

ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ РГПУ-195 У ЖИВОТНЫХ С ОВАРИОЭКТОМИЕЙ И ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Е. В. Волотова¹ ✉, Е. Е. Абросимова^{2, 3}, Н. С. Ковалев³,
В. Э. Пустынников⁴, Е. А. Фомичев⁵, Т. М. Андриаишвили⁶, А. А. Соколова⁷

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии и фарма-
ции Института НМФО, Волгоград, Россия

¹✉ a-zlato@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3916-7249>

Аннотация. Эндотелий принимает важное участие в поддержании гомеостаза головного мозга, а также является важнейшим патогенетическим звеном при острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения. Метаболизм оксида азота обеспечивает реализацию важнейших физиологических реакций сосудов, а его нарушения являются причиной и/или следствием патологического процесса, тяжесть которого зависит от выраженности нарушения секреции оксида азота. Эстрогены принимают важное участие в поддержании гомеостаза оксида азота. Эндотелио- и церебропротективные свойства ГАМК хорошо известны, в связи с чем в данной работе проведено исследование эндотелио- и церебропротективных свойств нового производного ГАМК соединения РГПУ-195 (β -пиримидин ГАМК).

Ключевые слова: эндотелий, оксид азота, ГАМК, крысы

Для цитирования: Эндотелиопротективное действие соединения РГПУ-195 у животных с овариоэктомией и фокальной ишемией головного мозга / Е. В. Волотова, Е. Е. Абросимова, Н. С. Ковалев [и др.] // Лекарственный вестник. 2022. Т. 23, № 1. С. 55–60.

Установлено, что у мужчин сердечно-сосудистые заболевания развиваются в более раннем возрасте по сравнению с женщинами. Однако после достижения менопаузы, частота встречаемости кардиоваскулярных патологий у женщин быстро растёт, опережая мужчин. Известно, что эстрогены, влияя на эндотелий мозговых сосудов, активируют эндотелиальную нитрооксидсинтазу (NOS), увеличивают продукцию NO и других эндотелийзависимых вазодилататоров, препятствуя действию вазоконстрикторов, подавляет синтез PGE₂ в сосудах мозга при ишемии. Эстрогены активируют экспрессию гена эндотелиальной нитрооксидсинтазы (eNOS) и экспрессию кальмодулина в сосудах, который потенцирует кальций-зависимую активацию eNOS и, соответственно, повышает продукцию оксида азота, играющего ключевую роль в обеспечении вазодилатирующей, антиромботической, противовоспалительной, антипролиферативной функции эндотелия [1, 2].

Острые и хронические нарушения мозгового кровообращения в своей основе имеют множество патогенетических факторов. Поэтому для коррекции НМК предпочтительны препараты с политаргетным действием.

В связи с этим в качестве основы среди множества химических веществ предпочтение может быть отдано производным ГАМК, которые характеризуются мультитаргетным действием, подавляют глутаматно-кальциевый каскад, улучшают вазодилатирующую и антиромботическую функцию эндотелия, обладают противовоспалительным, антигипоксическим и антиоксидантным действием [3, 4].

В результате скрининга различных производных ГАМК с гетероциклическими и ароматическими заместителями было выявлено соединение РГПУ-195 (β -пиримидин ГАМК), обладающее нейропротективным действием при необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Цель работы

Изучить эндотелиопротективное действие соединения РГПУ-195 у животных с овариоэктомией и фокальной ишемией головного мозга.

Методика исследования

Исследование проведено на 5–6-месячных крысах самках (питомник «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН (Московская обл.), которые содержались с учетом правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), содержащихся в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Эксперименты проводились в соответствии с ГОСТом Р 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом.

Метод моделирования дефицита половых гормонов

Недостаточность половых гормонов (НПГ), как экспериментальная модель ЭД, вызывалась путем экстирпации матки с придатками у 70 самок крыс, массой 250–280 г, в возрасте 5–6 месяцев. Все операции в исследовании проводили под общей анестезией (хлоралгидрат внутривенно в дозе 400 мг/кг). Животным после операции был проведен курс антибиотикотерапии (цефазолин 10 мг/кг внутримышечно) в течение 10 дней. Группам интактных и ЛО животных вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме.

У самок на протяжении эстрального цикла наблюдается варьирование активности различных звеньев регуляции кровообращения.

Наиболее стабильны фазы диэструса и эструса, хотя и представляют собой противоположные звенья адаптивности: диэструс – уровень эффективной адаптации и синхронизации всех ступеней регуляции кровообращения, эструс – состояние нестабильности или неустойчивости регуляторных систем. Поэтому у групп ложнопериовариованных и интактных самок доплерографическое исследование выполнялось только в фазу диэструса (определяли цитологически), когда колебания гормонального фона минимальны.

Метод моделирования фокальной ишемии головного мозга, вызванной необратимой окклюзией средней мозговой артерии

Моделирование фокальной ишемии головного мозга у наркотизированных крыс производили через 30 дней после экстирпации матки и яичников методом необратимой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) путем внутрисосудистого введения нейлоновой нити через внутреннюю сонную артерию на глубину перекрывающую устье отхождения средней мозговой артерии [4].

Регистрации уровня локального мозгового кровотока методом ультразвуковой доплерографической флоуметрии

Уровень мозгового кровотока (МК) животных определяли с помощью ультразвуковой флоуметрии на доплерографе «Минимакс-Допплер-К» (ООО «СП-Минимакс», г. Санкт-Петербург), с использованием датчика с рабочей частотой в 25 Гц. Датчик доплерографа фиксировался в стереотаксической установке, мозговой кровотоки животных регистрировались в проекции средней мозговой артерии. Доступ к артерии создавался следующим образом: наркотизированному животному (хлоралгидрат 400 мг/кг) с использованием депиляционного крема с верхней поверхности черепа удалялся шерстяной покров. Далее с учетом стереотаксических координат, началом которых принималась точка bregma, определялось место трепанационного отверстия. Трепанация производилась бором с конической фрезой, до твердой мозговой оболочки. В качестве контактной среды использовался гель для проведения УЗИ.

Метод оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов головного мозга

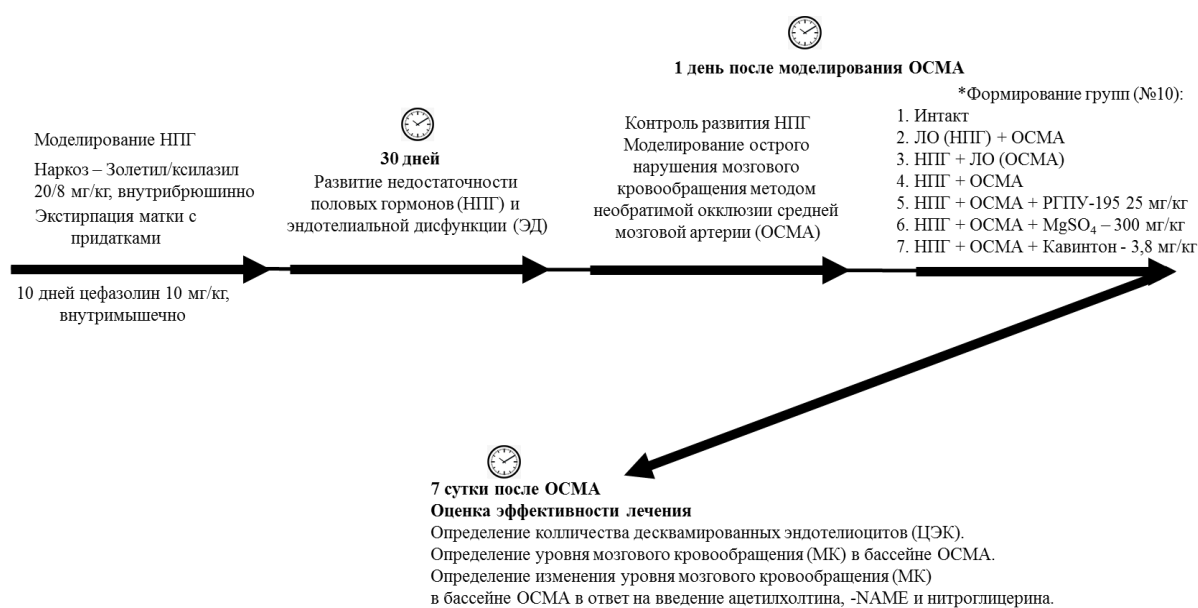
Для оценки исходного мозгового кровотока и вазодилатирующей, и антитромботической функции эндотелия мозговых сосудов использовался комплексный методический подход, предложенный И. Н. Тюренковым, А. В. Воронковым (2008), который заключался в определении изменений уровня мозгового кровотока в ответ на введение различных модификаторов синтеза эндогенного оксида азота (NO). Используемые нами модуляторы системы NO вводились внутривенно, в следующей последовательности: ацетилхолин (0,01 мг/кг, Acros organics,

США); нитро-L-аргинин (10 мг/кг, Acros organics, США). Для оценки эндотелийнезависимой вазодилатации (ЭНВД) вводили нитроглицерин (0,007 мг/кг, МТХ, Москва). По увеличению или уменьшению МК в процентах по отношению к исходному судили, соответственно, о расширении или сужении просвета сосудов, а также о стимулируемой и базальной продукции NO и, соответственно, состоянии вазодилатирующей функции эндотелия [5].

Количество десквамированных (циркулирующих) эндотелиальных клеток в крови определяли методом, который основан на изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами с по-

следующим их осаждением при внесении АДФ. После взятия кровь центрифугировали в течение 10 мин при 200 g, затем плазму смешивали с раствором натриевой соли аденозиндифосфата (АДФ-Na). В течение 10 мин аккуратно перемешивали, путем встряхивания пробирки и повторно центрифугировали для осаждения эндотелиальных клеток.

Полученный в результате осадок суспендировали в растворе NaCl. В камере Горяева подсчитывали количество эндотелиоцитов в 2 сетках камеры методом фазово-контрастной микроскопии, полученный результат умножали на 10^4 /л (рис 1).



Первое введение исследуемого соединения и препаратов сравнения осуществляли после выхода животных из наркоза. Исследуемое соединение и препараты сравнения животным вводили в течение 7 дней (1 раз в сутки, внутривенно). Животным первых 4 групп вводили физиологический раствор из расчёта 0,1 мл /100 г массы

Рис. 1. Дизайн исследования

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка эндотелиальной дисфункции у животных с экспериментально вызванной недостаточностью половых гормонов

Через 28 дней после экстирпации половых органов у всех животных отбирали кровь для определения количества десквамированных эндотелиоцитов, повышение концентрации которых является высокоспецифичным маркером эндотелиальной дисфункции [6]. Состояние эндотелийзависимой вазодилатации оценивали по изменению мозгового кровотока после введения модификаторов синтеза эндогенного ок-

сида азота ацетилхолина, нитро-L-аргинин, а эндотелийнезависимой вазодилатации по изменению МК после введения нитроглицерина. Все полученные показатели у крыс, перенесших оперативное вмешательство, сравнивались с группой ЛО животных, которые подвергались введению наркоза, вскрытию брюшной полости с последующим ее ушиванием, но без удаления матки и придатков.

У животных с недостаточностью половых гормонов количество циркулирующих эндотелиоцитов было в 1,9 раза больше, чем у ложнооперированных животных ($p < 0,05$; рис. 2А).

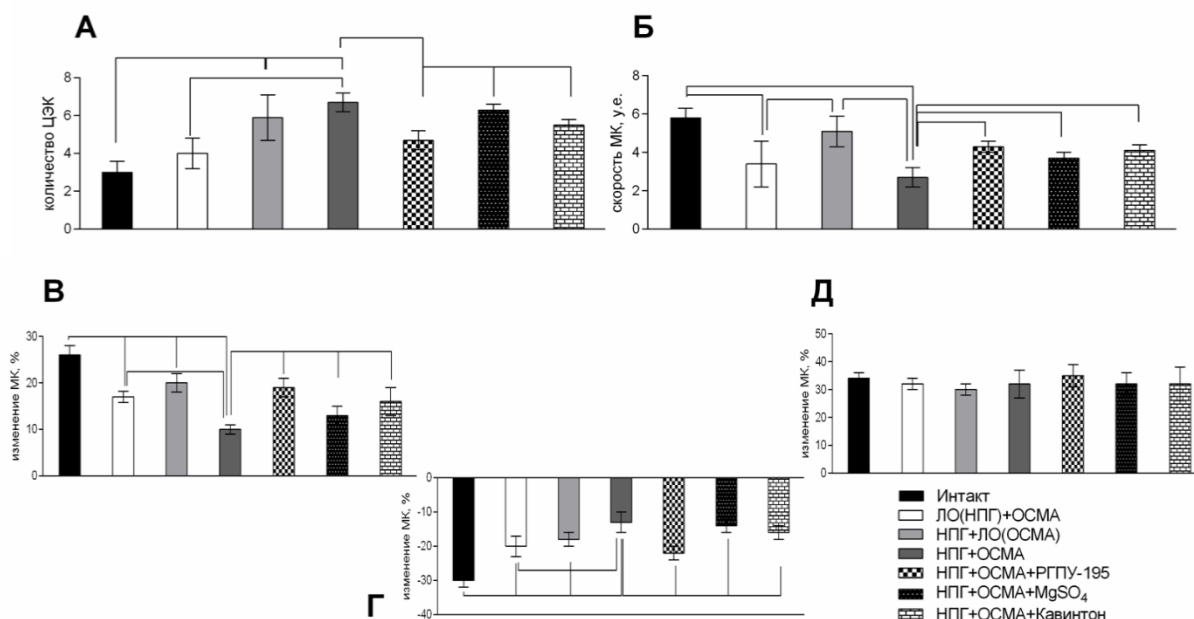


Рис. 2. Количество циркулирующих эндотелиоцитов (А), уровень мозгового кровотока в проекции окклюзированной средней мозговой артерии (Б), изменение мозгового кровотока в ответ на введение ацетилхолина (В), L-NAME (Г) и нитроглицерина (Д) у животных с НПГ и/или ОСМА и которым в течение 7 дней вводили РГПУ-195 или референтные препараты – сернокислую магнезию и кавинтон: ЛО – ложно оперированные животные; НПГ – группа животных с недостаточностью половых гормонов; ОСМА – группа животных, которым моделировали окклюзию средней мозговой артерии; ЦЭК – циркулирующие эндотелиальные клетки; МК – мозговой кровоток; линиями соединены статистически достоверные отличия при $p < 0,05$

Уровень кровотока в проекции средней мозговой артерии у самок с НПГ статистически не значимо был меньше, чем у ЛО животных. После ОСМА кровотоки в проекции средней мозговой артерии у животных были ниже, чем у интактных в 1,4 раза, а у животных с НПГ и ОСМА меньше в 3 раза (рис. 2 Б). Мозговой кровотоки у животных с ОСМА и НПГ, которым в течение 7 дней вводили соединение РГПУ-195, были статистически значимо выше, чем у животных, которым вводили плацебо. Классическим маркером эндотелиальной дисфункции является ослабление сосудорасширяющей реакции на введение ацетилхолина или её извращение. Сопоставляя полученные эффекты на животных с ОСМА и ЛО, мы можем судить об эндотелийзависимой вазодилатации и выраженности ЭД. Реакции на введение модификаторов синтеза оксида азота у животных с НПГ были значительно меньше, чем у интактных. Введение ацетилхолина ЛО крысам вызывало достоверное повышение мозгового кровотока в среднем на 36,4 % по отношению к начальным значениям, тогда как у животных с НПГ эта реакция составила 19,3 %. При введении нитро-L-аргинина

животным группы ЛО наблюдалось снижение МК от начального уровня на 24,7 %, а у животных с НПГ только на 9,95 % (рис. 2 Г). Введение прямого донатора NO-нитроглицерина приводило к сопоставимому увеличению МК у ложно оперированных и животных с НПГ (рис. 2Д).

Дополнительным тестом, отражающим базальный синтез NO эндотелием и ЭД, является реакция мозговых сосудов на введение нитро-L-аргинина. Сопоставляя изменения кровотока в ответ на введение нитро-L-аргинина (ингибитора NO-синтазы), т. е. ответ на блокаду eNOS, животных опытной и контрольных групп (ЛО и контроль-ишемия), мы можем судить о базальной продукции NO эндотелием, чем больше падение кровотока в ответ на введение нитро-L-аргинина, тем выше уровень базальной продукции NO, и наоборот.

На введение ацетилхолина у животных, которым вводили соединение РГПУ-195 и препараты сравнения кавинтон и MgSO₄, наблюдалось повышение МК на 19, 15 и 12 % соответственно (рис. 2 В), а на введение L-NAME – падение кровотока на 22, 10 и 13 % соответственно, что свидетельствует о более высокой

эндотелийзависимой вазодилатации и более высоким потенциале увеличения стимулируемой и базальной выработки NO, чем у животных контрольной группы.

Для оценки эндотелинезависимой вазодилатации (ЭНВД) использовался нитроглицерин, как донатор NO, позволяющий оценить чувствительность сосудов к NO (рис. 2Г).

Введение нитроглицерина ЛО животным и крысам с НППГ и ОСМА приводило к сопоставимому увеличению церебрального кровотока, что свидетельствует о сохранении чувствительности сосудов к NO.

Полученные результаты, такие как количество десквамированных эндотелиоцитов, выраженность реакций на введение модификаторов выработки оксида азота, дают возможность считать, что соединение РГПУ-195 у животных с недостаточностью половых гормонов и ОСМА оказывает более выраженное эндотелиопротективное действие, чем препарат сравнения кавинтон. Серноокислая магнезия по влиянию на МК и эндотелийзависимую вазодилатацию значительно уступало кавинтону и ещё в большей степени соединению РГПУ-195.

Результаты, полученные в ходе выполнения нашего исследования, в большей мере могут транслироваться в клинику, т. к. в реальной практике часто ОНМК развиваются у женщин в постменопаузе, т. е. на фоне НППГ и эндотелиальной дисфункции.

Такие данные позволяют говорить о выраженной ЭД у животных с НППГ. Значительное увеличение числа десквамированных эндотелиоцитов в сочетании с выраженным снижением базальной и стимулируемой продукции NO, вызванной недостаточностью половых гормонов, свидетельствует о роли эстрогенов в регуляции эндотелиальной функции, считая её маркером сосудистого здоровья, предиктором атеросклероза и различных сердечно-сосудистых осложнений.

Известно, что половые гормоны и в большей степени эстрогены оказывают влияние на МК, в значительной степени вследствие активации эндотелиальной нитрооксидсинтазы и увеличения продукции оксида азота. Поэтому можно предположить, что увеличение кровото-

ка у животных с НППГ и ОСМА под влиянием исследуемых веществ обусловлено улучшением эндотелиальной функции и в первую очередь эндотелийзависимой вазодилатации. Рецепторы эстрогена определяются в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов. Эстрогены, взаимодействуя с эстрогеновыми рецепторами 2-го типа, на эндотелиальных клетках активируют выработку оксида азота, эндотелиального фактора гиперполяризации и простаглицлина. Это действие связано с активирующим действием эстрогена на экспрессию гена eNOS и прямым стимулирующим действием на фосфорилирование этого фермента. Установлено, что ГАМК и её производные подавляют оксидативный стресс, улучшают митохондриальное дыхание, снижают апоптоз эндотелиоцитов и стимулируют регенерацию. Половые стероидные гормоны улучшают восстановление эндотелия и восстанавливают нарушенную эндотелиальную функцию [7, 8].

Заключение

В нашем исследовании мы также видим значительно большее число десквамированных эндотелиоцитов у животных после экстирпации матки и яичников.

Вместе с этим у животных с НППГ мы зарегистрировали значительное снижение стимулированной и базальной продукции оксида азота, и эндотелийзависимой вазодилатации.

Более значительное снижение мозгового кровотока у животных с НППГ и падение эндотелийзависимой вазодилатации в ответ на введение ацетилхолина можно объяснить сильным прямым влиянием эстрогенов на выработку и высвобождение оксида азота из эндотелиоцитов при активации рецепторов эстрогенов 2-го типа. После менопаузы наблюдается снижение экспрессии eNOS на эндотелиальных клетках и ответа рецепторов эстрогена 2-го типа.

В условиях гипоестрогениндукцированной эндотелиальной дисфункции у животных, которым вводили соединение РГПУ-195 число десквамированных эндотелиоцитов было меньше, уровень мозгового кровотока, стимулированная и базальная секреция оксида азота выше, что свидетельствует о выраженном эндотелиопротективном действии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Stanhewicz A. E., Wenner M. M., Stachenfeld N. S.* Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018. Vol. 315(6). P. H1569–H1588.
2. Cardiovascular health and the menopausal woman: the role of estrogen and when to begin and end hormone treatment / F. Naftolin [et al.] // *F1000Res.* 2019. No. 8. P. F1000.
3. Нейропротекторное действие фенибута и нейроглутама при экспериментальной ишемии головного мозга на фоне измененной иммунореактивности / Е. В. Вологова [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2016. Т. 79, № 4. С. 18–25.
4. Нейропротекторное действие нейроглутама в условиях активации свободно-радикального окисления / И. Н. Тюренков [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2014. Т. 77, № 8. С. 16–19.
5. Гиполипидемическое, антиоксидантное и эндотелиопозитивное действие нового агониста рецептора GPR 119 соединения ZB-16 при экспериментальном сахарном диабете / И. Н. Тюренков [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2017. Т. 80, № 1. С. 18–23.
6. *Hladovec, J.* Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions // *Physiologia bohemoslovaca.* 1977. Vol. 27, № 2. P. 140–144.
7. *Morley Kotchen J., Kotchen T. A.* Impact of female hormones on blood pressure: review of potential mechanisms and clinical studies // *Curr Hypertens Rep.* 2003. Vol. 5(6). P. 505–512.
8. *Улубиева Е. А., Автандилов А. Г.* Влияние возраста, курения на эндотелиальную функцию у женщин // *Проблемы женского здоровья.* 2015. Т. 10, № 2. С. 47–54.

Информация об авторах

Вологова Елена Владимировна – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и фармации Института НМФО Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, Россия, a-zlato@mail.ru

Абросимова Елизавета Евгеньевна – аспирант кафедры фармакологии и фармации Института НМФО Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, Россия, abrosimova.volgmed@gmail.com

Ковалев Николай Сергеевич – аспирант кафедры фармакологии и фармации Института НМФО Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, Россия, kovalev.volgmed@gmail.com

Пустынников Владислав Эдуардович – студент-исследователь, кафедра фармакологии и фармации Института НМФО Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, Россия, Pustynnikov200122@gmail.com

Фомичев Евгений Андреевич – студент-исследователь, кафедра фармакологии и фармации Института НМФО Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, Россия, FomichevVSMU@gmail.com

Андриашвили Тамара Мамукаевна – студент-исследователь, кафедра фармакологии и фармации Института НМФО Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, Россия, tatuna.andriashvili@yandex.ru

Соколова Алина Андреевна – студент-исследователь, кафедра фармакологии и фармации Института НМФО Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, Россия, chudi.lis.14@gmail.com

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 10.02.2022; одобрена после рецензирования 14.02.2022; принята к публикации 18.02.2022