

На правах рукописи

ИЗВОЗЧИКОВА
Ольга Владимировна

**СОКРАТИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ВЕН ПРИ ДЕЙСТВИИ
ВЕНОТОНИКОВ И АНТИКОАГУЛЯНТОВ**

03.00.13- физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт- Петербург
2009

Диссертация выполнена в лаборатории физиологии кровообращения Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и в Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова.

Научный руководитель: Доктор медицинских наук, профессор
Лобов Геннадий Иванович

Официальные оппоненты: Доктор медицинских наук, профессор
Чурина Светлана Константиновна
(Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН)

Кандидат биологических наук
Лопатина Екатерина Валентиновна
(Федеральный центр крови, сердца и
эндокринологии им. В.А. Алмазова)

Ведущая организация: Санкт-Петербургская государственная
педиатрическая медицинская академия

Защита состоится _____ на заседании
диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
(Д. 002.020.01) при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-
Петербург, наб. Макарова д.6)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института физиологии им.
И.П. Павлова РАН (Санкт- Петербург, наб. Макарова д.6)

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Ордян Н.Э.

Актуальность проблемы. Вены большого круга кровообращения обеспечивают возврат крови, прошедшей через сосуды обменного типа, к сердцу, функционируют в условиях низкого трансмурального давления, которое на уровне сердца в мелких венах не превышает 20 мм.рт.ст. Вены нижних конечностей в этом отношении являются исключением. Даже при нормальном функционировании элементов стенки подкожных вен и сохранности клапанного аппарата в венах нижних конечностей трансмуральное давление выше, и при нарушении функции клапанов может достигать 100 мм рт. ст., поскольку на давление крови, создаваемое сердцем, накладывается гидростатическое давление столба крови. Стенка вен нижних конечностей подвергается значительно большему растяжению по сравнению с другими участками венозного русла, что создает определенные предпосылки для нарушения ее структуры и функции.

При длительной нагрузке на створки венозных клапанов их структура изменяется, и они не могут полностью выполнять свою функцию, что приводит к появлению так называемого «рефлюкса», т.е. обратного, от сердца, движения крови. Вследствие высокого венозного давления развивается венозный застой и прогрессирующие расширение вен. В стенке вен постепенно уменьшается количество гладкомышечных клеток (ГМК), сокращения которых обеспечивают сохранение ее тонуса. Просвет вены значительно увеличивается, створки клапанов постепенно перестают плотно смыкаться, формируется относительная, а затем и абсолютная клапанная недостаточность - основной признак хронической венозной недостаточности (ХВН).

ХВН нижних конечностей является самым распространенным заболеванием периферических сосудов (Савельев В.С., 2001; Савельев В.А., 2003; Стуров Н., 2008). До недавнего времени фармакотерапии ХВН уделялось незаслуженно мало внимания. Лекарственные препараты либо не использовались вовсе, либо им отводилась незначительная роль в терапии ХВН. В последние десятилетия ситуация изменилась к лучшему. Флебологи все больше склоняются к мнению, что консервативное лечение еще долгие годы будет, очевидно, основным методом оказания помощи больным с ХВН.

При лечении ХВН используются препараты, относящиеся к различным фармакологическим группам: венотоники, антикоагулянты и средства, улучшающие микроциркуляцию. Действие препаратов последней группы направлено, прежде всего, на улучшение обеспечения тканей конечности кислородом, а венотоники и антикоагулянты оказывают эффект на структурные стенки вен. Анализ литературных данных свидетельствует о недостатке, или, в ряде случаев, отсутствии конкретных сведений о влиянии препаратов вышеуказанных групп на сократительную функцию гладкомышечных клеток вен и возможных механизмах их действия. Такое состояние проблемы частично

объясняется тем, что клиницистов по понятным причинам интересует, прежде всего, результат применения того или иного медикамента у конкретного пациента. Кроме того, даже в крупных клиниках, как правило, нет возможности исследовать фундаментальные механизмы действия того или иного медикамента.

На фармацевтическом рынке представлены различные препараты, относящиеся к группе венотоников:

- препараты, содержащие растительные экстракты - сапонины (цикло 3 форте, аэцин, эскузан), флавоноиды (микронизированный диосмин);
- комбинированные препараты - анавенол и гинкор форт;
- группа рутозидов - венорутон, троксерутин, троксевазин;
- синтетические препараты - дипиридамол, дицинон, клопидогрель, пентоксифиллин.

Для подавляющего большинства из этих препаратов оценка венотонизирующего эффекта производилась по ряду субъективных (на основе различных опросников, заполняемых пациентами) и объективных методов диагностики, таких как измерение маллеолярного объема, ультразвуковая доплерография, фотоплетизмография, реовазография, компьютерная термография (Богачев В.Ю., 2005; Parrado F., Buzzì A., 1999; Boyle P. et al., 2003).

Кроме того, при лечении ХВН, для профилактики тромбозов широко применяются антикоагулянты: гепарин и его дериваты – низкомолекулярные гепарины.

Анализ литературных данных свидетельствует о явном дефиците или, в ряде случаев, отсутствии сведений о непосредственном или опосредованном местном влиянии препаратов вышеуказанных групп на сократительную функцию ГМК вен и возможных механизмах действия этих препаратов на ГМК сосудов. Таким образом, в проблеме компенсации нарушенных функций вен при ХВН раздел, связанный с применением венотоников и антикоагулянтов, не получил должного физиологического обоснования.

Цель и задачи исследования Целью настоящей работы являлось изучение эффектов и механизмов действия, широко применяемых при лечении хронической венозной недостаточности, венотоников (цикло-3 форт, венорутон, троксевазин) и антикоагулянтов (гепарин, фраксипарин, фрагмин) на гладкомышечные клетки вен.

Задачи исследования:

1. Изучить прямые и опосредованные эффекты венотоников и антикоагулянтов в рекомендуемых для клинического применения концентрациях на гладкие мышцы вен.

2. Исследовать эффекты и механизмы действия на гладкомышечные клетки подкожной и воротной вен препаратов группы венотоников: венорутон, троксевазин, цикло-3 форт.

3. Изучить эффекты и механизмы действия на гладкомышечные клетки подкожной и воротной вен препаратов группы антикоагулянтов: гепарин, фраксипарин, фрагмин.

Научная новизна работы:

Получены новые данные, свидетельствующие о непосредственном и опосредованном влиянии венотоников и антикоагулянтов на ГМК вен.

Показано, что венотонизирующие препараты и препараты из группы антикоагулянтов оказывают как выраженное прямое, так и эндотелий-зависимое влияние на тоническую и фазную сократительную активность ГМК подкожной и воротной вен.

Установлено, что цикло-3 форт непосредственно стимулирует α -адренорецепторы сосудистых гладких мышц и блокирует K^+ - каналы мембраны ГМК, а также ингибирует эндотелиальную синтазу оксида азота.

Впервые обнаружено, что активирующее влияние венорутона и троксевазина на миоциты вен реализуется за счет высвобождения из эндотелиальных клеток эндотелина.

Представлены новые данные о важной роли эндотелия как посредника в реализации эффектов нативного и низкомолекулярных гепаринов на ГМК вен. Гепарины приводят к снижению тонуса и увеличению силы фазных сокращений ГМК вен посредством усиления продукции эндотелиоцитами оксида азота.

Научная и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в раскрытии конкретных механизмов действия антикоагулянтов и венотонизирующих препаратов на ГМК венозных сосудов. Результаты исследования расширяют представления о путях и механизмах прямого и опосредованного эндотелием влияния венотоников и антикоагулянтов на фазную и тоническую активность гладких мышц вен. Полученные результаты могут быть использованы непосредственно в экспериментальных исследованиях сократительной функции сосудистых ГМК.

Практическая ценность работы определяется установлением общих закономерностей и выявлением механизмов действия венотоников и антикоагулянтов на гладкие миоциты венозных сосудов у животных и возможностью использования результатов проведенного исследования при разработке схем лечения ХВН у человека и способов стимуляции сократительной функции ГМК вен человека.

По результатам исследования внесены дополнения в лекционный курс по нормальной физиологии в Санкт-Петербургской государственной медицинской академии

им. И.И. Мечникова, Оренбургской государственной медицинской академии и Ивановской государственной медицинской академии.

Положения, выносимые на защиту

1. Цикло-3 форт оказывает сложное влияние на гладкомышечные клетки подкожной вены быка и воротной вены крысы:

а) цикло-3 форт активизирует сократительный аппарат миоцитов вен за счет стимуляции α -адренорецепторов гладкомышечных клеток;

б) цикло-3 форт блокирует K^+ - каналы мембраны гладкомышечных клеток, что приводит к деполяризации мембраны и развитию сокращения;

в) цикло-3 форт ингибирует эндотелиальную синтазу оксида азота и таким образом уменьшает базальную продукцию оксида азота и его дилатирующий эффект на гладкие мышцы вен.

2. Венорутон стимулирует высвобождение из эндотелиальных клеток эндотелина, который, активируя эндотелин А рецепторы мембраны миоцитов, стимулирует сократительный аппарат гладких мышц вен и увеличивает тонус стенки сосудов.

3. Троксевазин увеличивает продукцию эндотелиальными клетками эндотелина который, активируя эндотелин А рецепторы мембраны ГМК, стимулирует сократительные реакции миоцитов вен и вызывает увеличение напряжения стенки сосудов.

4. Нефракционированный и низкомолекулярные гепарины усиливают продукцию эндотелиоцитами оксида азота, что приводит к дилатации подкожной вены. В воротной вене, обладающей спонтанной фазной активностью, гепарины стимулируют эндотелиальную синтазу оксида азота, вследствие этого понижается тонус и уменьшается частоты фазных сокращений и, по механизму хроноинотропной зависимости, увеличивается амплитуда фазных сокращений гладких мышц.

Апробация работы

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на Конференции молодых ученых и сотрудников СПбГМА им. И.И. Мечникова «Мечниковские чтения» (Санкт-Петербург, 2002), на научно- практической конференции, посвященной 300-летию Санкт-Петербурга и 100-летию больницы Петра Великого (Санкт-Петербург, 2003), на III Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2003), на XIX съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004), на научно- практической конференции "Проблемы укрепления здоровья и профилактика заболеваний" (Санкт-Петербург, 2004),

на научно-практической конференции "Исследования по приоритетным направлениям в медицине и биологии" (Санкт-Петербург, 2009).

По результатам диссертационного исследования опубликовано 8 работ, из которых 2 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 159 страницах и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав с использованных методов и результатов собственных исследований, заключения, выводов, указателя литературы, включающего 343 источника, в том числе 208- зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 33 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования.

Объект исследования. В экспериментах в качестве объекта исследований использовались изолированные сегменты поверхностных вен голени передней конечности крупного рогатого скота и изолированные сегменты воротной вены белой крысы линии Вистар. Поверхностные вены голени передней конечности крупного рогатого скота были выбраны как объект исследования в связи с тем, что нагрузки на стенку вен конечности крупного рогатого скота в определенной степени сходны с нагрузками у человека (Скопичев В.Г., Шумилов Б.В., 2005; Проссер Л., Браун Ф., 1967). Воротная вена крысы использовалась как второй объект исследования, так как подкожные вены человека на определенных этапах развития варикозной болезни приобретают способность спонтанно сокращаться (Ерофеев Н.П., 1976; Orlov R.S., Erofeev N.P., 1977).

Приготовление препаратов для исследования Белые крысы были получены из вивария ГОУВПО Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова (групповой паспорт качества № 610 от 01.12.2002). Максимальный промежуток времени между забором материала и началом эксперимента не превышал 30 мин. Участок препарата под контролем бинокулярного стереоскопического микроскопа МССО тщательно очищался от жира и соединительной ткани. После наложения лигатур вырезался сегмент воротной вены. Длина препарата составляла от 5 до 8 мм.

Поверхностные вены голени передней конечности крупного рогатого скота забирали в ООО «Самсон-К» через 15-20 минут после забоя животного. Сосуды максимально очищали на месте от крови и окружающей соединительной ткани и доставляли в лабораторию в термосе, заполненном физиологическим солевым раствором Кребса. В дальнейшем препараты хранили в холодильнике в растворе Кребса при температуре +2° - +4° С.

У части препаратов (сегментов воротной вены и колец венозных сосудов) с целью изучения механизмов эндотелий-зависимых реакций удаляли эндотелий. Эта манипуляция проводилась на кольцах, вырезанных из поверхностной вены быка, механически, а на целых сегментах воротной вены крысы- путем продувания через сосуд воздуха на протяжении 1 мин.

Все эксперименты проводили в камере для экспериментальных исследований при постоянном протоке раствора Кребса со скоростью 1 мл/мин при температуре $+37,0\pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Тестовые вещества добавлялись в раствор Кребса непосредственно перед воздействием. Добавление в физиологический солевой раствор тестовых веществ обязательно сопровождалось измерением pH омывающего раствора. Нерастворимые и плохо растворимые в воде вещества – глибенкламид, индометацин предварительно растворялись в небольшом объеме раствора Кребса с добавлением эмульгатора-диметилсульфоксида в концентрации 10^{-3} моль/л и в последующем разводились раствором Кребса до необходимой концентрации.

Регистрация механической активности сегментов вен. При исследовании уровня тонического напряжения и параметров спонтанных и вызванных фазных сокращений сегментов воротной вены и колец, вырезанных из подкожных вен быка, использовалась экспериментальная установка, в которой датчиком являлся механоэлектрический преобразователь 6МХ1С. Механотрон обеспечивал измерение исходного уровня тонического напряжения и силы сокращений сосудистых препаратов в изометрическом режиме. Аноды механоэлектрического преобразователя подключались к мостовой измерительной схеме. Непрерывная запись полученных данных осуществлялась на самопишущем приборе Н 3121/3.

Методы статистической обработки полученных результатов Статистическую обработку данных выполняли на персональном компьютере с использованием прикладных программ для статистического анализа «Microsoft Excel». Вычисляли среднее и их ошибки ($p < 0,05$). Статистическую достоверность полученных различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследование механизмов действия цикло-3 форт на ГМК кровеносных сосудов.

При изучении параметров сократительной деятельности изолированных сегментов подкожной вены быка ($n=9$) было установлено, что в обычных экспериментальных

условиях эти препараты не проявляют спонтанной активности. После натяжения препарата, соответствующего трансмуральному давлению 15 мм рт. ст. (Скопичев В.Г., Шумилов Б.В., 2005), на протяжении 5-6 минут устанавливался определенный уровень тонуса, и при отсутствии воздействий тоническое напряжение не менялось длительное время. Добавление в омывающий раствор цикло-3 форт в концентрации 50 мг/л приводило к медленному повышению уровня тонического напряжения (n=7). Действие препарата начинало проявляться на 2-3 минутах. Максимальное повышение тонуса достигалось к 20-22 минуте действия цикло-3 форт. Удаление цикло-3 форт из омывающего раствора сопровождалось медленным снижением тонуса. На 30-й минуте после удаления из раствора цикло-3 форт тонус вены оставался несколько повышенным.

При изучении влияния цикло-3 форт на сократительную активность изолированных сегментов воротной вены (n=17) было установлено, что данный препарат в концентрации 50 мг/л к 7-8 минутам действия существенно увеличивал тонус ГМК (на $54 \pm 6,8\%$, $p < 0,05$), при этом в среднем снижалась амплитуда фазных сокращений (на $23 \pm 3,1\%$, $p < 0,05$), хотя некоторые фазные сокращения имели такую же амплитуду, что и до воздействия. Имело место, выраженное повышение частоты фазных сокращений (на $47 \pm 5,1\%$, $p < 0,05$). Действие цикло-3 форт начинало проявляться уже к середине второй минуты воздействия и достигало максимума на 7-8 минуте действия. При удалении цикло-3 форт из раствора параметры сократительной деятельности воротной вены медленно восстанавливались, на 30-й минуте отмены препарата регистрировались повышенные тонус и частота спонтанных сокращений.

Поскольку известно о способности экстракта иглицы, как действующего начала цикло-3 форт непосредственно стимулировать α -адренорецепторы ГМК стенки вен, в следующей серии экспериментов в физиологический раствор, омывающий сегмент подкожной вены, добавляли норадреналин в концентрации 10^{-6} моль/л (n=8). При действии норадреналина тонус ГМК препарата существенно повышался, достигая максимума на 2-3 минуте. На фоне максимальной реакции на норадреналин, в раствор вводили цикло-3 форт. В ответ на аппликацию цикло-3 форт тонус сегментов вен возрастал. В аналогичной серии экспериментов на изолированных сегментах воротной вены (n=8) были получены следующие результаты: при действии норадреналина резко возрастала частота фазных сокращений и уменьшалась амплитуда, тонус ГМК вены существенно повышался. На фоне максимальной реакции на норадреналин в раствор вводили цикло-3 форт. Действие цикло-3 форт приводило к увеличению тонуса сегментов воротной вены, амплитуда и частота фазных сокращений изменялись незначительно.

Продолжая серию опытов по исследованию возможных адреномиметических свойств цикло-3 форт, в раствор вводили неселективный блокатор α_1 -адренорецепторов – фентоламин и селективный блокатор α_1 -адренорецепторов – празозин в концентрации 10^{-7} моль/л (n=9). После 10-минутного действия адреноблокаторов в раствор вводили цикло-3 форт в концентрации 50 мг/л. В этом случае действие цикло-3 форт проявлялось медленнее, амплитуда тонического сокращения также была меньше по сравнению с эффектом цикло-3 форт в растворе Кребса. В серии экспериментов на воротной вене (n=7) были получены следующие данные: на фоне празозина эффект цикло-3 форт проявлялся медленнее, частота фазных сокращений сегментов воротной вены возрастала на $35 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$), амплитуда фазных сокращений уменьшалась на $12 \pm 2,2\%$ ($p < 0,05$), уровень тонического напряжения повышался на $34 \pm 5,3\%$ ($p < 0,05$).

Одним из важнейших пусковых факторов, приводящим к активации сократительного аппарата гладких мышц, является деполяризация мембраны ГМК. Деполяризация мембраны возбудимых клеток развивается как при входе в клетки по градиенту концентрации Na^+ и Ca^{2+} , так и при уменьшении выходящего калиевого тока, что обычно бывает при блокаде K^+ -каналов. С целью выявления возможной роли K^+ -каналов в реализации эффекта цикло-3 форт на гладкие мышцы воротной вены была проведена серия опытов с тетраэтиламмонием (n=7) и гиперкалиевым (n=9) раствором.

Тетраэтиламмоний (ТЭА) использовался в качестве блокатора K^+ -каналов, в концентрации 2 и 10 ммоль/л вызывал повышение тонуса гладких мышц подкожной вены. Цикло-3 форт на фоне ТЭА увеличивал напряжение сосудистой стенки, но в меньшей степени по сравнению с амплитудой ответов в физиологическом растворе. В свою очередь ТЭА на фоне развившейся контрактильной реакции гладких мышц подкожной вены на цикло-3 форт также вызывал меньшие по амплитуде сократительные ответы ГМК по сравнению с таковыми в физиологическом растворе. В экспериментах на воротной вене (n=7) цикло-3 форт на фоне ТЭА увеличивал напряжение сосудистой стенки, но в меньшей степени по сравнению с амплитудой ответов в физиологическом растворе.

При анализе данных, полученных в этой серии опытов, могло сложиться впечатление, что цикло-3 форт совместно с ТЭА максимально активизировали сократительный аппарат ГМК подкожной вены, и дальнейшее увеличение амплитуды сокращения было невозможно. С целью проверки этого предположения в омывающем растворе повышали концентрацию K^+ до 60 ммоль/л. При действии гиперкалиевого раствора развивалось длительное контрактурное сокращение с амплитудой, превышающей 200% от исходного уровня тонуса. В серии опытов (n=11) на изолированных сегментах воротной вены цикло-3 форт добавлялся в омывающий раствор

на фоне развития максимальной реакции ГМК сосуда на КСl. Реакция сосудистых препаратов на добавление цикло-3 форт в этом случае была значительно меньшей по сравнению с реакцией ГМК воротной вены в растворе Кребса.

Литературные данные свидетельствуют о важной роли эндотелия в регуляции тонуса и реакций ГМК сосудистой стенки на механические факторы и некоторые физиологически активные вещества (Murad F., 1997; López R.M. et al., 2004; Tanaka Y. et al., 2004). С целью изучения возможного вклада эндотелиальных клеток в формирование реакции гладких мышц сегментов подкожной вены на цикло-3 форт была проведена серия экспериментов с деэндотелизацией сосудов. При введении в омывающий раствор цикло-3 форт (n=7) эти препараты отвечали констрикторной реакцией меньшей величины по сравнению с интактными сегментами. Деэндотелизированные сегменты воротной вены также отвечали меньшими по величине сократительными реакциями, по сравнению с интактными венами на добавление в омывающий раствор цикло-3 форт (n=6).

В литературе представлено много доказательств важной роли оксида азота эндотелиального происхождения в регуляции реакций ГМК сосудистой стенки (Bolotina V.M. et al., 1994; Murad F., 1997; Shimamura K. et al., 2000). С целью изучения возможного вклада оксида азота в развитие реакции гладких мышц подкожной вены на цикло-3 форт была проведена серия опытов с применением L-NAME (ингибитор конститутивной синтазы оксида азота) в концентрации 10^{-4} моль/л (n=9) (Zhang G.X. et al., 2007). По мере действия L-NAME тонус сегментов вены несколько повышался. Затем на фоне действия L-NAME в раствор вводили цикло-3 форт. Действие цикло-3 форт приводило к повышению уровня тонического напряжения препаратов. Увеличение тонуса ГМК подкожной вены при добавлении в раствор цикло-3 форт на фоне L-NAME было достоверно меньшим по сравнению с аналогичной реакцией на цикло-3 форт в физиологическом растворе. В экспериментах на воротной вене цикло-3 форт на фоне действия L-NAME вызывал значительно меньшие реакции сосудистых гладких мышц (n=5).

Таким образом, цикло-3 форт оказывает сложное влияние на различные механизмы, участвующие в формировании тонуса и параметров фазной сократительной активности:

- цикло-3 форт способен стимулировать сократительный аппарат миоцитов за счет непосредственного взаимодействия с α -адренорецепторами сосудистых гладких мышц;
- цикло-3 форт оказывает блокирующий эффект на K^+ - каналы мембраны ГМК, что вызывает повышение сократительной активности;

- цикло-3 форт обладает способностью частично инактивировать эндотелиальную синтазу оксида азота и за счет этого уменьшать дилатирующий эффект базально продуцируемого оксида азота на гладкие мышцы подкожной и воротной вены.

Результаты исследования действия венорутона и троксевазина на ГМК кровеносных сосудов.

При исследовании действия венорутона на сократительную функцию изолированных сегментов подкожной вены быка было установлено, что добавление в омывающий раствор венорутон в концентрации 60 мг/л приводит к достаточно быстрому повышению уровня тонического напряжения ГМК вены. Действие препарата начинало проявляться уже к концу первой минуты. Максимальное повышение тонуса достигалось ко 2-3 минутам действия венорутон и составляло $77 \pm 8,5\%$ ($p < 0,05$) от исходного уровня ($n=12$). Удаление венорутон из омывающего раствора приводило к медленному снижению тонуса препарата. На 30-й минуте после удаления из омывающего раствора венорутон тонус стенки сосуда оставался повышенным.

Добавление в омывающий раствор троксевазина в концентрации 40 мг/л приводило к достаточно быстрому повышению уровня тонического напряжения на $97 \pm 8,9\%$ ($p < 0,05$) ($n=11$). Действие препарата начинало проявляться уже на 2 минуте. Максимальное повышение тонуса достигалось к 10-12 минутам действия троксевазина. Удаление троксевазина из омывающего раствора сопровождалось медленным снижением тонуса. На 30-й минуте после удаления троксевазина тонус вены все еще оставался несколько повышенным.

При исследовании сегментов воротной вены было показано, что венорутон оказывает выраженное влияние на все параметры сократительной деятельности ГМК. Было установлено, что венорутон в концентрации 60 мг/л ($n=15$) существенно увеличивал тонус ГМК (на $140 \pm 12,4\%$, $p < 0,05$), при этом снижалась амплитуда фазных сокращений (на $49 \pm 5,7\%$, $p < 0,05$) и наблюдалось повышение их частоты (на $32 \pm 4,1\%$, $p < 0,05$). Указанные цифры соответствуют максимуму эффекта. Действие венорутон начинало проявляться уже на 35-45 секундах после добавления препарата и достигало максимума на 60-90 секундах.

При изучении влияния троксевазина ($n=17$) на сократительную активность изолированных сегментов воротной вены было установлено, что данный препарат в концентрации 40 мг/л воздействия существенно увеличивал тонус ГМК. На максимуме эффекта троксевазина регистрировалось выраженное повышение уровня тонического

напряжения (на $102 \pm 12,4\%$, $p < 0,05$), увеличение амплитуды (на $128 \pm 5,7\%$, $p < 0,05$) и частоты фазных сокращений (на $36 \pm 4,1\%$, $p < 0,05$).

При удалении венорутона и троксевазина из омывающего раствора параметры сократительной активности воротной вены медленно восстанавливались, время восстановления тонуса миоцитов подкожной вены при отмене троксевазина составляло 20 минут, а при удалении из раствора венорутона - 35 минут.

В связи с тем, что в ряде литературных источников (Богачев В.Ю., 2002; 2004) упоминается о возможной плохой всасываемости оксерутинов (венорутон и троксевазин) в желудочно-кишечном тракте, были проведены исследования, где концентрация венорутона и троксевазина в растворе составляла 6 мг/л ($n=5$) и 4 мг/л ($n=6$), соответственно. При снижении концентрации препарата в омывающем растворе в 10 раз, характер ответных реакций оставался прежним, только уменьшалась их амплитуда. Дальнейшие исследования осуществляли с использованием венотоников в дозировке 60 и 40 мг/л, поскольку расчеты показывают, что концентрации венорутона и троксевазина при стандартном лечении приближаются к этим цифрам.

В следующей серии экспериментов оценивалось возможное опосредованное влияние венорутона и троксевазина на миоциты подкожной вены путем воздействия на эндотелиальные клетки, способные продуцировать большую группу вазоактивных веществ.

Во всех деэндотелизированных препаратах подкожной вены по окончании релаксации напряжение было достоверно выше по сравнению с интактными сосудами. Добавление венорутона в раствор, омывающий деэндотелизированные препараты подкожной вены, приводило к повышению тонического напряжения, однако этот подъем тонуса не превышал 30% ($p < 0,05$) амплитуды сократительной реакции интактных сегментов вен в физиологическом растворе ($n=7$). При исследовании эффекта троксевазина на деэндотелизированных сегментах вен ($n=6$) были получены практически такие же результаты, что и при изучении эффекта венорутона. Деэндотелизированные препараты воротной вены ($n=10$) также реагировали на эти венотоники значительно слабее по сравнению с интактными, не более.

Для оценки роли оксида азота эндотелиального происхождения в реализации реакций ГМК сосудистых стенок на венорутон и троксевазин была проведена серия опытов с применением L-NAME. На фоне действия L-NAME в концентрации 10^{-4} моль/л тонус сегментов интактных подкожных вен повышался (в среднем на $12,2 \pm 2,1\%$, $p < 0,05$). Введение в раствор венорутона ($n=4$) и троксевазина ($n=5$) на фоне применения блокатора синтазы оксида азота приводило к выраженному повышению тонического напряжения

стенки сосуда. Прирост тонуса в этих опытах практически не отличался от результатов, полученных при действии этих веществ в физиологическом растворе. Реакция сосудистых сегментов воротной вены (n=6) на оба венотоника на фоне блокады синтеза оксида азота статистически не отличалась от ранее зарегистрированных ответов интактных вен в физиологическом растворе.

С учетом важной роли эндотелина А в регуляции уровня тонического напряжения ГМК различных сосудов в следующей серии опытов использовали антагонист эндотелина А рецепторов BQ-123. Добавление в раствор BQ-123 в концентрации 3×10^{-7} моль/л не сопровождалось достоверными изменениями тонуса ГМК подкожной вены. При последующем добавлении в раствор венорутон (n=5) на фоне действия блокатора регистрировался сократительный ответ гладких мышц. Прирост тонуса стенки вены в этом случае был значительно меньше ($32,4 \pm 4,9\%$ по отношению к исходному, $p < 0,05$) по сравнению с эффектом венорутон в физиологическом растворе ($71,8 \pm 8,9\%$ по отношению к исходному, $p < 0,05$). При изучении эффекта троксевазина (n=4) на тонус гладких мышц подкожной вены на фоне BQ-123 были получены аналогичные результаты ($43,1 \pm 5,9\%$ и $97,3 \pm 11,9\%$ соответственно, $p < 0,05$). В серии опытов на сегментах воротной вены при добавлении в омывающий раствор венорутон или троксевазина на фоне действия антагониста эндотелина А рецепторов регистрировался достаточно выраженный ответ гладких мышц вены. При этом прирост тонуса и изменения частоты и амплитуды фазных сокращений в этом случае были значительно менее выраженными по сравнению с их изменениями в физиологическом растворе.

Таким образом, венорутон и троксевазин оказывают выраженный стимулирующий эффект на гладкие мышцы изолированных вен. Их активирующее влияние реализуется за счет высвобождения из эндотелиальных клеток эндотелина, который, действуя через эндотелин А рецепторы, стимулирует сократительный аппарат гладких мышц вен и приводит к увеличению тонуса стенки сосудов.

Результаты исследования механизмов действия гепарина, фрагмина и фраксипарина на ГМК кровеносных сосудов

При изучении влияния гепарина и его производных фрагмина и фраксипарина на параметры сократительной деятельности изолированных сегментов подкожной вены быка было установлено, что добавление в омывающий раствор гепарина натрия в концентрации 1000 ед/л (n=7), фрагмина в концентрации 500 МЕ/л (n=9) или фраксипарина в концентрации 570 МЕ/л (n=8) (именно этих величин достигает концентрация антикоагулянтов в плазме крови взрослого человека при их использовании в клинике)

приводило к снижению тонического напряжения стенки сосудов. Повышение концентрации антикоагулянтов в 2 раза сопровождалось незначительным увеличением их дилататорного эффекта.

При изучении влияния гепарина на сократительную активность изолированных сегментов воротной вены ($n=10$) было установлено, что данный препарат в концентрации 1000 ед/л вызывает повышение амплитуды фазных сокращений в среднем на $124 \pm 11,1\%$ ($p < 0,05$) на фоне снижения частоты фазных сокращений на $26 \pm 3,2\%$ ($p < 0,05$). Также наблюдался эффект синхронизации фазных сокращений, т.е. частота и амплитуда фазных сокращений становились более стабильными. Уровень тонического напряжения ГМК воротной вены при действии гепарина снижался на $9,3 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$). Для восстановления исходного уровня спонтанной сократительной активности после воздействия препарата требовалась длительная отмывка сосуда раствором Кребса (30- 35 мин).

Направленность эффектов фрагмина в концентрации 500 МЕ/л на сократительную активность изолированных сегментов воротной вены ($n=11$) была такой же, как и при действии гепарина, увеличение амплитуды фазных сокращений было таким же, что и при действии гепарина ($127 \pm 10,8\%$, $p < 0,05$), а уменьшение частоты было более выраженным ($49 \pm 5,8\%$, $p < 0,05$). Уровень тонического напряжения сегментов вен достоверно снижался. Также наблюдался эффект синхронизации фазных сокращений.

Влияние фраксипарина в концентрации 570 МЕ/л на амплитуду фазных сокращений изолированных сегментов воротной вены было менее выраженным ($n=9$). Фраксипарин к 9-11 минуте воздействия приводил к повышению амплитуды спонтанных фазных сокращений на $89 \pm 9,3\%$ ($p < 0,05$). При этом частота фазных сокращений снижалась в среднем на $42 \pm 5,2\%$ ($p < 0,05$). Так же, как и два вышеуказанных препарата, фраксипарин несколько снижал базальный тонус ГМК вены.

С целью исследования возможных механизмов действия гепарина натрия на мембрану ГМК подкожной вены голени быка к раствору Кребса добавляли раствор КСI с целью достижения конечной концентрации КСI в растворе 20 ммоль/л ($n=9$). На фоне развития максимальной реакции ГМК подкожной вены на повышение концентрации K^+ в раствор добавляли гепарин натрия в концентрации 1000 ед/л ($n=6$). В этом случае на протяжении 15-17 минут наблюдалось снижение тонического напряжения препаратов подкожной вены практически до исходного уровня. Реакция сосудистых препаратов воротной вены ($n=12$) на добавление в раствор гепарина натрия на фоне развития максимальной реакции ГМК сосуда на КСI проявлялась в виде снижения уровня базального тонуса, возрастания амплитуды и уменьшения частоты фазных сокращений. Также наблюдался эффект синхронизации фазных сокращений. Снижение тонического

напряжения миоцитов подкожной вены при действии фрагмина (n=5) и фраксипарина (n=6) происходило быстрее по сравнению с эффектом гепарина. Уровень тонического напряжения стенки подкожной вены возвращался к исходному на 7-9 минуте действия низкомолекулярных гепаринов. Эксперименты, проведенные на сегментах воротной вены с применением фрагмина (n=8) и фраксипарина (n=7), показали схожие результаты, при этом увеличение амплитуды в ответ на действие низкомолекулярных гепаринов было несколько меньшим по сравнению с нефракционированным гепарином.

В следующей серии экспериментов использовался ТЭА для установления роли K^+ в реализации эффектов гепарина. Введение гепарина (n=6) в омывающий раствор на фоне действия ТЭА в концентрации 10 ммоль/л, оказывало значительно меньшее влияние на уровень тонического напряжения ГМК сосуда. Близкие по значению результаты были получены и при добавлении в раствор фрагмина (n=9) и фраксипарина (n=8). В серии опытов на воротной вене ТЭА, добавленный в раствор Кребса, приводил к повышению амплитуды и снижению частоты фазных сокращений ГМК воротной вены. Добавление гепарина (n=5) слабо изменяло амплитуду фазных сокращений, но практически полностью восстанавливало частоту. Тоническое напряжение сосуда несколько снижалось. Данные, полученные при изучении эффектов фрагмина (n=4) и фраксипарина (n=5) на фоне ТЭА, в общих чертах повторяли эффекты гепарина.

Учитывая, что поляризация мембраны возбудимых клеток определяется проводимостью нескольких типов калиевых каналов, в следующей серии экспериментов использовался глибенкламид, как специфический блокатор АТФ-чувствительных K^+ -каналов. Гепарин, введенный в раствор на фоне глибенкламида, на протяжении 20 минут действия лишь незначительно (статистически недостоверно) понижал уровень тонического напряжения миоцитов. Удаление из раствора глибенкламида на фоне продолжающегося действия гепарина способствовало расслаблению ГМК вены, которое начиналось на 6-8 минуте после удаления глибенкламида и продолжалось 8-10 минут. К этому времени тонус стенки сосуда приближался к исходному. Близкие к описанным результаты были получены при исследовании по этой же схеме эффектов фрагмина (n=6) и фраксипарина (n=5). В экспериментах на сегментах воротной вены были получены следующие данные: глибенкламид стимулировал сократительную функцию ГМК воротной вены. Уровень тонического напряжения при добавлении в раствор глибенкламида незначительно возрастал, а изменения параметров фазных сокращений были существенными. Введение в раствор гепарина на фоне глибенкламида (n=7) сопровождалось увеличением частоты фазных сокращений, их амплитуда оставалась без изменений (рис.1). Эксперименты с добавлением в раствор фрагмина (n=5) и

фраксипарина (n=5) (на фоне развившейся реакции ГМК сосуда на глибенкламид) показали примерно такие же изменения параметров их сократительной деятельности, как и при введении гепарина. Небольшие отличия в изменениях амплитуды и частоты фазных сокращений миоцитов при действии фрагмина и фраксипарина по сравнению с эффектом гепарина были на границе достоверности.

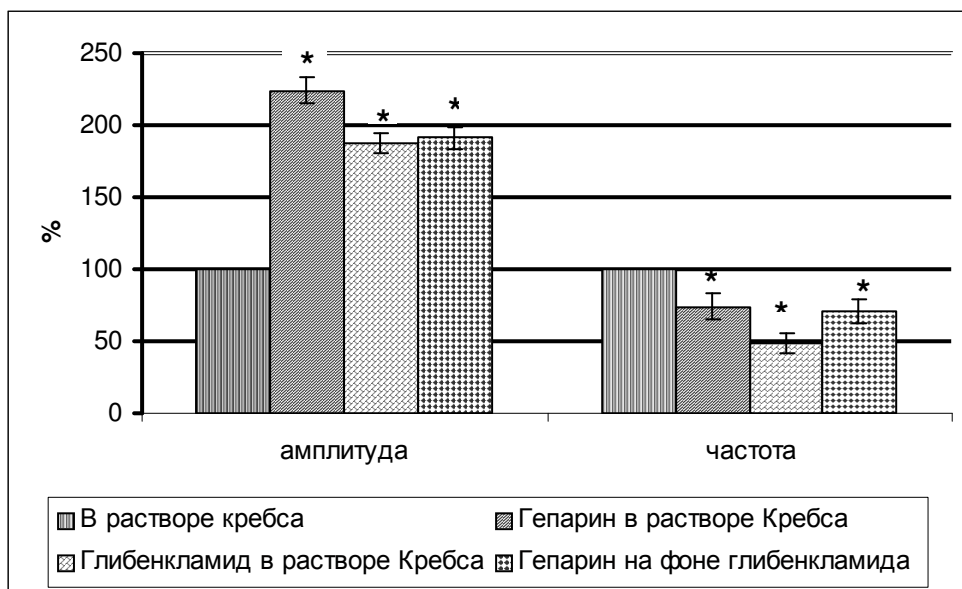


Рис. 1 Эффекты гепарина в растворе Кребса, глибенкламида в растворе Кребса и гепарина на фоне глибенкламида на амплитуду и частоту спонтанных фазных сокращений гладкомышечных клеток воротной вены (за 100% приняты параметры сократительной активности сегментов воротной вены в растворе Кребса).

Поскольку ТЭА и глибенкламид приводили к повышению тонуса сегментов подкожной вены, было выдвинуто предположение о возможном участии оксида азота в процессе дилатации подкожной вены. Оксид азота синтезируется в эндотелии практически всех сосудов и вызывает расслабление ГМК сосудов за счет открывания АТФ-чувствительных K^+ -каналов мембраны. В следующей серии опытов механически удаляли в подкожных венах эндотелий и исследовали их реакции при добавлении в раствор антикоагулянтов. В этих экспериментах гепарин (n=7), фрагмин (n=6) и фраксипарин (n=7) вызывали незначительное расслабление миоцитов деэндотелизированных сосудов (и в растворе Кребса, и в гиперкалиевом растворе) – от 5 до 7% от исходного.

Ингибирование синтеза оксида азота в эндотелиоцитах подкожной вены достигалось введением в раствор L-NAME. Во всех опытах на фоне L-NAME (n=16) был установлен слабый дилататорный эффект гепарина и низкомолекулярных гепаринов на миоциты подкожной вены (на пределе достоверности). В воротной вене на фоне действия L-NAME гепарин (n=4) увеличивал амплитуду фазных сокращений на $36 \pm 3,1\%$ и

недостаточно уменьшал их частоту без изменения уровня тонического напряжения. Данные, полученные при применении фрагмина (n=5) и фраксипарина (n=5) на фоне L-NAME, практически не отличались от результатов экспериментов с использованием гепарина.

Ингибирование растворимой гуанилатциклазы в миоцитах осуществлялось добавлением в раствор метиленового синего в концентрации 10^{-5} моль/л (Лобов Г.И., 1994; Ну С.М., 2003; D'Imo T., 2005). Введение в раствор, содержащий метиленовый синий, гепарина (n=5), фрагмина (n=4) или фраксипарина (n=4) сопровождалось достоверным расслаблением сосудов.

Серия экспериментов была поставлена с целью оценить возможную роль Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов в реализации эффекта антикоагулянтов на миоциты воротной вены. В качестве блокатора Ca^{2+} -чувствительных K^{+} -каналов ГМК использовался Ba^{2+} в концентрации 0,3 ммоль/л. Ba^{2+} , введенный в физиологический раствор, омывающий препараты воротной вены, не приводил к выраженным изменениям параметров сократительной деятельности ГМК воротной вены (n=9). Через 10 минут после введения в раствор Ba^{2+} в него добавляли гепарин (n=7). Направленность эффектов гепарина на фоне Ba^{2+} была такой же, что и в растворе Кребса, однако величина реакций была несколько меньшей. Величины реакций ГМК воротной вены на фрагмин (n=6) и фраксипарин (n=5) на фоне действия Ba^{2+} были практически такими же, как и при действии гепарина.

Таким образом, гепарины в подкожной вене приводят к длительному устойчивому понижению тонуса гладких мышц и дилатации сосуда. В воротной вене эффект гепаринов заключается в существенном повышении амплитуды спонтанных фазных сокращений и уменьшении их частоты.

Доказано, что дилататорный эффект гепаринов в этих сосудах является эндотелий-зависимым и реализуется за счет гиперполяризации мембраны ГМК, которая развивается в результате каскадной реакции: стимуляция эндотелиоцитов гепаринами → продукция эндотелиоцитами оксида азота → стимуляция оксидом азота растворимой гуанилатциклазы в цитоплазме миоцитов → повышение концентрации циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) → открытие АТФ-чувствительных K^{+} -каналов → усиленный выход K^{+} из клетки → снижение частоты сократительной активности, что свидетельствует о гиперполяризации мембраны.

Показано, что помимо описанного механизма вазодилатации, образующийся под действием гепаринов оксид азота непосредственно активирует Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы мембраны ГМК воротной вены и увеличивает амплитуду фазных сокращений по механизму хроноинотропной зависимости.

ВЫВОДЫ

1. Цикло-3 форт оказывает непосредственное стимулирующее действие на гладкомышечные клетки подкожной и воротной вен за счет активации α -адренорецепторов и блокирования K^+ -каналов мембраны гладкомышечных клеток, в результате повышается сократительная активность.
2. Цикло-3 форт в подкожной и воротной вене оказывает активирующее влияние на сократительный аппарат гладкомышечных клеток вен, благодаря ингибированию эндотелиальной синтазы оксида азота.
3. Венорутон стимулирует высвобождение из эндотелиальных клеток подкожной и воротной вен эндотелина, который, активируя эндотелин А рецепторы мембраны миоцитов, стимулирует сократительный аппарат гладких мышц вен и вызывает увеличение тонуса стенки сосудов.
4. Троксевазин увеличивает продукцию эндотелиальными клетками подкожной и воротной вен эндотелина, который, активируя эндотелин А рецепторы мембраны гладкомышечных клеток, приводит к увеличению напряжения стенки сосудов.
5. Нефракционированный и низкомолекулярные гепарины усиливают продукцию эндотелиоцитами подкожной вены оксида азота, что приводит к ее дилатации. В воротной вене, обладающей спонтанной фазной активностью, гепарины стимулируют эндотелиальную синтазу оксида азота, что приводит к снижению тонуса и уменьшению частоты фазных сокращений. Увеличение амплитуды фазных сокращений гладких мышц осуществляется по механизму хроноинотропной зависимости.

Список опубликованных работ

1. Г.И. Лобов, О.В. Извозчикова Влияние троксерутина и трентала на сократительную активность ГМК портальной вены крысы // Вестник СПбГМА им. И.И. Мечникова. - 2003.- Т 4, № 1. - С.80.
2. О.В. Извозчикова, Г.И. Лобов, С.Н. Садыгова, И.И. Кармацкая Влияние гепарина на сократительную активность ГМК портальной вены белой крысы // Механизмы функционирования висцеральных систем: тезисы докладов 3 Всероссийской конференции с международным участием. - СПб, 2003.- С. 179-180.
3. О.В. Извозчикова, Г.И. Лобов Влияние препаратов группы венотоников и антикоагулянтов на сократительную функцию ГМК воротной вены белой крысы // Иммуногенез и лимфоток (структурно- функциональные основы): Сборник научных трудов памяти И.И. Яровых.- СПб, 2003.- С. 77-78.
4. О.В. Извозчикова, Ж.В. Непьющих, С.Н. Садыгова, И.Е. Кармацкая Влияние антикоагулянтов на сократительную активность ГМК воротной вены белых крыс //

Проблемы укрепления здоровья и профилактика заболеваний: сборник научных трудов СПбГМА.- СПб, 2004.- С. 111-112.

5. О.В. Извозчикова, Г.И. Лобов Влияние фраксипарина на сократительную активность ГМК портальной вены белых крыс // Российский Физиологический журнал им. И.И. Сеченова.- 2004.- Т.90, №8.- С. 480-481.

6. О.В. Извозчикова Влияние Цикло-3 форт на сократительную активность вен // Исследования по приоритетным направлениям в медицине и биологии / материалы научно- практической конференции. - СПб, 2009.- С. 126- 128.

7. Г.И. Лобов, О.В. Извозчикова. Влияние гепарина на сократительную активность гладкомышечных клеток вен // Вестник СПбГМА им. И.И. Мечникова. - 2009.- Т.25 №1. - С. 77- 84.

8. О.В. Извозчикова Влияние Фрагмина на сократительную активность гладкомышечных клеток венозных сосудов // Исследования по приоритетным направлениям в медицине и биологии: материалы научно- практической конференции. - СПб, 2009.- С. 128- 129.