

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## ВЛИЯНИЕ НООПЕПТА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КАПИЛЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА КРЫС

М. Г. Баласанян, Ш. Г. Африкян, А. В. Топчян<sup>1</sup>

В экспериментальных исследованиях на крысах изучено влияние ноопепта (этилового эфира *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина) на капиллярную сеть коры большого мозга крыс при нарушении мозгового кровообращения, вызванного перманентной окклюзией правой сонной артерии (ОПСА). Состояние микроциркуляторного русла оценивалось после ОПСА и на фоне введения препарата через 30 мин после оперативного вмешательства, безинъекционным кальций-аденозинтрифосфатным методом выявления внутриорганных сосудистого русла. Срезы получали из коры большого мозга крыс, декапитированных через 60 мин после внутрибрюшинного введения ноопепта в дозе 1 мг/кг. Животным контрольной группы через указанный промежуток времени после ОПСА вводили 0,9 % раствор хлорида натрия. Для оценки состояния капиллярной сети рассчитывали средний диаметр и количество функционирующих капилляров, а также распределение сосудов по диаметру. Результаты проведенных исследований показали, что ноопепт достоверно ( $p < 0,05$ ) предотвращает наблюдаемое на фоне ОПСА уменьшение количества функционирующих капилляров в обоих полушариях (на 24,8 % в правом и на 25,8 % в левом). Под влиянием препарата отмечалось также статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение диаметра функционирующих капилляров, как в ипсилатеральном на 7,9 %, так и контралатеральном на 7,6 %, полушариях, по сравнению с показателями контрольной группы. Полученные данные указывают на то, что в проявлении нейропротекторных свойств ноопепта задействована его способность стимулировать микроциркуляцию коры большого мозга при ишемических поражениях.

**Ключевые слова:** ноопепт; микроциркуляторное русло; ишемия; перманентная окклюзия правой сонной артерии.

### ВВЕДЕНИЕ

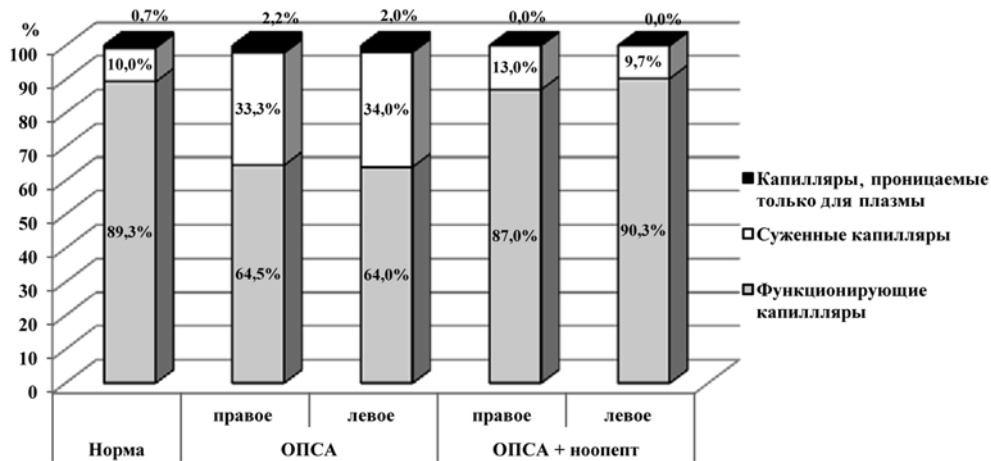
Нарушения мозгового кровообращения, более 80 % которых приходится на долю ишемического инсульта, занимают одно из лидирующих мест по уровню смертности и потере трудоспособности населения [6]. Сформулированы современные подходы в лечении острой фокальной ишемии, включая тромболитическую терапию, а также первичную и вторичную нейропротекцию. Тем не менее, поиск новых, эффективных и безопасных средств, применяемых при лечении инсульта, до сих пор остается одной из актуальных задач современной медицины, поскольку, несмотря на то, что прошедшие десятилетия ознаменовались созданием и изучением большого количества нейропротекторов, лишь немногие из них обладают доказанной клинической эффективностью [10, 11, 13, 15]. Кроме того, для некоторых препаратов была зарегистрирована высокая частота развития побочных эффектов (антагонисты АМРА- и NMDA-глутаматных рецепторов и т.д.) [14]. Предпосылкой для эффективности подобных соединений может служить сочетание нейропро-

текторной активности со способностью восстанавливать адекватное кровоснабжение мозговой ткани [17].

В последнее время значительно возрос интерес к соединениям пептидной природы (IGF-1, TRH, нейротензин, вазопресин и т.д.), как к относительно безопасным веществам с потенциальной нейропротекторной активностью, для которых характерна многонаправленность фармакологического действия. Создание коротких ди-, трипептидов, повторяющих концевые фрагменты нейроактивных полипептидов и содержащие пролин, глицин, пирролглютаминую кислоту, является приоритетным в данном направлении, поскольку короткие пептиды более стабильны, лучше проникают через ГЭБ и обладают менее выраженной периферической активностью, по сравнению с полипептидными аналогами [8, 16].

Указанный подход в поиске нейропротекторных средств был подтвержден созданием ноопепта (этиловый эфир *N*-фенацетил-*L*-пролилглицина) — нового препарата, разработанного в НИИ фармакологии РАМН на основе дизайна коротких пептидов, имитирующих структуру непептидного нейротропного средства пирролидинового ряда — пирацетама. Несмотря на то, что ноопепт относится к группе ноотропных

<sup>1</sup> Ереванский государственный медицинский университет (ЕГМУ) им. М. Гераци, ул. Корюна 2, Ереван, 0025, Армения.



**Рис. 1.** Влияние ноопепта в дозе 1 мг/кг на процентное соотношение количества функционирующих, суженных и проницаемых только для плазмы капилляров большого мозга крыс после перманентной окклюзии правой сонной артерии.

Здесь и на рис. 2 и в таблице: ОПСА — контрольная группа животных, получавших 0,9% раствор хлорида натрия после перманентной окклюзии правой сонной артерии; ОПСА + ноопепт — экспериментальная группа, получавшая ноопепт в дозе 1 мг/кг после перманентной окклюзии правой сонной артерии.

средств, многочисленные исследования посвящены изучению его нейропротекторных свойств и выявлению их механизмов, в частности в экспериментах *in vivo* и *in vitro* доказано, что препарат обладает антикоагулянтной, фибринолитической, антиоксидантной, противовоспалительной активностью, способностью блокировать потенциал-зависимые кальциевые и калиевые каналы [2, 3] и т.д.

Приведенные факты в совокупности с данными о способности некоторых эндогенных нейропептидов (VIP, PACAP, TRH, IGF-1) и их глицин- и пролинсодержащих коротких аналогов (G-2mPE) оказывать положительное влияние на церебральную гемодинамику [12], а также результаты исследований относительно способности ноопепта снижать объем зоны поражения при дистальной окклюзии среднемозговой артерии [4], восстанавливать нарушенный в условиях перманентной окклюзии общей сонной артерии локальный мозговой кровоток [5] послужили основой для изучения влияния дипептида на состояние микроциркуля-

торного русла коры большого мозга при окклюзии правой общей сонной артерии.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка состояния капиллярной системы коры большого мозга проводилась безинъекционным кальций-аденозинтрифосфатным методом, основанным на избирательном осаждении свободного неорганического фосфора, образующегося при гидролизе аденозин-5-трифосфорной кислоты солями кальция, в структурах сосудистого русла. Метод обеспечивает не только избирательное четкое и контрастное выявление сосудисто-капиллярной сети, но и дает возможность одновременной дифференциации различных звеньев микроциркуляторного русла [1].

Объектом исследования служили белые беспородные половозрелые крысы-самцы массой 200–250 г ( $n = 26$ ) из питомника ЕГМУ. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария, в ночь перед экспериментом их лишали пищи при свободном доступе к воде. Все эксперименты осуществ-

### Диаметр капилляров ипсилатерального и контралатерального полушария большого мозга крыс после ОПСА и на фоне внутрибрюшинного введения ноопепта в дозе 1 мг/кг (мкм, $M \pm m$ )

Капилляры	Интактная группа ( $n_1 = 300$ )	ОПСА <sup>1</sup>		ОПСА + ноопепт <sup>2</sup>	
		правое ( $n_2 = 186$ )	левое ( $n_3 = 150$ )	правое ( $n_4 = 200$ )	левое ( $n_5 = 165$ )
Функционирующие	$5,55 \pm 0,06$	$4,64 \pm 0,04^*$	$4,71 \pm 0,07^*$	$5,01 \pm 0,05^{*\#}$	$5,07 \pm 0,05^{*\#}$
Суженные	$3,61 \pm 0,07$	$3,48 \pm 0,04$	$3,5 \pm 0,09$	$3,68 \pm 0,04^\#$	$3,49 \pm 0,08$
Проницаемые только для плазмы	$2,41 \pm 0,01$	$2,19 \pm 0,09^*$	$2,45 \pm 0,0$	0	0

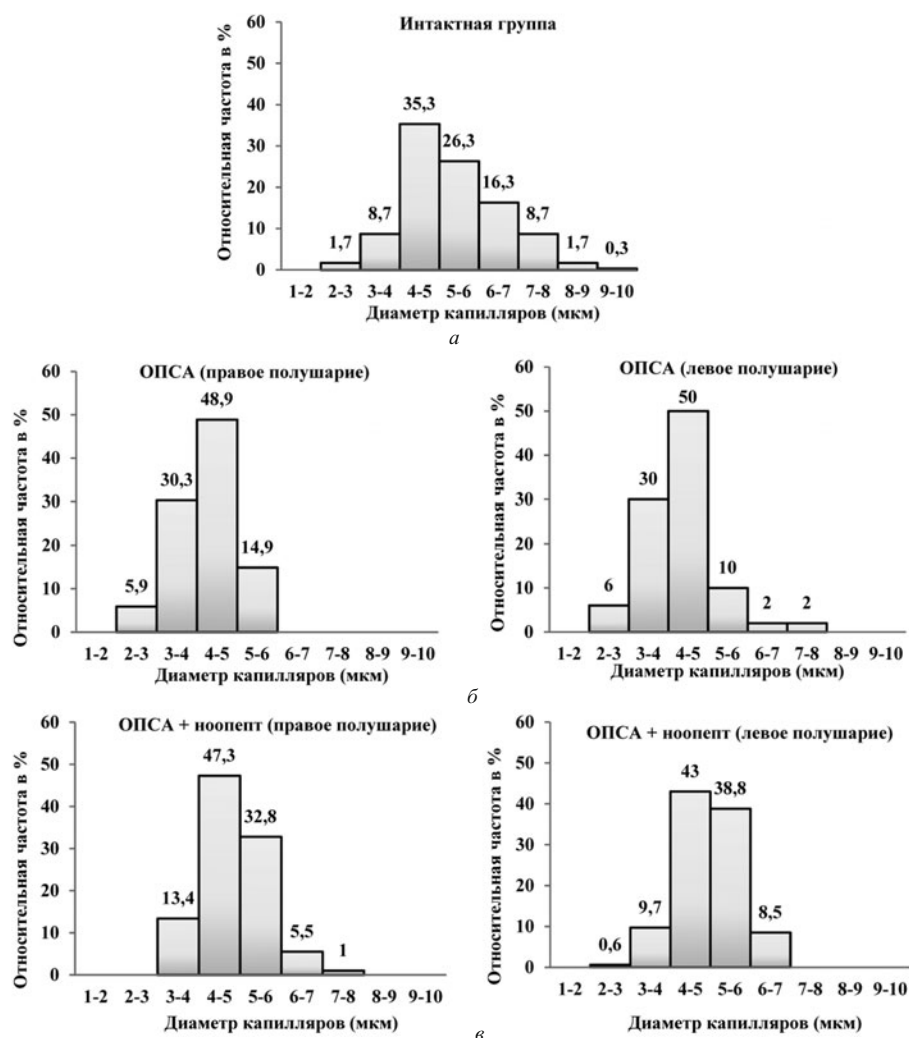
<sup>1</sup> Контрольная группа животных, получавших 0,9 % раствор хлорида натрия после перманентной ОПСА;

<sup>2</sup> Экспериментальная группа, получавшая ноопепт в дозе 1 мг/кг после перманентной ОПСА;

$n_1, n_2, n_3, n_4, n_5$  — общее количество измеренных сосудов;

\* —  $p < 0,05$ , по сравнению с нормой;

# —  $p < 0,05$ , по сравнению с ОПСА.



**Рис. 2.** Частота распределения (% от общего числа) капилляров большого мозга крыс по диаметру в норме (*а*), после окклюзии правой сонной артерии (*б*) и после внутрибрюшинного введения ноопепта в дозе 1 мг/кг на фоне окклюзии правой сонной артерии (*в*).

лялись согласно международным нормативам “The PHS Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Нарушения кровоснабжения мозга вызывали односторонней ОПСА. Для этого под общей анестезией, вызванной внутрибрюшинным введением нембутала в дозе 45 мг/кг, на передней поверхности шеи проводили срединный разрез и выделяли правую общую сонную артерию, на которую накладывали лигатуру.

Для изучения влияния ноопепта на капилляры ипсилатерального и контралатерального полушарий коры большого мозга на фоне перманентной ОПСА проводились морфометрические исследования на срезах коры большого мозга крыс, подвергшихся декапитации под нембуталовым наркозом. Животным экспериментальной группы ( $n = 9$ ) через 30 мин после ОПСА внутрибрюшинно вводили ноопепт в дозе 1 мг/кг и декапитировали через 60 мин после введения препарата. Временной интервал для введения дипептида, а также декапитации животных был выбран, исходя из результатов экспериментальных исследований

по изучению влияния препарата на локальный мозговой кровоток методом лазерной доплеровской флоуметрии в тех же условиях [5]. Животным контрольной группы ( $n = 9$ ) через 30 мин после ОПСА вводился 0,9 % раствор хлорида натрия. Для сравнения использовали срезы коры большого мозга интактных животных ( $n = 8$ ).

Измерение диаметра капилляров проводили при помощи программы DeltaPix Insight в 100 полях зрения. В качестве диаметра одного капилляра принимали среднее значение от 2 – 6 измерений. Величину диаметра капилляров выражали в микрометрах. Для количественной и качественной оценки состояния микроциркуляторного русла рассчитывали средний диаметр капилляров (в мкм), количество функционирующих (4 – 10 мкм), суженных (4 – 2,5 мкм) и проницаемых только для плазмы крови (< 2,5 мкм) капилляров, а также распределение капилляров по диаметру (в % от общего числа).

Данные приведены в виде средних значений для групп ( $M \pm m$ ). Достоверность различий значений проводилась по параметрическому  $t$ -критерию (Стьюдента) при принятом уровне значимости 5 % для выборок с неравными дисперсиями (равенство дисперсий вычислялось по критерию Фишера).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали данные морфометрических исследований, в срезах большого мозга крыс интактной группы большинство капилляров (89,3 %) находится в функционально активном состоянии (рис. 1), а их средний диаметр колеблется в пределах  $5,55 \pm 0,06$  (табл. 1), что подтверждает литературные данные, свидетельствующие о том, что в мозге большинство капилляров находится в открытом состоянии и не испытывает попеременного сужения или расширения, как в сосудистой системе других органов. Помимо незначительного количества (10 %) суженных капилляров, в некоторых полях зрения наблюдались единичные капилляры, проницаемые только для плазмы крови (0,7 % от общего количества). Примечательно, что распределение функционирующих капилляров по диаметру (рис. 2) охватывает довольно широкий диапазон значений, от 4 до 9 мкм, где 26,3 и 16,3 % составляют капилляры диаметром 5–6 мкм и 6–7 мкм, соответственно.

При исследовании состояния микроциркуляции коры большого мозга в условиях ишемии было установлено, что перманентная окклюзия правой сонной артерии приводит к заметным нарушениям в капиллярном сосудистом русле как ипсилатерального, так и контралатерального полушарий большого мозга крыс. Прежде всего отмечается статистически значимое ( $p < 0,05$ ) уменьшение диаметра функционирующих капилляров на 16,4 % (от  $(5,55 \pm 0,06)$  до  $(4,64 \pm 0,04)$  мкм) в правом, и на 15,1 % (от  $(5,55 \pm 0,06)$  до  $(4,71 \pm 0,07)$  мкм) в левом полушарии (табл. 1). Достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение количества суженных капилляров, от 10 до 33,3 % в правом и до 34 % в левом полушариях, также подтверждает развитие наблюдаемых ишемических нарушений. Количество капилляров, проницаемых только для плазмы крови, увеличивалось незначительно, от 0,7 до 2,2 % в правом и до 2,05 % в левом полушарии, и носило недостоверный характер.

Что касается относительного распределения капилляров по диаметру, то, как видно из рис. 2, при ОПСА резко уменьшается количество функционирующих капилляров диаметром 5–6 мкм (в правом полушарии 14,9 %, в левом — 10 % от общего количества), в отличие от сосудов диаметром 4–5 мкм (в правом полушарии 48,9 %, в левом — 50 % от общего количества). Капилляры диаметром более 6 мкм в срезах ипсилатерального полушария полностью отсутствовали, а в

микропрепаратах контралатерального полушария обнаруживались в незначительном количестве (4 %).

Полученные результаты согласуются с литературными данными относительно нарушений, наблюдаемых в микроциркуляторном звене сосудистого русла при постишемической отсроченной гипоперфузии [8, 9]. Интерпретация наблюдаемых изменений в различных исследованиях не одинакова и вопросы о механизмах развития отмечаемых сдвигов остаются открытыми. Согласно классическим представлениям, капилляры, будучи лишены гладкомышечных клеток, не способны к самостоятельному сужению или расширению, и изменения их диаметра — это пассивный процесс, происходящий под влиянием различных факторов. Во-первых, это результат изменения тонуса более крупных сосудов, в частности сужение прекапиллярных артериол и, как следствие этого, уменьшение величины соотношения капиллярный кровоток/диаметр. Во-вторых, это уменьшение диаметра капилляров вследствие постишемического набухания микроворсинок эпителия и перикапиллярной глии, а также венозный застой вследствие тромбоза и закупорки посткапиллярных вен, а также лейкоцитоза и т.д. Тем не менее ряд авторов, основываясь на результатах собственных исследований, полагает, что изменения диаметра капилляров — активный процесс, включающий и эндотелий. Так, например, некоторыми исследователями показана активная роль сократительных пероцитов в регуляции диаметра капилляров как в норме, так и при ишемии [7].

При исследовании влияния ноопепта на морфофункциональное состояние капиллярной системы коры большого мозга крыс на фоне ОПСА было установлено, что последний обладает способностью устранять нарушения в данном звене микроциркуляторного русла путем статистически достоверного ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контролем, увеличения доли функционирующих капилляров, как ипсилатерального, так и контралатерального полушарий (рис. 1) практически до исходного значения (87 % в правом и 90,3 % в левом). Приведенные данные подтверждаются и статистическим анализом, свидетельствующим о том, что различия значений между данными экспериментальной (получавшей ноопепт) и интактной группами животных недостоверны, что указывает на способность ноопепта устранять нарушения в микроциркуляторном русле коры большого мозга в условиях ишемии.

Положительное влияние ноопепта на микроциркуляторное русло подтверждается также и достоверным увеличением ( $p < 0,05$ ) диаметра функционирующих капилляров в срезах правого и левого полушарий на 7,9 и 7,6 % (таблица) до значений  $(5,01 \pm 0,05)$  и  $(5,07 \pm 0,05)$  мкм, соответственно. Следует отметить, что хотя диаметр функционирующих капилляров не достигает своего исходного значения, тем не менее при оценке распределения сосудов по

диаметру становится очевидно, что ноопепт существенно увеличивает количество капилляров диаметром более 5 мкм (рис. 2), причем указанное действие наиболее выражено в контралатеральном полушарии. Немаловажным является и то, что ни в одном из полей зрения срезов группы, получавшей ноопепт, не выявлялись сосуды диаметром менее 2,5 мкм.

## ВЫВОДЫ

1. При перманентной окклюзии одной из общих сонных артерий через 1,5 ч после перевязки наблюдаются нарушения в микроциркуляторном русле как ипсилатерального, так и контралатерального полушарий коры большого мозга крыс, выражающиеся прежде всего в достоверном уменьшении диаметра функционирующих капилляров в среднем на 15,75 % ( $p < 0,05$ ).

2. Ноопепт, вводимый внутривенно в дозе 1 мг/кг, в условиях ОПСА приводит к статистически значимому увеличению количества и диаметра функционирующих капилляров обоих полушарий практически до исходного значения, устраняя наблюдаемые при ишемии нарушения микроциркуляторного русла коры большого мозга крыс.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. М. Чилингарян, *Журн. эксперим. и клин. мед.*, № 5, 19 – 28 (1977).

2. Г. А. Романова, Ф. М. Шакова, *Нейронауки*, 3(5), 10 – 17 (2006).
3. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Эксперим. клин. фармакол.*, 65(5), 66 – 72 (2002).
4. С. А. Гаврилова, К. С. Ус, Р. У. Островская, В. Б. Кошелев, *Эксперим. клин. фармакол.*, 69(4), 16 – 18 (2006).
5. Ш. Г. Африкян, М. Г. Баласанян, К. Б. Ашрафян, Э. Л. Ерицян, *Сборник научных статей ЕГМУ им. М. Гераци, Ежегодная отчетная научная конференция*, том 1, Ереван (2013), сс. 95 – 101.
6. A. S. Go, D. Mozaffarian, V. L. Roger, et al., *J. AHA Circ.*, 127(1 / 8), 6 – 245 (2013).
7. C. N. Hall, C. Reynell, B. Gesslein, et al., *Nature*, 508, 55 – 70 (2014).
8. D. Wu, *J. Am. Soc. Exp. NeuroTherapeutics*, 2(1), 120 – 128 (2005).
9. E. F. Hauck, S. Apostel, J. Hoffman, et al., *J. Cereb. Blood Flow and Metab.*, 24(4), 383 – 391 (2004).
10. E. H. Lo, *Nat. Med.*, 14(5), 497 – 500 (2008).
11. G. Z. Feuerstein, M. M. Zaleska, M. Krams, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 28(1), 217 – 219 (2008).
12. J. Guan, P. D. Gluckman, *Brit. J. Pharmacol.*, 157(6), 881 – 891 (2009).
13. J. Minnerup, B. A. Sutherland, A. M. Buchan, C. Kleinschnitz, *Int. J. Mol. Sci.*, 13(9), 11753 – 11772 (2012).
14. M. Fisher, W. Schaebitz, *Arch. Intern. Med.*, 160, 3196 – 3206 (2000).
15. M. D. Ginsberg, *Stroke*, 40(1), 111 – 114 (2009).
16. T. Hökfelt, T. Bartfai, F. Bloom, *Lanc. Neurology*, 2(8), 463 – 472 (2003).
17. V. E. O'Collins, M. R. Macleod, G. A. Donnan, et al., *Ann. Neurol.*, 59(3), 467 – 477 (2006).

Поступила 13.03.15

## THE INFLUENCE OF NOOPEPT ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF CEREBRAL CORTEX CAPILLARY NETWORK UNDER BLOOD FLOW DISTURBANCE CONDITIONS

M. G. Balasanyan, Sh. G. Afrikyan, and H. V. Topchyan

M. Heratsi Yerevan State Medical University, Koryun st. 2, 0025 Yerevan, Armenia

The effect of noopept (N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester) on cerebral cortex capillary network was studied on rats with the blood flow disturbance conditions induced by permanent right common carotid artery occlusion (CCAO). The cerebral microcirculation was observed by non-injective calcium-adenosine triphosphate method immediately after CCAO and upon noopept injection 30 min after the operation. Brain slices were prepared from cerebral cortex of rats, which were decapitated 60 min after noopept injection in a dose of 1 mg/kg. The control group animals were treated with 0.9% saline solution. The mean diameter, number of functioning capillaries, and distribution of capillary luminal diameters were calculated. The results showed that noopept reliably ( $p < 0.05$ ) prevented decrease in the number of functioning capillaries in both hemispheres (by 24.8 and 25.8% in the right and left one, respectively) and reliably ( $p < 0.05$ ) increased the functioning capillary diameter in unilateral (by 7.9%) and contralateral (by 7.6%) hemispheres as compared to the values observed after CCAO. These data show that one possible reason of the neuroprotective activity of noopept can be its ability to improve cerebral cortex blood flow under the ischemic damage conditions.

**Keywords:** noopept; microcirculation; ischemia; right common carotid artery occlusion.