

Экспериментальные исследования
ВЕСЕЛКИНА О. С.³, МИХАЙЛОВ В. Н.²,
МИХАЙЛОВА И. А.^{1, 2}, ПЕТРИЩЕВ Н. Н.^{1, 2}

Влияние N,N'-замещенных пиперазинов на реактивность сосудов микроциркуляторного русла

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

² Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

³ ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург

e-mail: fsika45@mail.ru

Реферат

Исследовалось влияние N,N'-замещенных пиперазинов (препараты VRV-0411 и VRV-0511) при внутривенном введении на адренореактивность сосудов микроциркуляторного русла. Опыты выполнены на артериолах и венах брыжейки крыс-самцов линии «Вистар». Показано, что оба препарата в разной степени уменьшали реакцию микрососудов брыжейки крыс на норадреналин, что может быть связано с возможным изменением исходного тонуса этих сосудов под воздействием препаратов.

Ключевые слова: микрососуды, адренореактивность, N,N'-замещенные пиперазины.

Veselkina O. S.³, Mikhailov V. N.¹,
Mikhailova I. A.^{1, 2}, Petrishchev N. N.^{1, 2}

The effect of N,N'-substituted piperazines on adrenoactivity of mesentery microvessels

¹ St-Petersburg State Medical University named after I. P. Pavlov

² V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg

³ VERTEX Pharmaceutical Company, Saint-Petersburg

e-mail: fsika45@mail.ru

Abstract

The effect of intravenous VRV-0411 and VRV-0511 administration on adrenoactivity of rat mesentery microvessels was investigated in male Wistar rats. It was shown that both VRV-0411 and VRV-0511 decrease the vascular reactivity to Noradrenaline that can be explained by the possible changes of initial tone of the microvessels caused by VRV-0411 and VRV-0511.

Keywords: microvessels, adrenoactivity, N,N'-substituted piperazines.

Введение

Известно, что некоторые ингибиторы агрегации тромбоцитов, в том числе ацетилсалициловая кислота, озагрел, клопидогрел, дипиридамол, имеющие разный механизм действия (уменьшение образования T_xA_2 , блокада рецепторов к АДФ, торможение гидролиза циклических нуклеотидов), оказывают влияние на вазомоторную функцию эндотелия и микроциркуляцию [2, 3, 7, 8, 9]. Ранее нами было показано, что некоторые N,N'-замещенные пиперазины обладают антиагрегантными свойствами, причем блокируют не только тромбоксановый механизм активации тромбоцитов, но и опосредованный через α -адренорецепторы [1].

Цель исследования

Представляло интерес изучение влияния указанных препаратов на адренореактивность сосудов микроциркуляторного русла.

Материал и методы исследования

Исследования выполнены на крысах-самцах линии «Вистар» массой 250–350 г (питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН).

N,N'-замещенные пиперазины, содержащие в качестве заместителей сульфамидную (VRV-0511) или карбоксамидную (VRV-0411) группы, растворяли в физиологическом растворе и вводили (в течение 1 минуты) в хвостовую вену ненаркотизированных животных.

В контроле вводили физиологический раствор в том же объеме. Через 30 мин животных наркотизировали (тиопентал-натрий 60 мг/кг, подкожно).

Через нижнесрединный доступ извлекали петлю тонкой кишки, примыкающую к мезоаппендиксу, для исследования микроциркуляции и помещали крысу на термостатируемый предметный столик микроскопа. Объект исследования — артериолы и вены (D = 20–30 мкм).

Таблица 1

Препарат	% сужений сосудов от общего количества опытов	% сужения диаметров сосудов по отношению к исходному	% замедлений кровотока от общего количества наблюдений	Время начала замедления, с	Время восстановления кровотока, с
Контроль	78 (n=13)	20±2	50 (n=12)	27±6	91±5
VRV-0411 0,01 Мм/кг	67 (n=9)	22±20	56 (n=8)	18±4	79±4
VRV-0411 0,03 Мм/кг	26 (n=7) **	20±3	62 (n=7)	13±2*	32±4 *
артериолы					
Контроль	85 (n=15)	28±3	50 (n=14)	20±4	68±5
VRV-0411 0,01 Мм/кг	69 (n=8)	27±5	52 (n=10)	24±5	60±4
VRV-0411 0,03 Мм/кг	44 (n=8) *	24±4	61 (n=11)	11±3	26±4*

Брыжейка постоянно увлажнялась физиологическим раствором (20 кап./мин). Для исследования реактивности сосудов микроциркуляторного русла использовали норадrenalин «Агетан» (2 мг/мл) (Laboratoire AGUETTANT, Франция). Апликацию раствора норадrenalина производили непосредственно на брыжейку [6].

В работе была использована установка для изучения сосудов микроциркуляторного русла, созданная на базе микроскопа ЛЮМАМ И1 («ЛМО», Россия) [4]. С помощью видеокамеры (Optics and Electronics ISTA Ltd) производили видеозапись на персональный компьютер и проводили обработку программным пакетом Video-Test 4.0 (ISTA Ltd., Россия).

Определяли следующие показатели: количество микрососудов (в % к общему числу исследованных), в которых произошло изменение диаметра и скорости кровотока при воздействии норадrenalином, внешний диаметр сосуда (D, мкм) до и после апликации норадrenalина, время начала и окончания замедления кровотока в сосудах под действием норадrenalина (наблюдение производилось в течение 1 минуты после апликации).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета StatSoft Statistica v6.0 Multilingual. Значения p менее 0,05 рассматривались как значимые.

Результаты исследования и их обсуждение

У контрольных крыс после апликации норадrenalина в концентрации 10⁻⁶ г/мл наблюдалось достоверное (на 20±2 %) сужение просвета большинства венул (78 %). В среднем через 27±6 с после апликации норадrenalина отмечалось замедление кровотока, а через 91±5 с происходило его восстановление (табл. 1).

Констрикция артериол брыжейки после апликации норадrenalина (10⁻⁶ г/мл) была более выраженной по сравнению с венулами (28±3 и 20±2 % соответственно, p<0,05). Замедление кровотока

наблюдалось в 50 % изучаемых сосудов (такое же количество в венулах) в среднем через 20±4 с (в венулах, через 27±6 с), восстановление — через 68±5 с (в венулах — через 91±5 с p<0,05 по сравнению с артериолами).

Данные о влиянии препарата VRV-0411 на адренореактивность сосудов микроциркуляторного русла на норадrenalин приведены в таблице 1.

В опытах с дозой 0,01 мМ/кг сужение венул наблюдалось в 67 % случаев, было несколько меньше по сравнению с контрольной группой (78 %). Тенденция к уменьшению адренореактивности артериол была более очевидна (69 % по сравнению с 85 % в контроле), однако статистической достоверностью эти данные не обладали.

Степень сужения артериол и венул по отношению к исходному при действии норадrenalина практически не отличалась от контроля. Временное замедление кровотока под действием норадrenalина происходило примерно в половине исследуемых венул и артериол как в контроле, так и при введении препарата VRV-0411.

В венулах отмечена тенденция к более раннему началу реакции на норадrenalин (18±4) по сравнению с контролем (27±6), в артериолах отличий по этому параметру практически не было.

В артериолах уменьшалось время реакции, однако необходимой достоверностью эти данные не обладают.

При предварительном внутривенном введении препарата VRV-0411 в дозе 0,03 мМ/кг, как видно из таблицы 1, сужение венул наблюдалось в 26 % случаев (в контроле 78 %, p<0,01), при этом просвет венул уменьшался на 20±3 %, что практически не отличается от контроля. Замедление кровотока под действием норадrenalина начиналось раньше, чем в контроле (13±2 с по сравнению с 27±6 с, p<0,05).

Время восстановления кровотока после реакции на норадrenalин также уменьшилось (32±4 с по сравнению с контролем — 91±5 с).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние препарата VRV–0511 на адренореактивность микрососудов брыжейки крыс

Таблица 1

Концентрация норадреналина, г/мл	% сужений сосудов от общего количества опытов	% сужения сосудов по отношению к исходному	% замедлений кровотока от общего количества наблюдений	Время начала замедления кровотока, с	Время восстановления кровотока, с
венулы					
10 ⁻⁶	21 (n=6) **	18±4	32 (n=9)	18±4	40±4 *
артериолы					
10 ⁻⁶	22 (n=7) **	18±2	22 (n=6) *	9±2 *	27±5 *

*— $p<0,05$ по сравнению с контролем; ** — $p<0,01$ по сравнению с контролем.

Сократилась длительность реакции на норадреналин с 64 ± 8 с в контроле до 19 ± 3 с на фоне препарата.

Реакция артериол на норадреналин на фоне введения препарата VRV–0411 в дозе 0,03 мМ/кг также отличалась от контроля (табл. 1). Сужение артериол имело место в 44 % наблюдений (в контроле — 85 %, $p<0,05$), при этом степень сужения не отличалась от контроля (24 ± 4 и 28 ± 3 % соответственно). Время начала замедления кровотока под действием норадреналина имело тенденцию к снижению (11 ± 3 с и, соответственно 20 ± 4 в контроле), а время окончания реакции сократилось достоверно (26 ± 4 с и соответственно в контроле 68 ± 5 с, $p<0,05$).

Таким образом, на фоне введения препарата VRV–0411 в дозе 0,03 мМ/кг наблюдалось достоверное уменьшение реакции сосудов микроциркуляторного русла на норадреналин.

Реакция артериол и венул брыжейки на норадреналин у крыс, которым предварительно вводили препарат VRV–0511 в дозе 0,01 мМ/кг, имела отличия от реакций микрососудов в контрольных опытах, особенно в артериолах (табл. 2).

Так, сужение венул наблюдалось лишь в 21 % случаев (в контроле — 78 %, $p<0,01$), а процент уменьшения диаметров сосудов после воздействия норадреналина достоверно не отличался от контроля (18 ± 4 по сравнению с 20 ± 2 в контроле). Замедление кровотока после введения препарата происходила в венулах в 32 % случаях, однако увеличение это относительно контроля (50 %) недостоверно. Время начала замедления также достоверно не отличалось от контроля (18 ± 4 с по сравнению с 27 ± 6 с в контроле), а восстановление кровотока происходило быстро по сравнению с контролем (40 ± 4 и 91 ± 5 с соответственно, $p<0,05$). Таким образом, время реакции на норадреналин уменьшалось на 42 ± 5 с.

Констрикция артериол на фоне введения препарата VRV–0511 на норадреналин в концентрации 10^{-6} г/мл наблюдалась лишь в 22 % случаев (в контроле — 85 %, $p<0,05$), замедление кровотока наблюдалось в 22 % исследованных артериол (в контроле — 50 %, отличия недостоверны). Процент сужения диаметров артериол достоверно не отличался от контроля (24 ± 4 по сравнению с 28 ± 3 соответственно). Начало замедления кровотока в артериолах и при введении препарата и в контроле имело существенные различия (9 ± 2 и 20 ± 4 соответственно, $p<0,05$), восстановление кровотока происходило быстрее, чем в контроле (27 ± 5 и 68 ± 5 с соответственно, $p<0,05$). Время реакции артериол на норадреналин снизилось на 30 ± 6 с. Таким образом, на фоне введения препарата VRV–0511 реакции сосудов микроциркуляторного русла на норадреналин в концентрации 10^{-6} г/мл были менее выражены, особенно в артериолах.

Ранее нами было показано, что N,N'-замещенные пиперазины, содержащие в качестве заместителей сульфамидную или карбоксамидную группы, ингибируют агрегацию тромбоцитов (в цельной крови), индуцированную арахидоновой кислотой и адреналином, а также тормозят выход Ca^{++} из внутриклеточных депо [1]. Исходя из наличия общих механизмов агрегации тромбоцитов и вазоконстрикции, вызванных катехоламинами, можно предположить, что одним из возможных механизмов влияния N,N'-замещенных пиперазинов на адренореактивность сосудов может быть уменьшение внутриклеточного Ca^{++} , играющего ключевую роль в сокращении гладкомышечных клеток сосудов под влиянием норадреналина. Ингибирующее влияние на адренореактивность артериол и венул было особенно выражено у препарата VRV-0511, в котором в качестве заместителей содержится сульфамидная группа.

Литература

1. Веселкина О. С., Викторов Н. Б., Петрищев Н. Н. *N,N'*-замещенные пиперазины – ингибиторы агрегации тромбоцитов // *Материалы науч.-практ. конф. «Биологически активные вещества-фундаментальные и практические вопросы получения и применения. Крым, Новый Свет, Украина. 2011. С. 451.*
2. Коркушко О. В. и др. Влияние тиклопедина (тиклоида) на микроциркуляцию и гемореологию у пациентов пожилого возраста с ишемической болезнью сердца // *Украин. мед. журн. 1999. № 6 (14). Р. XI–XII.*
3. Петрищев Н. Н. и др. Влияние ацетилсалициловой кислоты на реактивность сосудов микроциркуляторного русла // *Ангиология и сосудистая хирургия. 2012. Т. 18. С. 52–53.*
4. Петрищев Н. Н. и др. Метод прижизненного тромбообразования с использованием полупроводникового лазера в микрососудах брюшечки у крыс // *Региональное кровообращение и микроциркуляция. 2009. № 2 (30). С. 68–72.*
5. Целелев В. Ю. и др. Роль антиагрегантных препаратов в коррекции эндотелиальной дисфункции // *Кубан. науч. мед. вестн. 2009. № 4 (109). С. 149–153.*
6. Янтарева Л. И. Изменение реактивности микрососудов после дистантной фотомодификации крови // *Региональное кровообращение и микроциркуляция. 2004. № 2 (10). С. 69–75.*
7. Lyn D. et al. P2Y12 and EP3 antagonists promote the inhibitory effects of natural modulators of platelet aggregation that act via AMD // *Platelets. 2011. № 22 (7). P. 504–515.*
8. Molero L. et al. Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery // *Br. J. Pharmac. 2005. № 146 (3). P. 419–423.*
9. Ou H. C. et al. Aspirin prevents resistin-induced endothelial dysfunction by modulating signaling AMPK, ROS and ac/e NOS // *J. Vasc. Surg. 2012. № 55 (4). P. 1104–1115.*