

# **ВАЗОМОТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ЕЁ КОРРЕКЦИЯ**

## Авторы:

- Захарчук Наталья Владимировна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры терапии, функциональной и ультразвуковой диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной подготовки специалистов (кафедра терапии, ФД и УЗД ФПК и ППС) ГБОУ ВПО ВГМУ, e-mail: [zaharchuknat@mail.ru](mailto:zaharchuknat@mail.ru)
- Гончар Елена Юрьевна - аспирант кафедры терапии, функциональной и ультразвуковой диагностики ФПК и ППС ГБОУ ВПО ВГМУ, e-mail: [lav2008elena@yandex.ru](mailto:lav2008elena@yandex.ru)

Источники финансирования: Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по Государственному контракту № 14.740.11.0186 от 15 сентября 2010 года «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ СОСУДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВАЗО- И НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ПРЕПАРАТАМИ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ».

**Актуальность:** Нарушения мозгового кровообращения (НМК) занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности. Разные варианты НМК имеют тесные причинно-следственные связи с такими факторами риска, как артериальная гипертензия (АГ) и атеросклероз.

Церебральное кровообращение координируется физиологической системой, действие которой основано на теории автоматического регулирования. О функциональном состоянии мозгового кровотока свидетельствуют показатели реактивности сосудов, которые определяются с помощью проб на вазодилатацию или констрикцию. В головном мозге основная роль в регуляции динамического равновесия между дилатирующими и констрикторными факторами принадлежит эндотелию

мелких сосудов, где происходят основные изменения в тканевой ренин-ангиотензин-альдостероновой системе . Ангиотензин II стимулирует образование эндотелина и трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ), который в свою очередь повышает уровень оксида азота (NO). При достижении пороговых значений NO далее действует как ингибитор образования TGF- $\beta$  и является физиологическим антагонистом эндотелина. Таким образом, авторегуляция вазодилатации и вазоконстрикции осуществляется через динамическое равновесие NO . При неконтролируемой АГ с одновременным снижением уровня эндотелиального NO повышаются концентрации перекисей липидов,  $O_2^{2-}$ , эндотелина и TGF- $\beta$ . Препараты, подавляющие образование  $O_2^{2-}$  и TGF- $\beta$ , смещают динамическое равновесие в сторону повышения синтеза NO, тем самым проявляя антигипертензивные свойства. Известно, что омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (омега-3 ПНЖК), в частности, эйкозапентаеновая (ЭПК) и докозагексаеновая (ДГК) кислоты, являются биологически активными компонентами . В ряде работ установлено, что ДГК и ЭПК участвуют в купировании аритмии и ишемии, снижают сосудосуживающий ответ в аорте и замедляют развитие гипертонии у спонтанно гипертензивных крыс. Возможно, это объясняется тем, что данные омега-3 ПНЖК снижают уровень ангиотензина II через ингибирование ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), повышают уровень NO и подавляют выброс фактора TGF- $\beta$  в кровяное русло.

АГ ассоциируется с потерей NO-продуцирующей функции эндотелия. В начале нового тысячелетия такими обществами, как American Heart Association/American College of Cardiology и European Society for Cardiology рекомендовано употребление двух омега-3 ПНЖК морского происхождения — ЭПК и ДГК для первичной и вторичной профилактики ССЗ.

**Инновационность:** установлены особенности вазомоторных реакций церебральных артерий методом МРТ-сканирования при проведении проб с вазодилататорами и вазоконстрикторами экспериментальных животных при экспериментальной артериальной гипертензии. Исследована возможность коррекции выявленных нарушений препаратами  $\omega$ -ПНЖК, полученными из сырья акватории Японского моря, в режиме монотерапии и в сочетании с ингибитором АПФ

**Целью** нашего исследования явилось изучение вазомоторной функции эндотелия церебральных сосудов при воспроизведении артериальной гипертензии у крыс и последующей её коррекции с помощью известного антигипертензивного препарата в сочетании с омега-3 ПНЖК.

**Материалы и методы:** Учитывая одинаковые источники формирования виллизиева круга и его топографию у крыс и у человека, а также сопоставимое анатомическое строение, можно считать объективно обоснованным использование данных животных для моделирования

сосудистой патологии головного мозга с последующей экстраполяцией полученных результатов на человека. Объектом исследования послужили 15 крыс-самцов линии Вистар 12-ти недельного возраста массой  $430 \pm 34.7$  гр. (10 крыс - экспериментальная группа; 5 крыс - контрольная), которые содержались в виварии согласно требованиям национального руководства по содержанию и использованию лабораторных животных. Эксперименты проводились в соответствии с Хельсинской декларацией 1975 года и ее пересмотренного варианта 2000г.

Для создания эндотелиальной дисфункции при АГ была воспроизведена модель дефицита NO в организме крыс *in vivo*. При этом животным экспериментальной группы ежедневно вместе с питьевой водой вводили такой блокатор NO-синтазы, как метиловый эфир N-нитро-L-аргинина (L-NAME, Sigma) из расчета дозы 50 мг/кг/сут. Согласно данным литературы представленная модель в течение 8 недель вызывает максимальную блокаду NO-синтазы в сосудах, дефицит NO и, как следствие, стойкую артериальную гипертензию [8]. Развитие АГ контролировали путем измерения АД на хвостовой артерии через 8 недель после введения L-NAME. Затем экспериментальные животные были произвольно разделены на 2 группы по 5 крыс в каждой. Животные 1-ой группы в течение 4 недель получали перорально комбинированный антигипертензивный препарат, содержащий индапамид 0,625 мг и периндоприл аргинин 2,5 мг в одной таблетке («Нолипрел А») в дозе 0,375

мг/кг/сут в комбинации с ЭПК и ДГК в дозе 52 мг/сутки. Животные из 2-ой группы получали перорально только ЭПК и ДГК в той же дозе.

Препарат омега-3 ПНЖК представлял собой очищенные до 95% ЭПК и ДГК в виде натриевых солей в соотношении 1:1, которые были получены из жира печени минтая с начальным содержанием ЭПК – 9,2%, ДГК – 6,1%. Свободные жирные кислоты из рыбного жира были выделены после омыления и концентраты с чистотой 95% получены методом иодлактонизации, ЭПК и ДГК переведены в натриевые соли и растворены в 40% этаноле до конечной концентрации 600мг/мл. Перед введением *per os* исходный раствор натриевых солей был разбавлен в 4 раза физиологическим раствором и разовая доза на одно животное составила 0,35мл, что соответствует 52 мг суммарных ЭПК и ДГК.

Исследуя сосудодвигательную активность, мы оценивали степень изменения диаметра среднемозговых артерий (СМА) крыс до и после введения вазодилататоров и вазоконстрикторов. Изображение СМА получали методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) (рис.1). Эндотелиозависимая вазодилатация (ЭЗВД) была исследована на введение ацетилхолина, эндотелионезависимая вазодилатация (ЭНЗВД) - на введение нитроглицерина, эндотелиозависимая вазоконстрикция (ЭЗВК) - на введение N-монометил-L-аргинина (L-NMMA), эндотелионезависимая вазоконстрикция (ЭНЗВК) - на введение норадреналина. Величину вазомоторной реакции рассчитывали по формуле: ЭЗВД (ЭНЗВД, ЭЗВК,

$ЭНЗВК) = (d_2 - d_1 / d_1) \times 100\%$ ; где ЭЗВД, ЭНЗВД, ЭЗВК, ЭНЗВК - величина вазомоторной реакции артерии при соответствующей пробе,  $d_1$  - исходный диаметр сосуда,  $d_2$  - диаметр сосуда после соответствующей пробы. За нормальный уровень ЭЗВД принимали увеличение диаметра аорты на 10 % и более от исходного, за нормальный уровень ЭНЗВД – прирост более 15 % от исходного. Меньшая степень вазодилатации или вазоконстрикция считается патологической реакцией. МРТ сосудов головного мозга выполняли на томографе для экспериментальных исследований «PharmaScan US 70/16» (Bruker, Германия). За 15 минут до проведения МРТ животных обездвигивали раствором рометара (Xylazinum, “Spora”, Praha) в дозе 5,5 мг/кг и раствором реланиума 37 мг/кг внутривенно. Затем проводили МРТ-сканирование и измеряли диаметр СМА на томограммах. Далее вводили вышеуказанные вазодилататоры и вазоконстрикторы, затем вновь сканировали сосуды и оценивали степень изменения их диаметра.

Исследование вазомоторных реакций проводили до начала эксперимента, затем через 8 недель на фоне сформировавшейся АГ, а также через 4 недели после лечения.

Результаты обрабатывали при помощи пакета программ "STATISTICA" (StatSoft, Inc., США), используя для сравнения между группами непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми и достоверными считали различия при уровне  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Спустя 8 недель введения L-NAME показатели АД достигли максимальных значений (табл. 1).

**Таблица 1.**

**Показатели АД при моделировании АГ и на фоне терапии**

Показатель	Контроль- ная группа (n=5)	Экспериментальная группа (n=10)		
		На фоне введения L- NAME (модель АГ до лечения)	Через 4 недели терапии	
			нолипрел А + ПНЖК	ПНЖК
САД, мм рт.ст.	123,9±9,9	182,13±13,4	127,4±8,9*	144,2±7,6*#
ДАД, мм рт.ст.	76,8±5,6	111,9±4,4	80,9±6,1*	82,3±5,1*
Примечание: n – количество животных, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; * - различия достоверны в группе экспериментальных животных до и после лечения при $p < 0,05$ ; # - различия достоверны между контролем и экспериментальной группой после лечения при $p < 0,05$ .				

При оценке вазомоторных реакций была выявлена дисфункция сосудов церебрального бассейна у животных с АГ (табл. 2).

Таблица 2.

**Вазомоторная функция церебральных артерий у крыс при  
моделировании АГ и на фоне лечения**

Показатель	Контрольная группа (n=5)	Экспериментальная группа (n=10)		
		На фоне введения L- NAME (модель АГ до лечения)	Через 4 недели терапии	
			нолипрел А + ПНЖК	ПНЖК
ЭЗВД, %	+11,89±0,98	+6,87±0,88*	+9,93±0,67#	+7,11±0,48
ЭНЗВД, %	+17,84±1,25	+7,93±0,53*	+11,25±0,99#	+8,18±0,59
ЭЗВК, %	- 7,9 ±0,14	-1,58±0,15*	-10,59±0,95#	-3,91±0,24#
ЭНЗВК, %	- 5,4 ±0,12	-3,17±0,12*	-7,94±0,52#	-2,13±0,19
<b>Примечание:</b> n – количество животных; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; * - различия достоверны между группой контроля и моделью с АГ при $p < 0,05$ ; # - различия достоверны в экспериментальной группе до и после лечения при $p < 0,05$ .				

При этом проведенные фармакологические тесты выявили достоверные различия вазомоторных реакций СМА у крыс контрольной и экспериментальной групп. Так, у здоровых животных данные тесты вызвали ожидаемую эндотелио-зависимую и -независимую вазодилатацию, свидетельствуя о сохранности как NO-синтазного, так и гуанилатциклазного механизма дилатации. Для оценки NO-синтазного механизма, реализация которого связана с эндотелиозависимыми реакциями, был использован ацетилхолин, чей эффект напрямую зависит от функциональных свойств эндотелия. При АГ стимуляция ацетилхолином вызывает увеличение диаметра артерий на  $6,87 \pm 0,88\%$  (в норме более 10%), что свидетельствует о недостаточной вазодилатации. В



норме ацетилхолин усиливает активность эндотелиальной NO-синтазы, действуя непосредственно на рецепторы эндотелиоцитов, вызывает стимулированную секрецию NO и, как следствие, эндотелиозависимую вазодилатацию. При воспроизведении L-NAME индуцированной модели АГ происходит ингибирование эндотелиальной NO-синтазы и при введении ацетилхолина происходит «конкурентная борьба» на рецепторах эндотелиоцитов между данными веществами. Как видно из результатов нашего эксперимента, L-NAME снижает активность эндотелиальной NO-синтазы, вследствие чего стимуляция ацетилхолином не вызывает адекватной вазодилатации.

Молекула NO<sup>-</sup> является высокоактивным радикалом, поэтому она может легко проникать в миоциты сосудов и без участия каких-либо рецепторов активировать внутриклеточную гуанилатциклазу, в результате чего в клетке повышается содержание гуанозинмонофосфата, что вызывает релаксацию гладкомышечных клеток и реализацию эндотелионезависимых реакций. Для их оценки мы использовали нитроглицерин, при стимуляции которым увеличение диаметра артерий у экспериментальных животных так же было ниже нормы. Недостаточная активность гуанилатциклазного механизма может быть связана с морфологическими изменениями артерий вследствие феномена ремоделирования при АГ, а именно, в результате реорганизации структуры артериальной стенки за счет пролиферации миоцитов и эластических

волокон в средней и внутренней оболочках сосуда (мышечно-эластичная гиперплазия). При проведении констрикторных тестов у животных контрольной группы при введении L-NMMA и норадреналина наблюдается ожидаемая вазоконстрикция. У крыс экспериментальной группы на фоне АГ эти же стимулы не вызывают адекватной сосудосуживающей реакции. Известно, что L-NMMA является прямым ингибитором эндотелиальной NO-синтазы и непрямым ингибитором индуцибельной NO-синтазы. Его введение позволяет снизить выработку NO эндотелиоцитами и выключать NO-зависимую дилатацию сосудов, обеспечивая сужение сосудов. Происходящая в ответ на введение L-NMMA недостаточная вазоконстрикция при АГ ( $\Delta \text{ЗВК}_{\text{АГ}} -1,58 \pm 0,15\%$ ) может быть связана с угнетением NO-синтазных механизмов в эндотелии сосудов и, соответственно, с исчезновением точки приложения для реализации эффектов L-NMMA.

Через 4 недели после формирования АГ мы изучили антигипертензивный эффект вышеуказанных препаратов. Крысы, получающие комбинацию индапамида и периндоприла аргинина в сочетании с ЭПК+ДГК, достигли целевых цифр систолического и диастолического АД, сопоставимых с группой контроля (табл. 1). У крыс, получавших только ЭПК+ДГК, отмечено недостаточное снижение систолического АД и достоверное снижение диастолического АД сопоставимое с контролем. Антигипертензивное действие обусловлено

тем, что омега-3 ПНЖК, как показано в ряде работ, способны ингибировать АПФ и, тем самым, угнетать активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, снижая АД. Одновременно со снижением АД отмечено улучшение эндотелиальной функции СМА на фоне обоих вариантов терапии. Комбинация индапамида и периндоприла аргинина в сочетании с ЭПК+ДГК восстанавливает сосудодвигательную активность СМА, достоверно улучшая реакции дилатации и констрикции (табл. 2). Использование данного комбинированного антигипертензивного препарата для улучшения эндотелиальной дисфункции имеет определенные теоретические предпосылки. Периндоприл за счет блокады АПФ приводит к снижению синтеза такого вазоконстриктора, как ангиотензин II. Также за счет подавления активности АПФ замедляется деградация брадикинина и повышается его содержание. Это стимулирует выработку простагландинов  $I_2$  и  $E_2$ , которые сами обладают вазодилатирующим действием, а также опосредованно увеличивают уровень NO. Индапамид оказывает прямое вазодилатирующее действие за счет увеличения синтеза эндотелиального простациклина и повышения NO.

В данной работе исследовали влияние препарата содержащего в равных соотношениях высокоочищенные ЭПК и ДГК на эндотелиальную дисфункцию при АГ (табл. 2). При таком варианте терапии улучшаются, хотя и недостоверно, процессы вазодилатации, а также отмечается достоверное влияние омега-3-ПНЖК на механизмы вазоконстрикции.

Такая тенденция связана с тем, что омега-3 ПНЖК увеличивают образование NO<sup>-</sup> эндотелиальными клетками через различные биохимические механизмы. Омега-3 ПНЖК являются ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы и подобно статинам, обладают во многом аналогичными свойствами, такими как, угнетение синтеза IL-6 и TNF- $\alpha$  и усиление синтеза NO<sup>-</sup> эндотелиальными клетками. Еще одна возможность ЭПК и ДГК состоит в том, что они включаются в фосфолипидную фракцию клеточной мембраны, замещая другие ПНЖК, и изменяют клеточные функции, в том числе эйкозаноидной системы. Это ведет к увеличению синтеза NO и снижению триглицеридов, проатерогенных цитокинов и факторов роста. В свою очередь, NO<sup>-</sup> вступая в реакцию с омега-3 ПНЖК образуют нитролипиды, которые также способствуют вазодилатации, угнетают образование супероксидных радикалов, предотвращают агрегацию тромбоцитов и развитие атеросклероза.

Таким образом, омега-3 ПНЖК ингибируют синтез ангиотензина-II подобно АПФ, регулируют активность ренина, увеличивают синтез NO и участвуют в образовании таких биологически активных молекул, как простагландины, что позволяет говорить о них как об эндогенном регуляторе сосудистого тонуса.

**Выводы:** в результате нашего исследования установлено, что моделирование L-NAME индуцированного дефицита NO вызывает стойкое повышение АД и, как следствие, нарушение вазомоторной функции

эндотелия церебральных сосудов из-за недостаточной активности вазодилататорного звена. Представленные варианты терапии обладают гипотензивным эффектом и улучшают вазомоторную функцию эндотелия. При этом фиксированная комбинация периндоприла и индапамида в сочетании с препаратами омега-3 ПНЖК (ЭПК+ДГК) достоверно снижает как систолическое, так и диастолическое АД до целевых цифр и улучшает вазодилататорный резерв в церебральных сосудах. В то время, как монотерапия ЭПК+ДГК достоверно снижает диастолическое АД, улучшает вазодилатацию и восстанавливает процессы эндотелиозависимой вазоконстрикции.

### **Профильные публикации:**

1. Возможности коррекции эндотелиальной дисфункции церебральных артерий и аорты в условиях моделирования экспериментальной артериальной гипертензии.( тезисы). Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых « Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии», Томск, 2013г, стр.40. Невзорова В.А, Захарчук Н.В., Гончар Е.Ю., Агафонова И.Г., Латышев Н.А., Касьянов С.В.

2. Возможности коррекции дисфункции аорты при экспериментальной артериальной гипертензии. ( тезисы) Тез.докл. XIV

Тихоок. научно-практич. конф. студентов и молодых ученых медиков с международ. участием. – Владивосток. – 2013. - с. 150-151. Невзорова В.А, Захарчук Н.В., Гончар Е.Ю., Агафонова И.Г., Латышев Н.А., Касьянов С.В.

3. Вазомоторная активность аорты в условиях моделирования хронического табакокурения. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, издательство Российской академии медицинских наук, Москва, Т155 N3, стр.275-276. Невзорова В.А,

Гончар Е.Ю., Захарчук Н.В., Агафонова И.Г.