медицина неотложных состояний. 2012. № 5 (44). С. 36–40.
3. Прохорова М.И. Современные методы биохимических исследований. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. 272 с.
4. Рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками (2008). Исполнительный комитет Европейской инсультной организации (ESO) и авторский комитет ESO // Практическая ангиология. 2008. № 4. С. 9–23.
5. Соболева Е.Л., Орлов Ю.П. О возможных путях профилактики реперфузии при критических состояниях // Сибирский медицинский журнал. 2012. № 1. С. 13–16.
6. Трошин В.Д., Бровков Н.Н. Неотложная кардионеврология. М.: Медицинское информационное агентство, 2010. 672 с.
7. Ходаковский А.А. Влияние адемола на показатели энергетического обмена в головном мозге крыс с моделью острой церебральной ишемии // Буковинский медицинский вестник. 2013. Т. 17, № 2 (66). С. 140–143.
8. Ходаковский А.А., Маринич Л.И., Багаури О.В. Особенности формирования постреперфузионного повреждения нейронов - характеристика модели «ишемия-реперфузия». Новые направления и перспективы развития современной церебропротекторной терапии ишемического инсульта // Врач-аспирант. 2013. № 3 (58). С. 69–76.
9. Шведский В.В., Штрыголь С.Ю., Мерзликин С.И. Влияние диакамфа гидрохлорида на показатели энергетического обмена в головном мозге крыс с моделью церебральной ишемии на фоне сахарного диабета // Клин. фармация. 2011. Т. 15, № 3. С. 57–61.
10. Шведский В.В., Штрыголь С.Ю., Мерзликин С.И. Эффективность диакамфа гидрохлорида при экспериментальном остром нарушении мозгового кровообращения на фоне сахарного диабета // Вестник Украинской медицинской стоматологической академии. 2011. Т. 11, вып. 3 (35). С. 84–88.
11. Atkinson D.E. Citrate and citrate cycle in regulation of energy metabolism // The metabolic roles of citrate. London and New York, 1968. P. 23–40.
12. Belenichev I.F., Kolesnik Yu.M., Pavlov S.V. [et al.] Malate-aspartate shunt in neuronal adaptation to ischemic conditions: molecular-biochemical mechanisms of activation and regulation // Neurochemical Journal. 2012. Vol. 6, No. 1. P. 22–28.
13. James D. Geyer, Camilo R. Gomez. Stroke. A practical approach. Lippincott Williams & Wilkins, 2009. 361 p.

Поступила в редакцию 22.02.2014.

Состояние энергетического метаболизма головного мозга крыс на фоне введения некоторых инфузионных растворов при ишемии–реперфузии

А.И. Семененко

Винницкий национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова (21018, Украина, г. Винница, ул. Пирогова, 56)

Резюме. В опытах на крысах с модельным острым нарушением мозгового кровообращения установлено, что ввод растворов волювена и HAES-LX-5 % в дозе 2,5 мл/кг 2 раза в день через каждые 12 часов в течение 7 суток сопровождалось более существенным по сравнению с терапией 0,9 % NaCl уменьшением энергодифицита, процессов анаэробного гликолиза и улучшением аэробного окисления глюкозы в ишемизированном головном мозге.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, HAES-LX-5 %, волювен, адениловые нуклеотиды.