

# ТЕЧЕНИЕ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ЖИВОТНЫХ С НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ

УДК 616.831-005.4-092.4+616-018.74-092.4  
<https://doi.org/10.7816/RCF17157-64>

© И.Н. Тюренков, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград

Для цитирования: Тюренков И.Н., Волотова Е.В., Куркин Д.В., Бакулин Д.А. Течение ишемии головного мозга у животных с недостаточностью половых гормонов и эндотелиальной дисфункцией // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 57–64. <https://doi.org/10.7816/RCF17157-64>

Поступила: 15.01.2019

Одобрена: 14.02.2019

Принята: 18.03.2019

**Цель исследования** — оценка влияния эндотелиальной дисфункции, вызванной снижением уровня эстрогенов после экстирпации матки на течение ишемии головного мозга. **Методы.** Эндотелиальная дисфункция вызывалась экстирпацией матки с придатками и подтверждалась подсчетом циркулирующих эндотелиальных клеток и оценкой стимулированной и базальной секреции оксида азота. Фокальная ишемия головного мозга моделировалась интравазальной окклюзией средней мозговой артерии. Тяжесть ишемии оценивалась по шкалам неврологического дефицита (Combs & D'Alecy и McGraw), в тесте Ротарод и по объему некроза. **Результаты.** Моделирование недостаточности половых гормонов у самок через 28 дней привело к повышению содержания циркулирующих эндотелиальных клеток на 88 %, а также снижению стимулированной и базальной секреции оксида азота соответственно на 17,1 и 14,7 % относительно группы ложно оперированных животных. Моделирование фокальной ишемии голов-

ного мозга у животных с эндотелиальной дисфункцией, вызванной недостаточностью половых гормонов, приводило к значительным повреждениям центральной нервной системы, что выражалось в повышении уровня неврологического дефицита по шкалам Combs & D'Alecy и McGraw в течение 7 дней, снижению времени удержания на вращающемся стержне на 32 %, а также увеличению зоны некроза головного мозга на 89 % относительно группы животных без недостаточности половых гормонов. **Заключение.** Показано, что эндотелиальная дисфункция, обусловленная моделированием недостаточности половых гормонов, осложняет течение ишемии головного мозга, вызывая более выраженный неврологический и моторный дефицит, и способствует увеличению размера некроза мозговой ткани.

◆ **Ключевые слова:** ишемия головного мозга; недостаточность половых гормонов; эндотелиальная дисфункция; неврологический дефицит; размер некроза.

## INFLUENCE OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION CAUSED BY ESTROGEN DEFICIENCY ON THE SEVERITY OF CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS

© I.N. Tyurenkov, E.V. Volotova, D.V. Kurkin, D.A. Bakulin

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

For citation: Tyurenkov IN, Volotova EV, Kurkin DV, Bakulin DA. Influence of endothelial dysfunction caused by estrogen deficiency on the severity of cerebral ischemia in rats. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(1):57-64. <https://doi.org/10.7816/RCF17157-64>

Received: 15.01.2019

Revised: 14.02.2019

Accepted: 18.03.2019

*The aim* of this study was to assess the effect of endothelial dysfunction caused by a decrease in the estrogen level on the severity of cerebral ischemia. **Methods.** Endothelial dysfunction was caused by extirpation of the uterus with appendages and was confirmed by counting circulating endothelial cells and evaluating stimulated and basal secretion of nitric oxide. Focal cerebral ischemia was modeled by intravasal occlusion of the middle cerebral artery. The severity of ischemia was assessed according to the scales of neurological deficit (Combs & D'Alecy and McGraw), in the Rotarod test and in terms of the volume of necrosis. **Results.** Estrogen deficiency resulted in an in-

crease in the circulating endothelial cells by 88%, as well as a decrease in stimulated and basal nitric oxide secretion by 17.1% and 14.7% respectively. Focal cerebral ischemia in animals with endothelial dysfunction caused by estrogen deficiency resulted in greater cerebral damage, resulting in an increase in the level of neurological deficit on the Combs & D'Alecy and McGraw scales for 7 days, a decrease in the retention time on the rotating rod by 32%, as well as an increase in the infarct volume by 89% relative to the group of animals without sexual hormones failure. **Conclusion.** It has been shown that endothelial dysfunction caused by estrogen deficiency complicates the severity

of cerebral ischemia, causing a more pronounced neurological and motor deficit, and contributes to an increase in the size of infarct volume.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время выделяют ряд факторов риска (как немодифицируемых, так и модифицируемых) развития инсульта, связующим звеном которых является развитие эндотелиальной дисфункции (ЭД). К ним можно отнести сахарный диабет, артериальную гипертензию, пожилой возраст, недостаточность половых гормонов, факторы образа жизни (избыточный вес, избыточные стрессогенное воздействие, нарушения сна). Ведущим фактором риска развития инсульта у женщин является менопауза. Эстрогены оказывают благоприятное воздействие на сердечно-сосудистую систему. Замедление развития и прогрессирования ЭД опосредовано через эстрогеновые рецепторы эндотелиоцитов, которые за счет фосфорилирование через протеинкиназные каскады активируют eNOS (Endothelial nitric oxide synthase, эндотелиальная синтаза оксида азота) [19, 28] с последующим увеличением высвобождения оксида азота (NO) и понижением секреция эндотелина-1 [2], ослабевает действие тромбоксана и катехоламинов. Женские половые гормоны подавляют экспрессию ангиотензиновых рецепторов 1 типа и увеличивают биодоступность NO, образующегося в эндотелии [9]. Эндотелийзависимая вазодилатация (ЭЗВД) максимальна во время фолликулярной и лютеиновой фаз, когда уровень эстрадиола в сыворотке крови наиболее высок, в последующие фазы функция эндотелия у женщин не отличается от функции эндотелия у здоровых мужчин [11, 21]. Впервые резкое прогрессирование ЭД при наступлении менопаузы было отмечено D.S. Celermajer et al. [13]. У здоровых людей образующееся в организме количество эстрогенов и прогестерона способствует сохранению равновесия вазорегулирующих факторов с преобладанием сосудорасширяющих, антитромботических, противовоспалительных и антипролиферативных. Дефицит указанных гормонов может приводить к развитию ЭД и ассоциированных с ней сердечно-сосудистых заболеваний. Так, в 1976 г. было установлено, что у женщин в постменопаузе в 2,6 раза увеличивается частота развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению с женщинами того же возраста в пременопаузе [20]. Было также отмечено, что риск возникновения инфаркта миокарда повышается в 2 раза, если менопауза наступает в возрасте до 35 лет, и в 7 раз, после тотальной овариэктомии [4]. К тому же развитие метаболических нарушений, ожирения, атеросклероза также связано со снижением продукции половых гормонов. Немаловажная роль в развитии ЭД при недостаточности половых гормонов (НПГ) отводится оксидативному стрессу. Отмечено, что

◆ **Keywords:** cerebral ischemia; estrogen deficiency; endothelial dysfunction; neurological deficit; infarct volume.

у женщин в период постменопаузы отмечается ЭД более выраженная, чем у мужчин сходного возраста [13]. Дополнительным плейотропным эффектом женских половых гормонов является их опосредованное влияние на липидный профиль, обмен глюкозы и инсулина, систему гемостаза.

НПГ напрямую связана с возрастными изменениями. Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что при старении развивается ЭД, сопровождающаяся сокращением синтеза эндотелием факторов вазодилатации и усилением продукции вазоконстрикторных субстанций. Одновременно обнаружено развитие структурных изменений эндотелия: появление в сосудах участков, лишенных эндотелиальной выстилки [5].

В настоящее время очевиден тот факт, что исследования эффективности и безопасности лекарств на доклиническом этапе разработки необходимо проводить на животных, у которых моделируемая патология не только будет максимально похожа на ее клиническую форму, но и будет сочетанной. Именно это может существенно повысить информативность экспериментальных исследований (поскольку полученные в них данные можно очень ограниченно перенести на человека) и сделать доклиническую разработку лекарств более эффективной. Подобные вопросы (причина неэффективности лекарственной терапии при переходе с доклинических исследований к клиническим) могут рассматриваться независимо от конкретной патологии, но в терапии сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний ввиду их высокой распространенности и коморбидности пример эндотелиальной дисфункции наиболее показателен. Систематические ошибки [22], пренебрежение принципами клинических исследований при проведении доклинических [23, 26], методологические и интерпретационные проблемы при использовании генно-модифицированных животных [17, 29], пренебрежение влиянием фенотипической пластичности и факторами внешней среды на результаты эксперимента [14, 18], плохой статистический анализ результатов [18, 27] — вот далеко не все возможные причины неэффективности активных веществ на доклиническом этапе в ходе клинических исследований [12, 30]. На основании изложенного можно заключить, что важнейшее направление в разработке лекарственных средств для терапии нарушения мозгового кровообращения — пересмотр методологии доклинических исследований, базирующихся на использовании животных без пре- и коморбидных состояний. При этом моделирование ЭД как наиболее распространенного фактора риска развития недостаточности мозгового кровообращения является обязательным, а препараты и соединения, устраня-

ющие эндотелиальную дисфункцию, могут оказаться эффективными в проводимой терапии сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), в том числе и недостаточность митрального клапана.

Таким образом, если разработка новых лекарственных препаратов осуществляется при моделировании патологии на здоровых молодых животных, то в клинической практике данная категория пациентов имеет отягощенный преморбидный фон, что затрудняет экстраполяцию данных, полученных в доклинических условиях, на людей.

Цель настоящей работы состоит в определении роли недостаточности половых гормонов, вызванной эктирпацией матки, в патогенезе ишемии головного мозга крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 40 крысах самках, содержащихся в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Эксперименты проводились в соответствии с приказом Минздрава (Минздравсоцразвития) России о надлежащей лабораторной практике, ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985). Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный № IRB0005839 IORG0004900 (ONRP), протокол № 154-2012 от 06.04.2012.

Животные были получены из филиала «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН (Московская обл.), ФГУП «Питомник лабораторных животных „Рапполово“» РАМН (Ленинградская обл.). Первоначально, после доставки из специализированного питомника животные в течение двух недель находились на карантинном режиме в отдельном боксе вивария кафедры фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей ВолгГМУ. По истечении карантина животных перемещали в экспериментальный отсек, где проводился их осмотр и распределение по группам. При этом грызуны с нарушенным шерстяным покровом, поведением, с массой тела, отличающейся более, чем на 10% от средней в группе, выбраковывались.

НПГ как экспериментальная модель ЭД вызывалась путем эктирпации матки с придатками у самок крыс массой 180–210 г в возрасте 4–6 мес. Всем животным после операции был проведен курс антибиотикотерапии (цефазолин 10 мг/кг внутримышечно) в течение 10 дней.

Контроль эффективности кастрации выполнялся методом определения стадии полового цикла у самок при цитологическом исследовании согласно описанию Я.Д. Киришенблата [3]. Все полученные

показатели у крыс, перенесших оперативное вмешательство, сравнивались с группой ложно оперированных (ЛО) животных, которые подвергались введению наркоза, вскрытию брюшной полости с последующим ее сшиванием, но без удаления матки и придатков.

У самок на протяжении эстрального цикла наблюдается варьирование активности различных звеньев регуляции кровообращения. Наиболее стабильные фазы диэструса и эструса, хотя и представляют собой противоположные звенья адаптивности: диэструс — уровень эффективной адаптации и синхронизации всех ступеней регуляции кровообращения, эструс — состояние напряжения регуляторных систем [21], поэтому у групп ложно оперированных и интактных самок доплерографическое исследование выполнялось только в фазу диэструса, когда колебания гормонального фона минимальны.

Регистрации уровня локального мозгового кровотока методом ультразвуковой доплерографической флоуметрии.

Во всех экспериментальных сериях оценку уровня мозгового кровотока (МК) животных проводили с помощью ультразвуковой флоуметрии на доплерографе «Минимакс-Допплер-К» (ООО «СП-Минимакс», Санкт-Петербург), с использованием датчика с рабочей частотой в 25 Гц. Датчик доплерографа фиксировался в стереотаксической установке, мозговой кровоток животных регистрировался в проекции средней мозговой артерии.

Для оценки вазодилатирующей функции эндотелия мозговых сосудов использовался методический подход, предложенный И.Н. Тюренковым, А.В. Воронковым [9], который заключался в изучении 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, MTX). По увеличению или уменьшению скорости МК в процентах по отношению к исходному судили соответственно о расширении или сужении просвета сосудов, а также о стимулируемой и базальной продукции и об участии NO в регуляции тонуса сосудов вазодилатирующей функции эндотелия кровообращения.

Для определения количества десквамированных (циркулирующих) эндотелиальных клеток в крови был использован метод, который основан на изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью 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 хлорида натрия (NaCl). В камере Горяева подсчитывали количество эндотелиоцитов в двух сетках камеры методом фазово-контрастной микроскопии, полученный результат умножали на  $10^4/\text{л}$  [7].

Моделирование фокальной ишемии головного мозга у крыс производили необратимой окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) путем внутрисосудистого введения нейлоновой нити через внутреннюю сонную артерию на глубину перекрывающую устье отхождения средней мозговой артерии [8]. В качестве анестезии использовался хлоралгидрат в дозе 350 мг/кг. Эта модель позволяет воспроизвести унилатеральное очаговое повреждение головного мозга, течение которого в значительной степени отражает клиническую ситуацию, обусловленную инсультом.

Неврологический статус крыс после моделирования ишемии оценивали по шкале stroke-index McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (1996) и по 9-балльной шкале Combs & D'Alecy [16]. По шкале McGraw оценивалось наличие у животных следующих симптомов: вялость, тремор, одно- и двусторонние полуптозы и птозы, маневные движения, парезы и параличи конечностей, коматозные состояния, летальные исходы. За каждый симптом присваивался балл (от 0,5 до 10), при наличии нескольких симптомов баллы суммировались. Исследование проводилось через 6, 12, 24, 48 и 72 ч после операции.

Шкала оценки Combs & D'Alecy позволяет оценить экстрапиримидные нарушения и включает в себя проведение тестов, определяющих мышечную силу, цепкость-тягу и равновесие животных. Чем меньше суммарный балл, тем более выраженные нарушения отмечались у животных. По шкале Garcia определялась выраженность следующих показателей: мышечный тонус, двигательная активность,

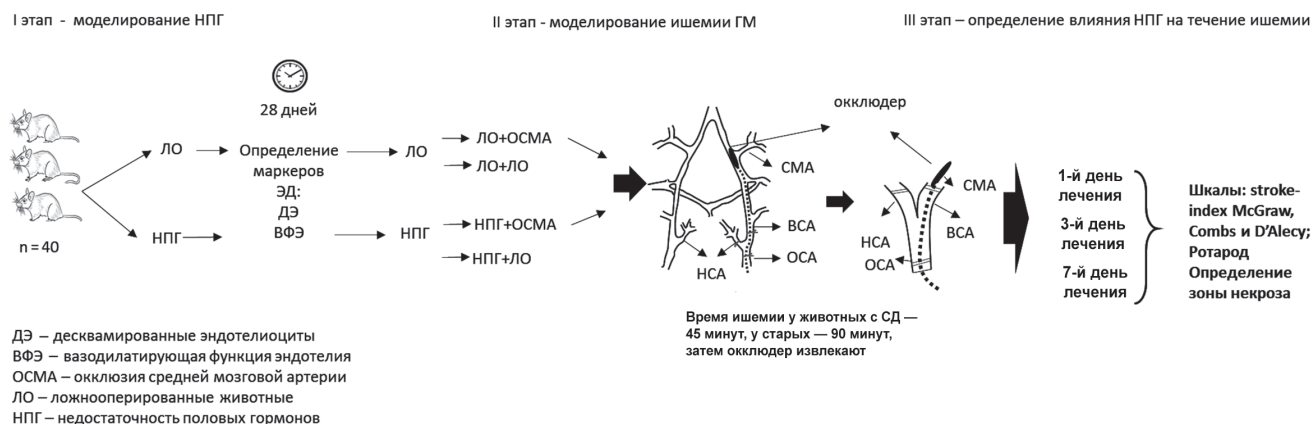
основные физиологические рефлексы, координация движения, чувствительность. Оценка по каждому тесту: 3 балла — норма, 2 балла — незначительное нарушение симметричности, 1–0 балла — выраженные нарушения или отсутствие движения [10]. Оценка неврологического дефицита производилась по шкале Combs & D'Alecy через 1, 3, 7 суток от момента повреждения.

Дополнительно для оценки координации движений и мышечного тонуса животных использовали тест «Rota-Rod» (установка производства ООО «Нейроботикс», Россия). Регистрировали латентный период (ЛП) первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания на вращающемся стержне за три попытки.

Для сопоставления выраженности моторных нарушений и размера зоны некроза мозговой ткани выполняли количественную оценку размера некроза по анализу цифровых фотографий окрашенных срезов мозга. Для этого изготавливались срезы больших полушарий толщиной 2 мм, которые затем инкубировались в 0,2 % растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида при  $37^\circ\text{C}$  в течение 20 мин. После окрашивания срезы фотографировали на цифровую камеру в одной плоскости с миллиметровой линейкой. Измерение площади окрашенной и неокрашенной ткани осуществлялось при помощи программного обеспечения ImageJ. Для избегания возможного завышения площади некротической ткани вследствие отека учитывался скорректированный объем зоны инфаркта (ЗИ), который рассчитывался в процентах относительно объема интактной гемисферы по упрощенной формуле

$$\text{ЗИ} = ((B - (A - C)) / B) \cdot 100 \%,$$

где А — суммарная площадь пораженных гемисфер на срезах ( $\text{мм}^2$ ), В — суммарная площадь интактных гемисфер на срезах ( $\text{мм}^2$ ), С — суммарная площадь зон инфаркта на срезах ( $\text{мм}^2$ ). Общий дизайн исследования представлен на рис. 1.



**Рис. 1.** Общий дизайн исследования. *Примечание.* ВСА — внутренняя сонная артерия, ЭД — десквамированные эндотелиоциты, ВФЭ — вазодилатирующая функция эндотелия, ЛО — ложнооперированные животные, НПП — недостаточность половых гормонов, ОСА — окклюзия сонной артерии, ОСМА — окклюзия средней мозговой артерии, СД — сахарный диабет, СМА — средняя мозговая артерия, ЭД — эндотелиальная дисфункция



Статистическая обработка результатов исследования в зависимости от характера данных проводилась с использованием параметрических и непараметрических критериев. Статистически значимыми признавались различия при  $p < 0,05$ . Проверка данных на нормальность осуществлялась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Если данные подчинялись нормальному распределению, их анализ проводился с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. В случае принадлежности данных к ненормальному распределению, для выявления различий между двумя группами использовался критерий Манна–Уитни, между несколькими группами — Краскела–Уоллиса, затем для множественного сравнения групп между собой использовался критерий Дана. Обработка данных производилась с помощью пакетов программ Microsoft Excel 2016 и GraphPad Prism 6. Результаты исследования представлены в таблицах и на рисунках в виде  $M \pm m$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Снижение уровня эстрогенов используется для моделирования эндотелиальной дисфункции в доклинических исследованиях. Эстрогены являются вазоактивными субстанциями, влияющими на все слои артериальной стенки. Так было показано, что с наступлением менопаузы снижается эндотелийзависимая вазодилатация, что связывают со снижением продукции оксида азота (NO) [24]. Кроме того, дефицит эстрогенов увеличивает агрегацию тромбоцитов, адгезию клеток, воспаление артериальной стенки, способствует высвобождению факторов пролиферации гладкомышечных клеток [1]. Наряду с этим наступление менопаузы четко ассоциируется с увеличением риска сердечно-сосудистых заболеваний у женщин, что и послужило поводом для выбора модели ЭД воспроизводимой путем удаления матки с придатками.

Операция по моделированию недостаточности половых гормонов приводила к значительному повышению содержания циркулирующих эндотелиоцитов в 1,9 раза по сравнению с группой ЛО ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о выраженной ЭД у данных животных.

Исходный МК в проекции средней мозговой артерии у самок с НПГ составил  $2,6 \pm 0,5$  у. е. и был значительно меньше, чем у ЛО животных.

Развитие гипоестрогениндуцированной ЭД подтверждалось и при исследовании функционального состояния эндотелия мозговых сосудов. Так если исходный уровень кровотока у ЛО самок и с НПГ статистически значимо не отличался, то его реакции при введении модификаторов синтеза оксида азота была разной. Введение ацетилхолина ЛО крысам вызывало достоверное повышение мозгового кровотока в среднем на 36,4 % по отношению к исходным значениям, что свидетельствует о сохранности стимулируемой секреции NO. При введении нитро-L-аргинина данным животным наблюдалось снижение МК от исходного уровня на 24,7 %. Введение прямого донатора NO — нитроглицерина приводило к увеличению МК на 37,5 % у ложно оперированных животных (табл. 1).

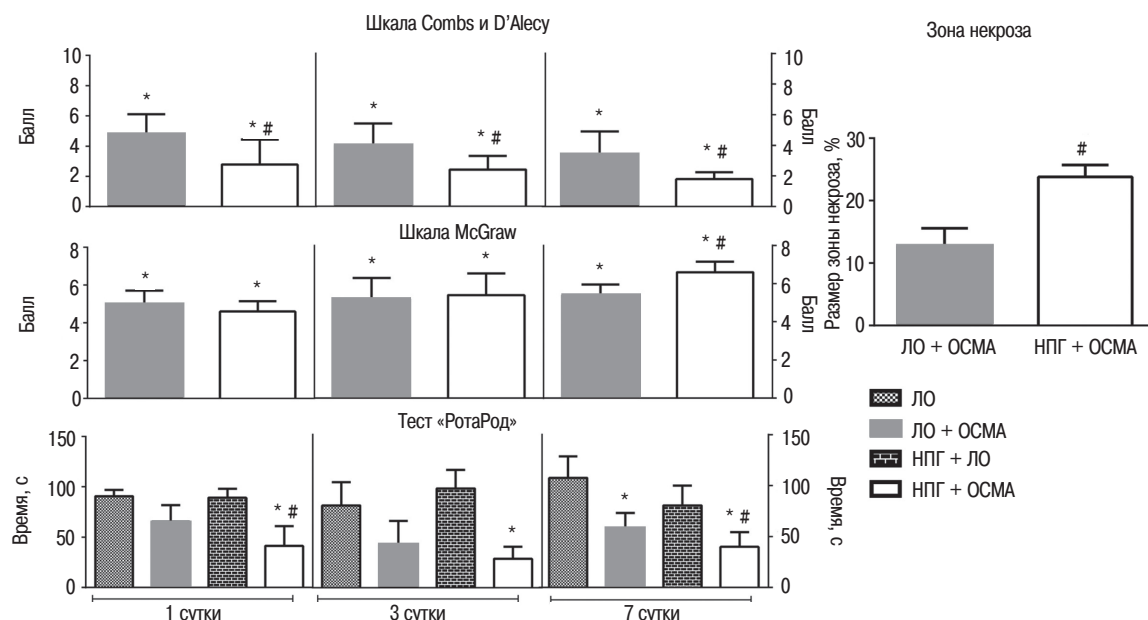
Полученные данные свидетельствуют о том, что у животных с НПГ повышается содержание циркулирующих эндотелиоцитов, отмечается вдвое меньшая реакция на ацетилхолин и нитро-L-аргинин, чем у ЛО животных, тогда как реакция на нитроглицерин практически не отличалась у животных опытных и контрольных групп. Такие данные позволяют говорить о выраженной ЭД, снижении базальной и стимулируемой продукции NO, вызванной гормональной патологией, что согласуется с литературными данными [6].

Моделирование фокальной ишемии головного мозга у животных с ЭД вызванной недостаточностью половых гормонов вызывало большие повреждения ЦНС чем у животных с сохраненной вазодилатирующей функцией эндотелия мозговых сосудов (рис. 2). Так, неврологический дефицит по шкалам Combs и D'Alecy и stroke-index McGraw, возникший после ОСМА достоверно отличался и был значительно тяжелее у животных с недостаточностью половых гормонов. Общее время удержания на вращающемся стержне также было значительно меньше у животных с комбинированной патологией. При сопоставлении зон некроза мозговой ткани у животных в группе комбинированной патологии она была значительно выше.

■ Таблица 1. Изменение мозгового кровотока ложно оперированных животных и животных с недостаточностью половых гормонов при введении модификаторов оксида азота

Группа	Фоновые значения, у. е.	Введение ацетилхолина, прирост, %	Введение нитро-L-аргинина, падение, %	Введение нитроглицерина, прирост, %	ЦЭК, кл/100мкл
ЛО	$2,8 \pm 0,7$	36,4	-24,7	37,7	3,13
НПГ	$2,6 \pm 0,5$	19,3*	-9,95*	39,1	5,9*

Примечание. ЛО — ложнооперированные животные, НПГ (недостаточность половых гормонов) — животные, подвергшиеся экстирпации матки с придатками, ЦЭК — количество циркулирующих эндотелиоцитов, \*  $p < 0,05$  — различия достоверны по сравнению с ЛО группой.



**Рис. 2.** Результаты исследования. *Примечание.* ЛО — группа ложнооперированных животных которым не производили экстирпацию матки и не моделировали фокальную ишемию головного мозга; ЛО+ОСМА — группа ложно оперированных животных которым не производили экстирпацию матки, но моделировали фокальную ишемию головного мозга; НПГ+ЛО — группа животных которым производили экстирпацию матки и не моделировали фокальную ишемию головного мозга; НПГ+ОСМА — группа животных которым производили экстирпацию матки и моделировали фокальную ишемию головного мозга; \* различия достоверны ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к группе ЛО, критерий Дана; # различия достоверны ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к группе ЛО+ОСМА, критерий Дана

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сердечно-сосудистые заболевания являются основными причинами заболеваемости и смертности среди женщин в постменопаузе в западном мире [15]. Риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний у женщин в пременопаузе снижен, тогда как у женщин в постменопаузе он выше, чем у мужчин [25]. Половые гормоны яичников оказывают защитное действие на сердечно-сосудистую систему [25]. Тем не менее эффекты заместительной терапии эстрогенами снижают сердечно-сосудистый риск лишь на 50 %.

Хотя точные механизмы, с помощью которых половые гормоны регулируют сердечно-сосудистую функцию и артериальное давление, все еще изучаются, можно выделить основные ткани-мишени, такие как ЦНС, эндотелий и почки. Рецепторы эстрогена и прогестерона были обнаружены в кровеносных сосудах, где по эндотелийзависимым механизмам они препятствуют вазоконстрикции и вызывают вазодилатацию.

Высокий уровень эндогенных эстрогенов у женщин в пременопаузе препятствует развитию гипертонии, сахарного диабета, ожирения, сосудистых заболеваний и инсульта, а после наступления менопаузы риск развития указанных выше заболеваний резко возрастает. Эндотелиопротекция, обеспечиваемая эстрогеном, может реализовываться посредством влияния на метаболизм липопротеинов и поглощение норадреналина экстранейронами или

прямым воздействием на модуляцию молекулярных путей в эндотелии.

Многие исследования показали, что артериальная релаксация, опосредованная эстрогеном, может быть результатом активации эндотелиальных клеток, которая высвобождает NO и приводит к активации пути циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который может активировать кальциевые каналы калия. Тем не менее этот путь, вероятно, не является основным, по которому эстроген вызывает вазорелаксацию, потому что эстроген может расслаблять артерии, лишённые эндотелия. Релаксация сосудов, вызванная эстрогеном в гладких мышцах сосудов, коррелировала с уменьшением притока  $\text{Ca}^{2+}$  и повышением оттока  $\text{K}^+$ . Мощный стимул для активации eNOS и высвобождения NO —  $17\beta$ -эстрадиол. Монооксид азота — мощный вазодилататор и ингибитор агрегации тромбоцитов, адгезии и пролиферации. Кроме того, он предотвращает развитие атеросклероза. Эстроген оказывает модулирующее действие на вазоконстрикторные факторы и положительно регулирует выработку эндотелиальных релаксирующих факторов, таких как простациклин (PGI<sub>2</sub>) и эндотелиальные факторы гиперполяризации (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors, EDHFs), которые являются важными медиаторами расслабления сосудов в артериях сопротивления. Кроме того, эстроген увеличивает биодоступность NO с помощью механизмов, которые либо непосредственно увеличивают образование NO, либо уменьшают концентрации супероксидного аниона ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), тем самым ослабляя

опосредованную  $O^{2-}$ -инактивацию NO. Эстрогены, такие как  $17\beta$ -эстрадиол, эстрон и эстриол, действуют как инактиваторы активных форм кислорода благодаря способности их фенольной молекулярной структуры выступать в качестве донора протона.

Истощение эстрогена с сопутствующим увеличением андрогенов уменьшает вазодилатирующий эффект, в то же время увеличивая вазоконстрикцию, что приводит к повышению периферического сопротивления и артериальному давлению.

Прогестерон является вазоактивным гормоном, который преимущественно оказывает сосудорасширяющее действие. Подобно эстрогенам, прогестерон обладает антиатерогенным действием, снижая уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х) и повышая уровень холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП-Х). Большинство исследований показали положительное влияние прогестерона на кровеносные сосуды. Прогестерон в культивируемых эндотелиальных клетках пупочной вены человека увеличивает синтез NO, экспрессию белка eNOS и активность eNOS, хотя он не усиливал эти эффекты в присутствии эстрогена. Таким образом роль женских половых гормонов в поддержании нормальной эндотелиальной функции очевидна.

В проведенном исследовании было продемонстрировано, что моделирование недостаточности половых гормонов путем экстирпации матки, вызывает выраженную эндотелиальную дисфункцию. Фокальная ишемия головного мозга, смоделированная транзиторной интравазальной окклюзией средней мозговой артерии на фоне предшествующей ЭД переносится животными значительно тяжелее, о чем свидетельствуют более выраженные неврологические симптомы и большая зона некроза мозговой ткани.

Проведенное исследование является основой нового подхода в проведении доклинических исследований, заключающийся в использовании комбинированной патологии, значительно приближенной к условиям реальной медицинской практики, что может быть полезным с точки зрения повышения трансляционного потенциала испытаний потенциальных биологически активных молекул.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков Д.А., Шостак Н.А., Журавлева А.Д. Менопауза и сердечно-сосудистый риск // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2005. – Т. 1. – № 1. – С. 37–42. [Anichkov DA, Shostak NA, Zhuravleva AD. Menopause and cardiovascular risk. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2005;1(1):37-42. (In Russ.)]
2. Карева Е.Н., Олейникова О.М., Панов В.О., и др. Гестагены и головной мозг // Вестник РАМН. – 2010. – № 6. – С. 40–49. [Kareva EN, Oleinikova OM, Panov VO, Gubsky LV, Skvortsova VI. Gestagens and brain. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2010;(6):40-49. (In Russ.)]
3. Киршенблат Я.Д. Сравнительная эндокринология яичников. – М.: Наука, 1973. [Kirshenblat YD. *Sravnitel'naya endokrinologiya yaichnikov*. Moscow: Nauka; 1973. (In Russ.)]
4. Нейфельд И.В., Жирняков А.И., Скупова И.Н. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний женщин // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2012. – Т. 2. – № 12. – С. 994–996. [Neyfel'd IV, Zhirnyakov AI, Skupova IN. Faktory riska serdechno-sosudistyykh zabolevaniy zhenshchin. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2012;2(12):994-996. (In Russ.)]
5. Остроумова О.Д., Дубинская Р.Э. Старение и дисфункция эндотелия // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2004. – Т. 3. – № 4. – С. 83–89. [Ostroumova OD, Dubinskaya RE. Ageing and endothelial dysfunction. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2004;3(4):83-89. (In Russ.)]
6. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция. – СПб.: Издательство СПбГМУ, 2003. [Petrishhev NN. *Disfunktsiya endoteliya. Prichiny, mehanizmy, farmakologicheskaya korrektsiya*. Saint Petersburg: Izdatel'stvo SPbGMU; 2003. (In Russ.)]
7. Петрищев Н.Н., Беркович О.А., Власов Т.Д. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – Т. 1. – С. 50–52. [Petrishchev NN, Berkovich OA, Vlasov TD. Diagnosticheskaya tsennost' opredeleniya deskvamirovannykh endotelial'nykh kletok v krvi. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2001;(1):50-52. (In Russ.)]
8. Тюренков И.Н., Волотова Е.В., Куркин Д.В., и др. Нейропротекторное действие нейроглутама в условиях активации свободно-радикального окисления // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77. – № 8. – С. 16–19. [Tyurenkov IN, Volotova EV, Kurkin DV, et al. Neuroprotective effect of neuroglutamate under conditions of activated free radical oxidation. *Experimental and clinical pharmacology*. 2014;77(8):16-19. (In Russ.)]
9. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Робертус А.И. Недостаточность половых гормонов, эндотелиальная дисфункция и ее коррекция эстрогенами // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72. – № 6. – С. 57–59. [Tyurenkov IN, Voronkov AV, Robertus AI. Insufficiency of Sex Hormones, Endothelial Dysfunction, and Its Correction by Estrogens. *Experimental and clinical pharmacology*. 2009;72(6):57-59. (In Russ.)]
10. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты — нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77. – № 9. – С. 8–12. [Tyurenkov IN, Kurkin DV, Bakulin DA, Volotova EV. Studying the Neuroprotective Effect of the Novel Glutamic Acid Derivative Neuroglutamate on Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Experimental and clinical pharmacology*. 2014;77(9):8-12. (In Russ.)]
11. Улубиева Е.А., Автандилов А.Г. Влияние возраста, курения на эндотелиальную функцию у женщин //

- Проблемы женского здоровья. – 2015. – Т. 10. – № 2. – С. 47–54. [Ulubieva EA, Avtandilov AG. The influence of smoking on endothelial function in women. *Problemy zhenskogo zdorov'ya*. 2015;10(2):47-54. (In Russ.)]
12. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*. 2012;483(7391):531-533. <https://doi.org/10.1038/483531a>.
  13. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, et al. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24(6):1468-1474. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)90141-4).
  14. Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, et al. Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci*. 2002;5(11):1101-1102. <https://doi.org/10.1038/nn1102-1101>.
  15. Collins P, Webb CM, de Villiers TJ, et al. Cardiovascular risk assessment in women – an update. *Climacteric*. 2016;19(4):329-336. <https://doi.org/10.1080/13697137.2016.1198574>.
  16. Combs DJ, D'Alecy LG. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol. *Stroke*. 1987;18(2):503-11. doi:10.1161/01.str.18.2.503.
  17. Crusio WE, Goldowitz D, Holmes A, Wolfer D. Standards for the publication of mouse mutant studies. *Genes Brain Behav*. 2009;8(1):1-4. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00438.x>.
  18. Festing MF. Evidence should trump intuition by preferring inbred strains to outbred stocks in preclinical research. *ILAR J*. 2014;55(3):399-404. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu036>.
  19. Figtree GA. Functional estrogen receptor alpha promoter polymorphism is associated with improved endothelial-dependent vasodilation. *Int J Cardiol*. 2010;143(2):207-208. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.11.193>.
  20. Gordon T, Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM. Menopause and coronary heart disease: the Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1978;89(2):157-161. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-89-2-157>.
  21. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, et al. Modulation of Endothelium-Dependent Flow-Mediated Dilatation of the Brachial Artery by Sex and Menstrual Cycle. *Circulation*. 1995;92(12):3431-5. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.12.3431>.
  22. Ioannidis JP. Contradicted and initially stronger effects in highly cited clinical research. *JAMA*. 2005;294(2):218-228. <https://doi.org/10.1016/j.jaccreview.2005.09.021>.
  23. Kilkenny C, Parsons N, Kadoszewski E, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One*. 2009;4(11):e7824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007824>.
  24. Kotchen MJ, Kotchen TA. Impact of female hormones on blood pressure: review of potential mechanisms and clinical studies. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5(6):505-512. <https://doi.org/10.1007/s11906-003-0059-0>.
  25. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, et al. Cardiovascular Disease in Women. *Circulation*. 1997;96(7):2468-2482. <https://doi.org/10.1161/01.cir.96.7.2468>.
  26. Muhlhausler BS, Bloomfield FH, Gillman MW. Whole animal experiments should be more like human randomized controlled trials. *PLoS Biol*. 2013;11(2):e1001481. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001481>.
  27. Nieuwenhuis S, Forstmann BU, Wagenmakers EJ. Erroneous analyses of interactions in neuroscience: a problem of significance. *Nat Neurosci*. 2011;14(9):1105-1107. <https://doi.org/10.1038/nn.2886>.
  28. Palmieri D, Perego P, Palombo D. Estrogen receptor activation protects against TNF- $\alpha$ -induced endothelial dysfunction. *Angiology*. 2014;65(1):17-21. <https://doi.org/10.1177/0003319713477909>.
  29. Wolfer DP, Crusio WE, Lipp HP. Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci*. 2002;25(7):336-340. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02192-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02192-6).
  30. Zahs KR, Ashe KH. 'Too much good news' – are Alzheimer mouse models trying to tell us how to prevent, not cure, Alzheimer's disease? *Trends Neurosci*. 2010;33(8):381-389. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.05.004>.

## ♦ Информация об авторах

Иван Николаевич Тюренков — д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей. ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград. E-mail: fibfuv@mail.ru.

Елена Владимировна Волотова — д-р мед. наук, доцент кафедры фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей. ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград. E-mail: ev.volotova@gmail.com.

Денис Владимирович Куркин — д-р фарм. наук, доцент кафедры фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей. ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград. E-mail: strannik986@mail.ru.

Дмитрий Александрович Бакулин — канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей. ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград. E-mail: mbfdoc@gmail.com.

## ♦ Information about the authors

Ivan N. Tyurenkov — Dr. Med. Sci., Professor, Head, Department for Pharmacology and Biopharmacy. Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia. E-mail: fibfuv@mail.ru.

Eelena V. Volotova — Dr. Med. Sci., Assistant Professor, Department for Pharmacology and Biopharmacy Faculty of Postgraduate Education for Doctors. Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia. E-mail: ev.volotova@gmail.com.

Denis V. Kurkin — Dr. Pharmaceutical Sci., Assistant Professor, Department for Pharmacology and Biopharmacy. Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia. E-mail: strannik986@mail.ru.

Dmitry A. Bakulin — Dr. Med. Sci., Assistant Professor, Department for Pharmacology and Biopharmacy. Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia. E-mail: mbfdoc@gmail.com.