

УДК 616.092.9

## РЕОРГАНИЗАЦИЯ СОСУДИСТОГО РУСЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ТАБАКОКУРЕНИЯ

Захарчук Н.В., Невзорова В.А., Гончар Е.Ю.

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
Владивосток, e-mail: zaharchuknat@mail.ru

Изучено состояние сосудистого русла головного мозга и клеток нейроглии в условиях экспериментального моделирования табакокурения. Исследование проведено на 10 крысах-самцах линии Vistar, разделенных на две группы. Контрольная группа животных дышала атмосферным воздухом, а экспериментальную группу ежедневно обкуривали табачным дымом в ингаляционной камере в течение 6 месяцев согласно протоколу Н. Zheng и колл. После декапитации животных изготавливались гистологические препараты головного мозга. Срезы головного мозга толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, затем оценивали плотность распределения капилляров, удельную плотность распределения клеток глии и индекс Керногана (соотношение толщины стенки артерии к диаметру её просвета). У животных экспериментальной группы установлено достоверное уменьшение количества капилляров в головном мозге. Одновременно с этим отмечается уменьшение числа клеток в веществе мозга, о чем говорит достоверное снижение удельной плотности распределения клеток нейроглии. Эти изменения приводят к повышению сосудистого сопротивления и способствуют структурной перестройке артерий в виде сужения их просвета и утолщения стенки за счёт гипертрофии, о чем свидетельствует увеличенный индекс Керногана в экспериментальной группе.

**Ключевые слова:** табакокурение, головной мозг, сосудистое ремоделирование, нейроглия, крысы

## REORGANIZATION OF VASCULAR BED OF THE RATS BRAIN UNDER MODELING CHRONIC SMOKING

Zakharchuk N.V., Nevzorova V.A., Gonchar E.Y.

Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: zaharchuknat@mail.ru

The reorganization of vascular bed of the rats brain in the experimental smoking was investigated. The investigation included 10 Vistar male rats, divided into two groups. The first group was breathing ambient air, and the second group was breathing tobacco smoke for 6 months. The histologic preparations were made after dekapitation of animals. Hematoxylin and eosin stains have been used for recognizing morphologic changes of brain tissue. The brain slices 10 microns thick were evaluated according to distribution density of capillaries and neuroglia cells, Kernogan's index. In the 2<sup>nd</sup> group of the rats there was found decrease in the number of capillaries. Along with it reduction of number of cellular elements in substance of a brain is noted. This is morphologic changes cause increase of vascular resistance and remodeling in arteries walls to what the increased Kernogan's index testifies.

**Keywords:** smoking, brain, vascular remodeling, neuroglia, rats

Согласно данным ВОЗ установлена тесная связь между курением табака и преждевременной смертью более чем 6 миллионов человек в год. Прогнозные исследования свидетельствуют об увеличении до 10% к 2030 году вклада никотин-ассоциированных заболеваний в общую смертность населения стран с различным уровнем экономики. В составе табачного дыма присутствуют около 4000 химических веществ, 250 из которых имеют токсические эффекты, а 50 признаны канцерогенами. Тем не менее наиболее изученным и активно обсуждаемым компонентом табачного дыма является никотин. Реализация эффектов никотина происходит через никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), многочисленные подтипы которых представлены в различных отделах нервной системы.  $\alpha 4\beta 2$ -подтип nAChR рецепторов преимущественно определяется в центральной нервной системе и имеет связь с развитием никотиновой зависимости

[12].  $\alpha 7$ -подтип nAChR рецепторов участвует в обеспечении скорости синаптической передачи, реализации когнитивных функций [7] и наряду с  $\alpha 4\beta 2$ -подтипом обеспечивает процессы вазорегуляции и контрактильной активности миокарда. Помимо присутствия в различных отделах нервной системы экспрессия nAChR установлена в эндотелиоцитах сосудов и направлена на синтез, транспорт и метаболизм ацетилхолина. Предполагается, что эндотелиальный пул nAChR обеспечивает участие никотина в ангиогенезе, эффекты которого зависят от продолжительности воздействия стимула и могут иметь разнонаправленный характер. Так, при краткосрочных эффектах никотина наблюдается усиление процессов неоангиогенеза посредством стимуляции эндотелиальных nAChR. В то же время при длительной стимуляции никотиновых рецепторов в серии экспериментальных исследований у крыс установлено подавление активности

$\alpha$ 7-нАХР, сопровождающееся замедлением процессов неоваскуляризации [8].

Очевидно, что курение является значимым фактором развития эндотелиальной дисфункции и одним из триггеров возникновения патологического каскада, запускающего необратимые процессы морфофункциональных изменений сосудистого русла. В литературе достаточно данных о роли патофизиологических эффектов табачного дыма на организм человека, особенно при развитии онкологических, сердечно-сосудистых и легочных заболеваний. В то же время мало освещен вопрос об изменениях цереброваскулярной системы при табакокурении.

Нам представилось интересным изучение влияния табачного дыма на структурную реорганизацию сосудистого русла головного мозга.

#### Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужили 10 крыс-самцов линии Вистар 8-недельного возраста массой 230–250 г, разделенные произвольно на 2 группы, одна из которых дышала атмосферным воздухом (контрольная группа; 4 крысы), а другую (экспериментальная группа; 6 крыс) – обкуривали табачным дымом. Эксперименты проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 года и ее пересмотренным вариантом от 2008 года. Экспериментальная модель табакокурения выполнена в соответствии с протоколом Н. Zheng и колл. (2009) [9]. Группу крыс-курильщиков помещали в специальную камеру для ингаляции, где они подвергались воздействию табачного дыма в течение 1 часа утром и 1 часа днем, 7 дней в неделю в течение 6 месяцев. Через 6 месяцев животных обеих групп фиксировали и анестезировали путем внутрибрюшинного введения рометара (Xylazinum, «Spora», Praha) в концентрации 5,5 мг/кг. Затем производилась декапитация животных и изготавливались

гистологические препараты головного мозга. Для общеморфологического анализа парафиновые срезы головного мозга толщиной 10 мкм депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике, затем оценивали плотность распределения капилляров на 1 мм<sup>2</sup> (мкм/мм<sup>2</sup>), удельную плотность распределения клеток глии на 1 мкм<sup>2</sup> и индекс Керногана (соотношение толщины стенки артерии к диаметру просвета). Гистологические препараты просматривали в световом микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия). Обработку результатов осуществляли с помощью программ Adobe Photoshop 7.0 и Image J. Достоверность различий между группами (при  $p < 0,05$ ) оценивали с помощью коэффициента Манна – Уитни.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Нами обнаружено, что при длительном табакокурении морфометрические параметры микроциркуляторного русла головного мозга имеют выраженное отличие от группы контроля (рис. 1).

Удельная плотность распределения капилляров на площади в 1 мм<sup>2</sup> при воздействии табачного дыма составила  $115,8 \pm 9,7$  мкм, что было достоверно меньше, чем в контрольной группе, –  $455,4 \pm 18,9$  мкм ( $p < 0,001$ ). Уменьшение количества капилляров может свидетельствовать о нарушении процессов ангиогенеза, который регулируется балансом ангиогенных и ангиостатических факторов. При этом компоненты табачного дыма (никотин, нитрозамины, фенолы, формальдегид и т.д.) могут влиять на ангиогенез посредством стимуляции как ангиогенных, так и ангиостатических факторов.

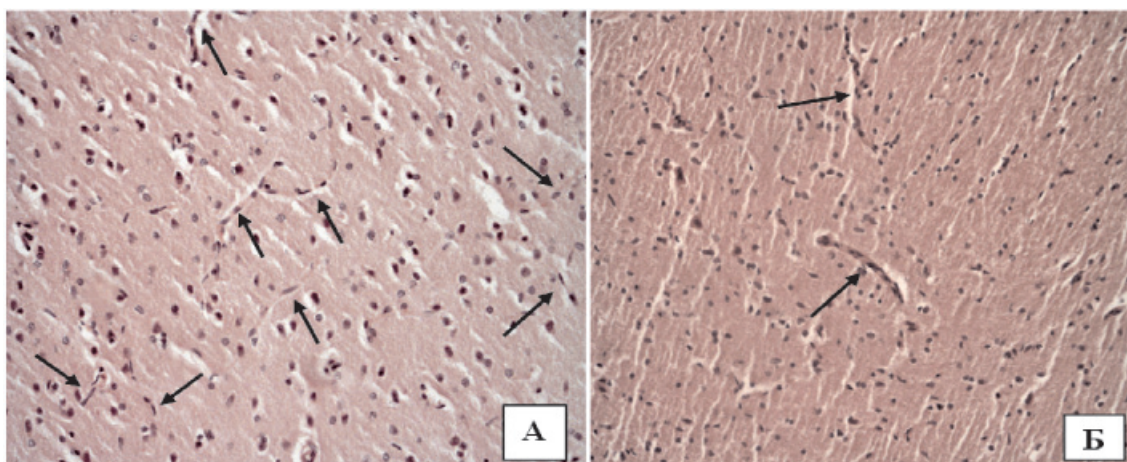


Рис. 1. Распределение капилляров в головном мозге крыс контрольной группы (А) и у животных с моделью хронического табакокурения (Б). Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 20$ ; стрелками указаны капилляры

Большинство публикаций в этой области посвящены влиянию никотина на ангиогенез. Данные литературы говорят о том, что изменения в сосудистом русле зависят от продолжительности курения. Ангиогенный эффект никотина опосредуется эндотелиальными nAHR, наиболее распространенными из которых являются  $\alpha 7$ -nAHR. Указанные рецепторы играют важную роль в ангиогенезе и активируются в эндотелии в условиях гипоксии и ишемии. Известно, что в клинически значимых дозах острое воздействие никотина увеличивает пролиферацию эндотелиоцитов, их миграцию и образование новых капилляров в условиях *in vitro*. Краткосрочная экспозиция никотина у животных *in vivo* усиливает процессы васкуляризации опухолей, неоваскуляризации атеросклеротических бляшек и ангиогенеза сетчатки. По данным Li X.W. и др. активация nAHR может повысить образование капилляров в зоне экспериментального инфаркта миокарда [10]. Напротив, длительное воздействие табачного дыма подавляет капиллярный рост. В серии экспериментов, проведенных Nakuoh Konishi и др., показано, что у животных, подвергавшихся в течение 52 недель воздействию никотина, нарушен эндотелиальный рост сосудистых сегментов аорты. Данный факт авторы связали с угнетением синтеза белков-переносчиков  $\alpha 7$ -nAHR и соответственно подавлением активности рецепторов  $\alpha 7$ -nAHR. Таким образом, «острый ангиогенный эффект» никотина в виде увеличения плотности капилляров утрачивается при его хроническом воздействии [8].

Основной функцией капилляров является обеспечение обмена метаболита-

ми между тканями и кровью. Проявление микрососудистого разрежения, или рарефикации, ухудшает перфузию головного мозга, особенно белого вещества, так как в нём, в отличие от большинства других тканей, отсутствует резерв капилляров, т.е. определенное количество капилляров, потеря которых не отражается на перфузии ткани. В белом веществе также слабо развита система анастомозов между капиллярами [3]. Мы обнаружили, что при длительном курении одновременно с обеднением микрососудистого русла отмечается и уменьшение количества клеточных элементов в веществе мозга, о чем говорит достоверное снижение удельной плотности распределения клеток нейроглии до  $16,9 \pm 1,2$  клеток/мкм<sup>2</sup> по сравнению с группой контроля ( $37,1 \pm 3,4$  клеток/мкм<sup>2</sup>;  $p < 0,01$ ) (рис. 2).

Рарефикацию капилляров и уменьшение клеточных элементов нейроглии следует рассматривать в качестве взаимосвязанных процессов. Уменьшение плотности капиллярного русла значительно снижает доставку кислорода и питательных веществ к тканям с возникновением «энергетического» дефицита, в условиях которого гибнет часть клеток нейроглии. Можно провести параллель между полученными нами результатами в виде потери нейронов и установленным в клинических исследованиях ухудшением когнитивных функций у курящих подростков. Например, у курящих подростков хуже показатели вербальной памяти, устного счета, словарного запаса [4], скорости обработки информации [14] и общий интеллект [15] по сравнению с некурящими сверстниками.

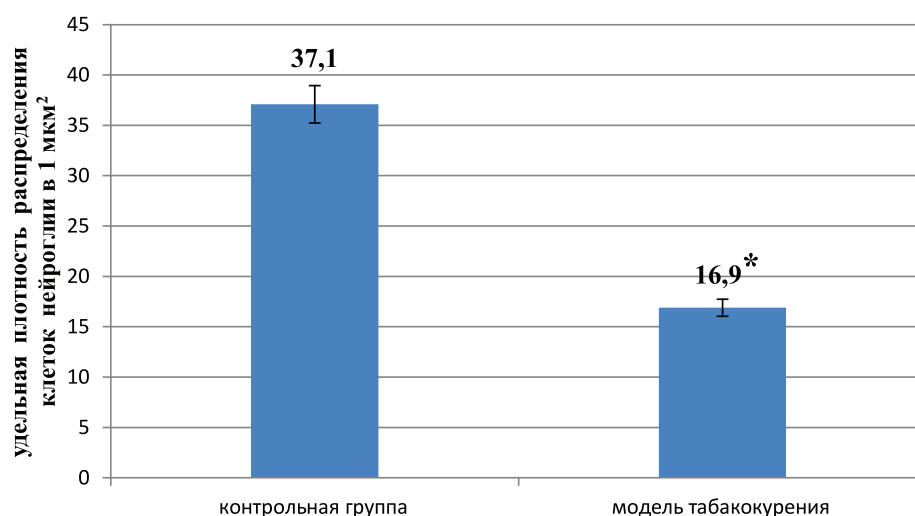


Рис. 2. Удельная плотность распределения клеток нейроглии при экспериментальном моделировании табакокурения (Примечание. \* – различия между группами при  $p < 0,01$ )

Уменьшение плотности капилляров и артериол обуславливает повышение сосудистого сопротивления в данном бассейне и обеднение микрососудистого русла [6]. Росту сосудистого сопротивления могут способствовать и структурные изменения в мелких артериях, которые выражаются в сужении просвета и увеличении соотношения между толщиной стенки и диаметром сосуда в результате гиперплазии и гипертрофии гладких миоцитов. Действительно, согласно полученным нами результатам индекс Керногана (соотношение толщины стенки артерии к диаметру просвета) достоверно выше у животных экспериментальной группы, чем в контроле (соответственно  $1,59 \pm 0,07$  и  $0,98 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 3).

ющему изменению архитектоники артерий и сосудистому ремоделированию концентрического типа, при котором происходит уменьшение просвета сосуда за счет утолщения его мышечного компонента. Данное ремоделирование сосудистой стенки может приводить к нарушению вазомоторных реакций в церебральных артериях [1].

Таким образом, в условиях хронического табакокурения регистрируется изменение градиента ангиогенеза в сторону уменьшения плотности капилляров в головном мозге. Одновременно с этим отмечается снижение количества клеток нейроглии. Обеднение микрососудистого русла может быть одной из причин структурного ремоделирования артерий вследствие повышения сопротивления в данном сосудистом бассейне.

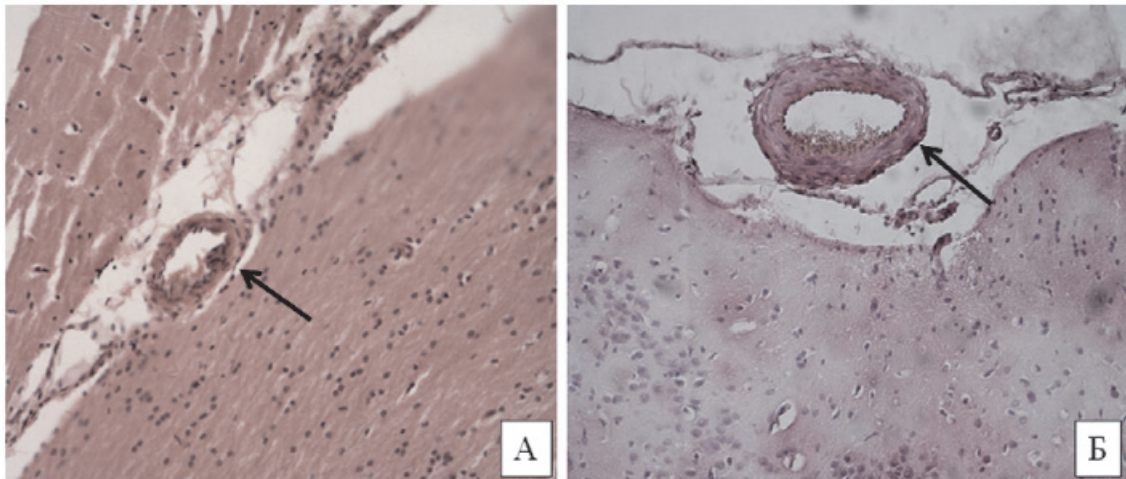


Рис. 3. Артериолы головного мозга у крыс контрольной группы (А) и у животных с моделью хронического табакокурения (Б). Окраска гематоксилином и эозином, ув. x20; стрелками указаны артериолы головного мозга

Артериолы головного мозга, имеющие толстые гладкомышечные стенки, являются резистивными сосудами, способными при сокращении изменять величину просвета, что является основным компонентом регуляции кровоснабжения органов в ответ на гемодинамические стимулы. Главная функция гладкомышечных волокон состоит в создании *активного напряжения* сосудистой стенки (сосудистого тонуса) и в изменении величины просвета сосудов в соответствии с физиологическими потребностями кровоснабжаемой области. При курении в результате вазоспазма происходит сокращение гладких мышц артериол и их радиус уменьшается, за счет чего снижается *напряжение* в стенке. Сначала это служит адаптивным механизмом, однако в дальнейшем при длительном воздействии табачного дыма приводит к стойкому и прогрессиру-

### Список литературы

1. Невзорова В.А., Захарчук Н.В., Агафонова И.Г., Сафафанова Н.С. Особенности развития дисфункции сосудов головного мозга при артериальной гипертензии и табакокурении // Тихоокеан. мед. журн. – 2013. – № 4 (54) – С. 9–16.
2. Bulnes S., Argandona E.G., Bengoetxea H. et al. The role of eNOS in vascular permeability in ENU-induced gliomas // Acta Neurochir. – Suppl 2010. – Vol. 106. – P. 277–282.
3. Feihl F., Liaudet L., Waeber B. et al Hypertension. A disease of the microcirculation? // Hypertension – 2006. Vol. 48. – P.1–7.
4. Fried P.A. Watkinson B., Gray R. Neurocognitive consequences of cigarette smoking in young adults-A comparison with pre-drug performance // Neurotoxicol. Teratol. – 2006. – Vol. 28. – P. 517–525.
5. Furchgott R.F., Vanhoutte P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors // FASEB J. – 1989. – Vol. 3. – P. 2007–2018.
6. Greene A.S., Tonellato P.J., Lui J. et al. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension // Am J Physiol. – 1989. – Vol. 256. – P. 126–131.

7. Hajós M., Hurst R.S., Hoffmann W.E. et al The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – Vol. 312. – P. 1213–1222.
8. Heesch C., Jang J.J., Weis M. et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis // *Nat Med.* – 2001. – № 7. – P. 833–839.
9. Hongao Zheng, Yuening Liu, Tian Huang et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke // *Toxicology Letters.* – 2009. – Vol. 189. – P. 225–234.
10. Li X.W. Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization / Li X.W., Wang H // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 78. – P. 1863–1870.
11. McCarron R.M., Chen Y., Tomori T. et al. Endothelial-mediated regulation of cerebral microcirculation // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 57 (11). – P. 133–144.
12. Neal L. Benowitz. Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2009. – Vol. 49. – P.57–71.
13. Somers M.J., Harrison D.G. Reactive oxygen species and control of vasomotor tone // *Curr Hypertens Rep.* – 1999. – № 1. – P. 102–108.
14. Spilich G.J., June L., Renner J. Cigarette smoking and cognitive performance // *Br. J. Addict.* – 1992. – Vol. 87. – P. 1313–1326.
15. Weiser M., Zarka S., Werbeloff N. et al. Cognitive test scores in male adolescent cigarette smokers compared to non-smokers: A population-based study // *Addiction.* – 2010. Vol. 105. – P. 358–363.
6. Greene A.S. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. Greene A.S., Tonellato P.J., Lui J. et al. *Am J Physiol.* 1989. Vol. 256. pp. 126–131.
7. Hajós M. The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. Hajós M., Hurst R.S., Hoffmann W.E. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005. Vol. 312. pp. 1213–1222.
8. Heesch C. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. Heesch C., Jang J.J., Weis M. et al. *Nat Med.* 2001. no. 7. pp. 833–839.
9. Hongao Zheng. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. Hongao Zheng, Yuening Liu, Tian Huang et al. *Toxicology Letters.* 2009. Vol. 189. pp. 225–234.
10. Li X.W. Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization. Li X.W., Wang H. *Life Sci.* 2006. Vol. 78. pp. 1863–1870.
11. McCarron R.M. Endothelial-mediated regulation of cerebral microcirculation. McCarron R.M., Chen Y., Tomori T. et al. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006. Vol.57 (11). pp. 133–144.
12. Neal L. Benowitz. Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009. Vol.49. pp. 57–71.
13. Somers M.J. Reactive oxygen species and control of vasomotor tone. Somers M.J., Harrison D.G. *Curr Hypertens Rep.* 1999. no. 1. pp. 102–108.
14. Spilich G.J. Cigarette smoking and cognitive performance. Spilich G.J., June L., Renner J. *Br. J. Addict.* 1992. Vol.87. pp. 1313–1326.
15. Weiser M. Cognitive test scores in male adolescent cigarette smokers compared to non-smokers: A population-based study. Weiser M., Zarka S., Werbeloff N. et al. *Addiction.* 2010. Vol. 105. pp. 358–363.

### References

1. Nevzorova V.A., Zakharchuk N.V., Agafonova I.G., Sarafanova N.S. *Pacific Medical Journal.* 2013. no. 4 (54), pp. 9–16.
2. Bulnes S. The role of eNOS in vascular permeability in ENU-induced gliomas. Bulnes S., Argandona E.G., Bengoetxea H. et al. *Acta Neurochir. Suppl* 2010. Vol. 106. pp. 277–282.
3. Feihl F. Hypertension. A disease of the microcirculation? Feihl F., Liaudet L., Waerber B. et al. *Hypertension* 2006. Vol. 48. pp.1–7.
4. Fried P.A. Neurocognitive consequences of cigarette smoking in young adults-A comparison with pre-drug performance. Fried P.A., Watkinson B., Gray R. *Neurotoxicol. Teratol.* 2006. Vol.28. pp. 517–525.
5. Furchgott R.F. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. Furchgott R.F., Vanhoutte P.M. *FASEB J.* 1989. Vol. 3. pp. 2007–2018.

### Рецензенты:

Дубиков А.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской терапии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток;

Котельников В.Н., д.м.н., доцент, руководитель учебного военного центра, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 24.02.2015.