На правах рукописи

Серяпина Алиса Алексеевна

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПАРАМЕТРЫ ГЕМОДИНАМИКИ ПРИ РАЗВИТИИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У КРЫС ЛИНИИ НИСАГ

03.03.01. – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2017

Работа выполнена в лаборатории эволюционной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск).

Научный руководитель – Аркадий Львович Маркель, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эволюционной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск).

Официальные оппоненты:

Вера Георгиевна Селятицкая, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией эндокринологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (г. Новосибирск);

Ольга Павловна Черкасова, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией лазерной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института лазерной физики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск).

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в _____часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (630117, а/я 237, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4, тел. (383)335-98-01, факс (383)335-97-54, эл. почта: dissovet@physiol.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИФФМ» и на сайте http://www.physiol.ru/.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук В.Н. Мельников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Первичная (эссенциальная) артериальная гипертензия (АГ) является хроническим полигенным заболеванием, приводящим в конечном итоге к нарушениям функций сердечно-сосудистой системы и почек (Fudim, Vemulapalli, 2016). Этиология и ранний патогенез первичной АГ до сих пор вызывают много вопросов, несмотря на то, что основные механизмы регуляции артериального давления (АД) достаточно хорошо известны. Одним из ключевых факторов развития первичной АГ признан психоэмоциональный стресс (Hudzinsky et al., 1988; Steptoe, 2008). Однако, при моделировании гипертензивных состояний оказалось, что стрессорные воздействия не всегда приводят к стойкому повышению АД (Nalivaiko, 2011). Таким образом, возникло представление о необходимости для формирования стойкой АГ сочетания психоэмоционального стресса с наличием генетической предрасположенности к развитию гипертензии.

В Институте цитологии и генетики СО РАН была разработана модель стресс-индуцированной артериальной гипертензии – линия крыс НИСАГ (ISIAH), полученная путем селекции на повышение АД в ответ на мягкий эмоциональный стресс (Markel, 1992). Аббревиатура НИСАГ расшифровывается как "наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия", ISIAH, соответственно – "inherited stress-induced arterial hypertension".

Помимо наличия повышенной реакции АД на стресс у крыс НИСАГ в процессе селекции произошло повышение базального АД, измеренного у наркотизированных крыс, когда действие психоэмоционального стресса на уровень АД практически исключалось. Это говорит о том, что повышенная чувствительность к стрессу способна стать причиной не только острого повышения АД во время действия стрессовой стимуляции, но и развития стойкого гипертензивного состояния в последующем. Дальнейшие исследования показали, что наряду с повышенным АД у крыс НИСАГ имеется множество других признаков, отличающих их от нормотензивных крыс линии WAG (Wistar Albino Glaxo). Показано, что эти отличия крыс НИСАГ являются характерными для гипертонической болезни и включают изменения массы сердца и почек, функции эндокринных систем, в частности, симпатоадреналовой и гипофизарно-адренокортикальной (Redina et al., 2006; Markel et al., 2007; Antonov et al., 2016), а также изменения картины ЭКГ, гипертрофию левого желудочка и стенок малых артерий, гистологические изменения в тканях почек и надпочечников (Markel et al., 1999; Шмерлинг и др., 2001; Yakobson et al., 2007).

Повышение АД является основным проявлением эссенциальной (первичной) гипертонии. Каковы бы ни были первичные механизмы возникновения АГ (повышенная стресс-чувствительность регуляторных нервных центров, повышение активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, нарушение водно-солевого баланса в организме), в конечном счёте повышение АД определяется величиной сердечного выброса и сосудистым сопротивлением, изменения которых и составляют гемодинамическую основу повышения АД. Отсюда можно заключить, что гемодинамические характеристики при АГ, в частности, параметры периферического и органного кровотока, могут быть индикатором развития и особенностей патогенеза заболевания, что имеет существенное значение при выборе наиболее рациональных и эффективных способов терапии.

Также представляет интерес изучение нейрохимических характеристик головного мозга в процессе развития АГ, поскольку при стойком повышении АД происходят определённые изменения в функционировании мозговых центров регуляции уровня АД. Эти изменения могут быть как результатом развития гипертензивного состояния, так и создавать, в свою очередь, определённую этиологическую базу для него, особенно при стресс-зависимой гипертонии.

Цель исследования – выявление взаимосвязей метаболических характеристик головного мозга с показателями гемодинамики в процессе онтогенетического становления артериальной гипертонии у крыс линии НИСАГ (ISIAH) для выяснения роли центральных нервных и периферических гемодинамических механизмов регуляции АД при наследственной стресс-чувствительной артериальной гипертензии.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1) исследование параметров гемодинамики – АД и кровотока по магистральным артериям у крыс линий НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 мес.;
2) исследование относительного содержания отдельных метаболитов в области префронтальной коры и в гипоталамусе крыс НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 мес.;
3) анализ возрастных и линейных особенностей гемодинамических показателей и метаболических характеристик головного мозга у крыс линий НИСАГ и WAG.

Научная новизна работы. В данной работе впервые были применены методы магнитно-резонансной томографии (МРТ) для изучения развития артериальной гипертензии (АГ) у крыс. В эксперименте были изучены одни и те же животные в возрасте сначала 1 мес., затем – 3 мес., что позволило получить данные об изменениях изучаемых параметров, сопровождающих развитие АГ, в онтогенезе крыс НИСАГ. Применение МРТ позволило визуализировать основные отделы мозга крыс и магистральные сосуды. Впервые магнитно-резонансная ангиография для оценки гемодинамики и протонная магнитно-резонансная спектроскопия для оценки уровня метаболитов в коре головного мозга и гипоталамусе использовались параллельно и в динамике на крысах гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG. Последние использованы в качестве контроля. Впервые были получены данные о наличии корреляционных связей между метаболическими показателями гипоталамуса и гемодинамическими параметрами, сопровождающими развитие АГ: систолическое и диастолическое АД положительно коррелировали с содержанием холина в гипоталамусе, а скорость кровотока в почечных артериях положительно коррелировала с содержанием в гипоталамусе возбудительного медиатора – глутамата, и отрицательно – с тормозным медиатором ГАМК.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Результаты исследования дополняют картину развития АГ у крыс линии НИСАГ. Методы магнитно-резонансной ангиографии и спектроскопии показали высокую информативность; учитывая неинвазивность данных методов и отсутствие необходимости во введении контрастных веществ, а также возможность проведения динамических исследований, можно ожидать их широкое распространение в экспериментальной и клинической практике.

Положения, выносимые на защиту

1) У крыс линии НИСАГ относительная объемная скорость кровотока в бассейне почечных артерий, нормализованная по массе тела, увеличивается с возрастом. У нормотензивных

крыс линии WAG кровоток в бассейне почечных артерий с возрастом не меняется, однако происходит снижение относительных величин кровотока в сонных артериях; у крыс НИСАГ не наблюдается возрастного снижения кровотока в сонных артериях. Такие изменения гемодинамики у крыс НИСАГ могут быть обусловлены необходимостью поддерживать физиологические параметры функции почки и структур головного мозга (в частности, гипоталамуса) в условиях развития артериальной гипертензии.

2) В гипоталамусе крыс линии НИСАГ по мере взросления и повышения АД наблюдалось изменение баланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в пользу возбуждающих, тогда как у нормотензивных крыс линии WAG соотношение возбуждающих и тормозных медиаторов в гипоталамусе оставалось постоянным.

3) Показано наличие взаимосвязей между гемодинамическими параметрами и показателями метаболизма отделах головного мозга, главным образом – в гипоталамусе. Поскольку гипоталамус является одним из основных мозговых центров нейроэндокринной регуляции АД, предполагается, что перестройка гемодинамических параметров, происходящая в процессе развития АГ у крыс линии НИСАГ, обусловлена, в частности, изменениями в содержании нейрометаболитов в гипоталамусе.

Апробация работы. Материалы диссертации обсуждались на XII Международной конференции студентов и молодых ученых (Томск, 2015), VIII Всероссийском с международным участием конгрессе молодых учёных-биологов «Симбиоз – Россия 2015» (Новосибирск, 2015), Российской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина» (Екатеринбург, 2016), XI Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2016), Международной конференции «Беляевские чтения» (Новосибирск, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, включая 4 статьи.

Структура диссертации. Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы, список цитируемой литературы. Работа изложена на 95 страницах, содержит 19 рисунков, 10 таблиц, список цитируемой литературы включает 178 ссылок.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность сотруднику ИЦиГ СО РАН Шевелеву О.Б. за помощь в получении первичных данных. Кроме того, автор признателен сотрудникам Института за помощь и поддержку: к.б.н. Рединой О.Е., к.б.н. Акулову А.Е., д.б.н. Мошкину М.П.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Объектом исследования были 10 самцов крыс гипертензивной линии НИСАГ и 8 самцов крыс линии WAG. Крысы WAG участвовали в эксперименте в качестве нормотензивной контрольной группы. Исследование было выполнено на базе ЦКП «SPF-виварий ИЦиГ СО РАН». Условия тестирования и содержания животных отвечали международным стандартам GMP (Good Manufacturing Practice) и GLP (Good Laboratory Practice), а также соответствовали правилам Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

В соответствии с задачами эксперимента у всех исследуемых животных дважды (в возрасте 1 мес. и 3 мес.) проводили мониторинг АД, а также регистрацию параметров кровотока с применением магнитно-резонансной ангиографии и оценку распределения метаболитов в головном мозге с помощью протонной магнитно-резонансной спектроскопии.

Для общей оценки параметров гемодинамики были выбраны магистральные сосуды – брюшная аорта, почечные и сонные артерии. Кровоснабжение почки играет ключевую роль в механизмах регуляции АД, кровоток в сонных артериях отражает интенсивность кровоснабжения мозга, кровоток в бассейне брюшной аорты отражает состояние общего сосудистого сопротивления.

Для анализа распределения метаболитов в головном мозге были выбраны два отдела: гипоталамус, как одно из важнейших звеньев нейроэндокринной регуляции уровня АД, и префронтальная кора головного мозга, в которой осуществляются процессы высшей нервной деятельности – поскольку модель АГ, которая представлена линией НИСАГ, воспроизводит не только генетическую предрасположенность к повышению АД, но и влияние психоэмоционального стресса на формирование АГ.

Были проанализированы следующие метаболиты в гипоталамусе и префронтальной коре головного мозга: N-ацетиласпартат, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), аланин, аспартат, холиновые соединения, креатин и фосфокреатин, глутамат и глутамин, мио-инозитол, таурин, глицин, лактат, фосфорилэтаноламин. Выбор метаболитов для анализа, детектируемых методом магнитно-резонансной спектроскопии, позволял оценить соотношение возбуждающих (глутамат, аспартат) и тормозных медиаторов (ГАМК, глицин, таурин), активность энергетических (креатин и фосфокреатин, мио-инозитол) и синтетических (N-ацетиласпартат, фосфорилэтаноламин, аланин) процессов, уровень миелинизации (холин) и степень ишемии (лактат) (Govindaraju et al., 2000).

Измерение артериального давления. Мониторинг АД проводили с использованием прибора для неинвазивного многоканального измерения АД CODA™ Kent Scientific методом tail-cuff. При измерении АД животные не подвергались анестезии, поэтому для получения адекватных значений исследуемых параметров проводили адаптационные циклы измерений. Визуализацию и обработку данных производили с использованием программного обеспечения прибора.

Магнитно-резонансная ангиография. При проведении магнитно-резонансной ангиографии использовали горизонтальный томограф с напряженностью магнитного поля 11,7 Тл (Bruker, Biospec 117/16 USR). Во время томографических измерений крысы находились под изофлюрановым наркозом. Послойную визуализацию внутренних органов крыс производили с использованием методов FISP и FLASH. 3D-визуализация кровеносных сосудов осуществлялась с применением метода TOF-MRA. Для получения значений линейной скорости кровотока в исследуемых сосудах использовали метод FLOWMAP (Firmin et al., 1990).

Снимки, полученные с помощью метода FLOWMAP, содержали информацию о линейной скорости кровотока по следующим крупным артериям: брюшная аорта ниже отхождения почечных артерий, правая и левая почечные артерии, правая и левая общие сонные артерии. Диаметр сосудов определяли по снимкам FISP и FLASH. Из этих данных рассчитывали значения объемной скорости кровотока (ОСК) для каждого сосуда по формуле: $ОСК=v\cdot\pi\cdot r^2$ (мл/мин), где v – значение линейной скорости кровотока, r – внутренний радиус

поперечного сечения сосуда. Полученные данные использовали для оценки периферического сосудистого сопротивления (ПСС) в соответствующем сосудистом бассейне: $ПСС=АД_{ср}/ОСК$ (мм рт. ст.·мин/мл), где среднее артериальное давление вычисляли по формуле - $АД_{ср}=дАД+(сАД–дАД)/3$; *сАД* и *дАД* – соответственно систолическое и диастолическое артериальное давление. Значения ОСК и ПСС были нормализованы на 100 г массы тела.

Протонная магнитно-резонансная спектроскопия. Анализ соотношения метаболитов головного мозга проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11,7 Тл (Bruker, Biospec 117/16 USR). Во время проведения МР-спектроскопии крысы находились под наркозом (изофлюран). Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей методом RARE, с параметрами импульсной последовательности TE = 11 мсек, TR = 2,5 сек, были сняты T2-взвешенные изображения головного мозга крысы высокого разрешения (толщина среза 0,5 мм, полем обзора 2,5×2,5 см и размером матрицы 256×256 точек). Все протонные спектры получены с помощью пространственно-локализованной одновоксельной спектроскопии методом STEAM с параметрами импульсной последовательности TE = 3 мсек, TR = 5 сек и количеством накоплений 100.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 8. Межгрупповое сравнение данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями по фактору возраста и post-hoc анализа с применением критерия Фишера. Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего (M±SEM). Методом Спирмена был проведён анализ корреляций между исследуемыми параметрами.

Межгрупповые различия в соотношении метаболитов головного мозга проанализированы также с помощью методов многомерной статистики. Метод главных компонент (PCA, Principal Component Analysis) позволил выявить факторы (оси), отражающие наибольшую дисперсию исследуемых параметров. Физиологическая интерпретация полученных главных компонент осуществлялась путём анализа функциональных характеристик метаболитов, делающих максимальные нагрузки (loadings) на соответствующие оси. Межлинейные и межвозрастные различия в исследуемых группах животных оценивались с помощью критерия хи-квадрат по собственным значениям (eigenvalues) по каждой оси.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Систолическое АД, а также рассчитанное среднее динамическое АД гипертензивных крыс линии НИСАГ достоверно повышались в онтогенезе, тогда как у нормотензивных крыс линии WAG эти показатели практически не изменялись с возрастом (Табл. 1).

Объёмная скорость кровотока (ОСК). В почечных артериях 1-месячных крыс НИСАГ наблюдалось снижение удельной объёмной скорости кровотока (ОСК), нормализованной по массе тела, по сравнению с ОСК в почечных артериях 1-месячных крыс WAG ($p<0,05$), однако в возрасте 3 месяцев межлинейные различия не были достоверными (Рис. 1). Удельный кровоток в сонных артериях крыс НИСАГ увеличивался по мере взросления, но достоверных возрастных отличий выявлено не было, в то время как у крыс WAG отмечено снижение с возрастом. Таким образом, изменения в интенсивности кровоснабжения в онтогенезе крыс линии НИСАГ отличаются от тех, что имеют место у нормотензивных крыс WAG, что, скорее всего, связано с развитием гипертензивного статуса у крыс НИСАГ.

Периферическое сосудистое сопротивление (ПСС). В сонных артериях крыс НИСАГ, как и в почечных артериях обеих линий, с возрастом удельное ПСС снижается, при этом оставаясь повышенным у НИСАГ по отношению к WAG. Только в брюшной аорте крыс WAG наблюдается повышение удельного ПСС не только с возрастом, но и по сравнению с НИСАГ, по достижении трехмесячного возраста (Рис. 2).

Табл. 1. Масса тела и АД самцов крыс линии НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 месяцев.

Показатель	НИСАГ		WAG	
	1 месяц	3 месяца	1 месяц	3 месяца
Масса тела, г	159,10±4,55	333,50±4,48###	160,63±3,06	328,13±4,72###
сАД, мм рт.ст.	154,54±3,65	175,50±3,11###	121,49±3,21***	123,75±3,63***
дАД, мм рт.с.т	105,27±2,18	111,50±3,42	89,48±4,38**	81,88±2,66***
срАД, мм рт.ст.	121,70±1,57	132,83±3,19##	100,15±3,61***	95,83±2,92***

сАД – систолическое АД, дАД – диастолическое АД,
ср. АД – среднее АД, ср. АД=дАД+(сАД–дАД)/3.
*** – межлинейные различия, p<0,001; ** – межлинейные различия, p<0,01;*
– межвозрастные различия, p<0,001; ## – межвозрастные различия, p<0,01.*

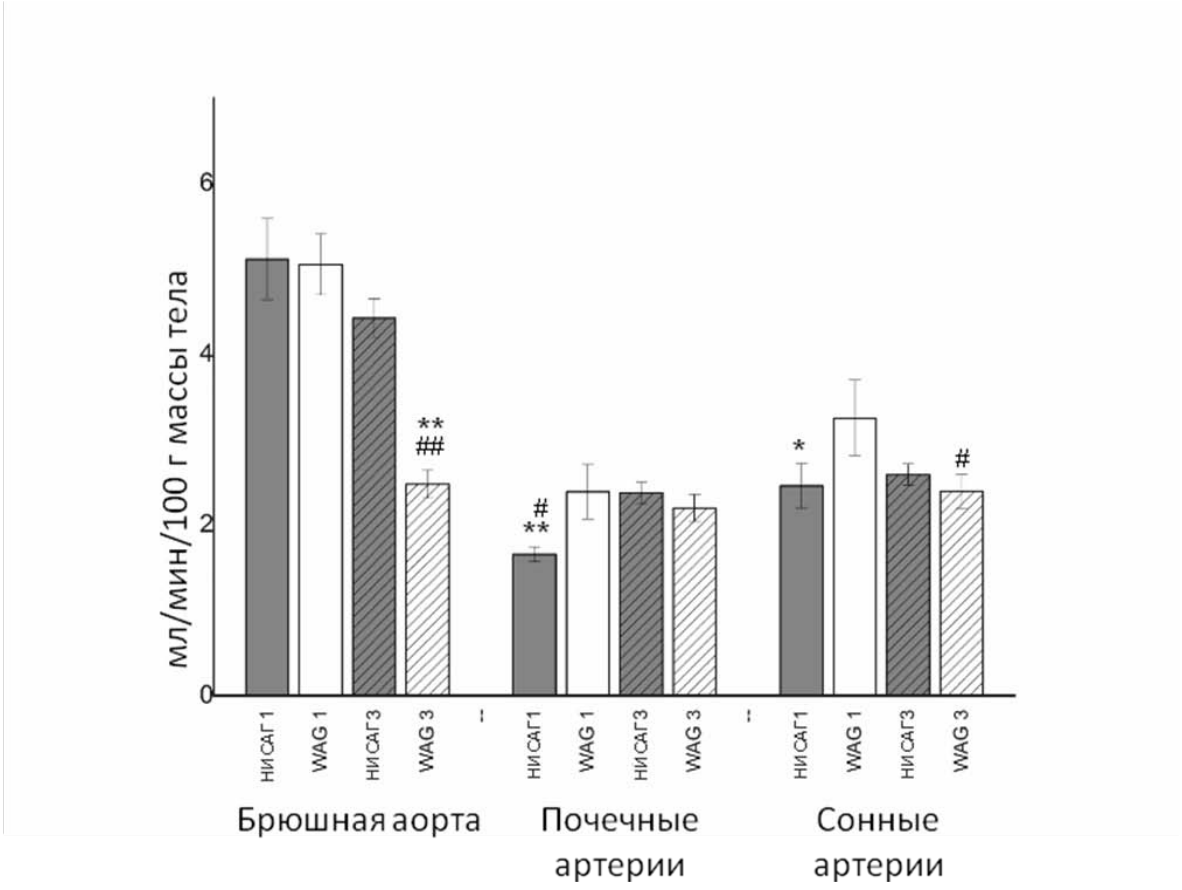


Рис. 1. Удельная объёмная скорость кровотока (ОСК) в крупных сосудах самцов крыс линии НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 месяцев. Значения ОСК даны в пересчёте на 100 г массы тела.

*** – межлинейные различия в возрастных группах, p<0,01; * – межлинейные различия в возрастных группах, p<0,05;*

– межвозрастные различия для каждой линии, p<0,01; # – межвозрастные различия для каждой линии, p<0,05.

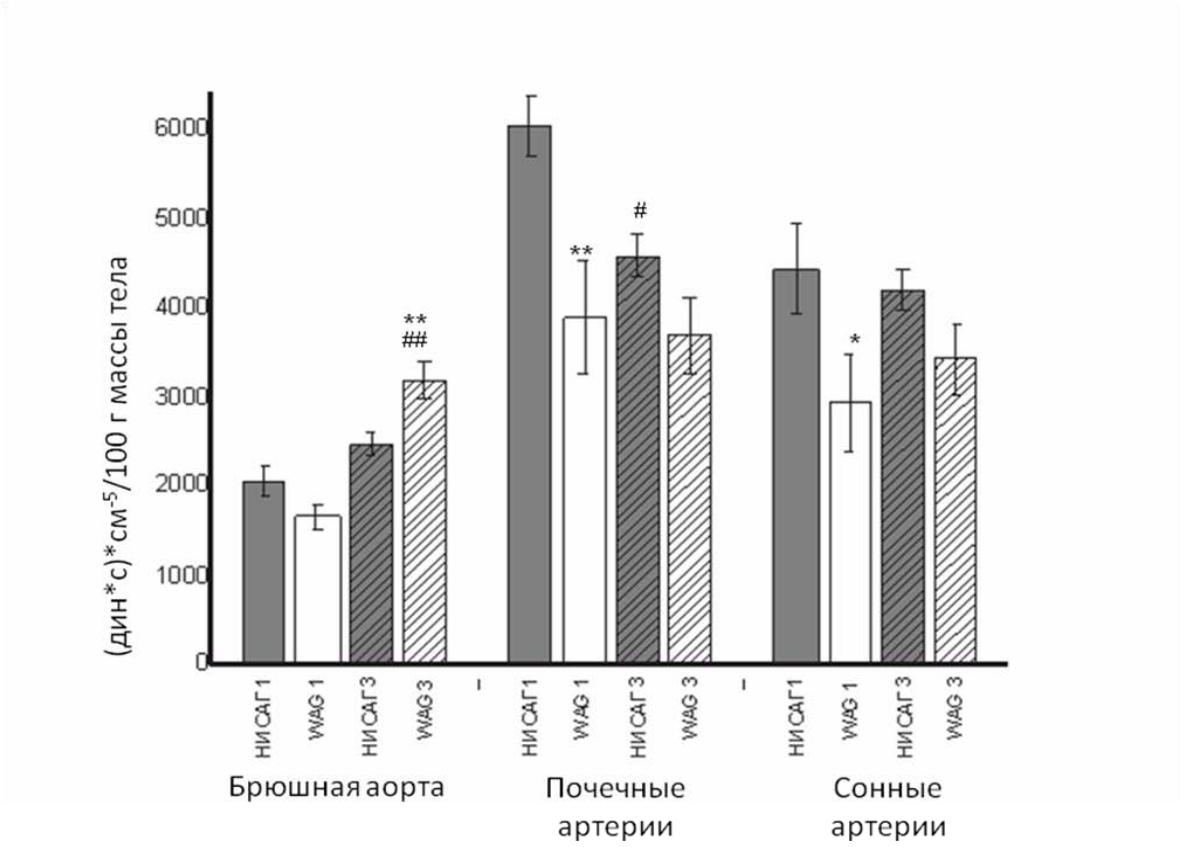


Рис.2. Удельное периферическое сосудистое сопротивление (ПСС) в бассейнах крупных сосудов самцов крыс линии НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 месяцев. Значения ПСС даны в пересчёте на 100 г массы тела.

*** – межлинейные различия в возрастных группах, p<0,01; * – межлинейные различия в возрастных группах, p<0,05.*

– межвозрастные различия для каждой линии, p<0,01; # – межвозрастные различия для каждой линии, p<0,05.

Метаболические изменения в префронтальной коре головного мозга крыс линий НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 месяцев. Дисперсионный анализ уровней метаболитов в коре головного мозга крыс НИСАГ и WAG с учётом повторных измерений не выявил достоверных различий, обусловленных влиянием фактора линии на сопутствующие взрослению изменения уровней метаболитов (Табл. 2). Фактор возраста, однако, оказывал достоверное влияние на повышение содержания креатина и фосфокреатина в коре головного мозга у трёхмесячных крыс WAG ($F_{1,15}$=7,16; p<0,05).

Табл. 2. Индивидуальные значения уровней метаболитов (в % от общего содержания всех исследуемых метаболитов) в префронтальной коре головного мозга крыс НИСАГ и WAG.

Метаболиты в префронтальной коре	НИСАГ 1 месяц	НИСАГ 3 месяца	WAG 1 месяц	WAG 3 месяца
NAA %	17.59±1.07	17.28±0.47	16.28±0.74	19.73±1.14
GABA %	6.33±1.40	4.02±0.85	6.00±0.62	3.82±1.41
Ala %	5.50±1.38	5.99±1.59	5.79±1.64	5.51±1.26
Asp %	0.16±0.06	0.25±0.10	0.26±0.16	0.32±0.21
Cho %	0.90±0.15	0.91±0.21	0.69±0.15	1.09±0.38
Cr+PCr %	11.85±0.99	13.15±0.75	11.98±0.89	15.70±0.61#
Glu+Gln %	15.63±1.59	16.64±1.65	13.78±1.17	17.20±1.02
Ins %	4.39±0.94	7.47±2.15	5.49±1.80	8.11±1.62
Tau %	4.82±0.33	3.69±0.56	3.83±0.53	4.17±0.44
Gly %	13.95±2.61	13.89±3.11	15.06±3.37	10.53±3.65
Lac %	6.09±1.32	7.34±1.62	8.51±1.90	6.27±1.62
PEA %	12.79±1.59	9.36±1.29	12.33±2.29	7.54±2.19

*** – межлинейные различия, p<0,01; * – межлинейные различия, p<0,05.*
– межвозрастные различия, p<0,01; # – межвозрастные различия, p<0,05.
NAA – N-ацетиласпартат; GABA – гамма-аминомасляная кислота; Ala – аланин; Asp – аспартат; Cho – холиновые соединения; Cr и PCr – креатин и фосфокреатин; Glu и Gln – глутамат и глутамин; Ins – мио-инозитол; Tau, таурин;Gly – глицин; Lac, лактат; PEA – фосфорилэтаноламин.

Метаболические изменения в гипоталамусе крыс линий НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 месяцев. Дисперсионный анализ уровней метаболитов в гипоталамусе головного мозга крыс НИСАГ и WAG с учётом повторных измерений обнаружил достоверное (p<0,01) снижение концентрации ГАМК в гипоталамусе крыс линии НИСАГ с возрастом (у крыс WAG возрастное снижение ГАМК также происходит, но оно статистически недостоверно). Уровень холина у крыс линии НИСАГ достоверно повышен при сравнении с WAG в возрасте 1 месяца (p<0,01), однако в трёхмесячном возрасте содержание холина в гипоталамусе крыс НИСАГ снижается (p<0,05). Уровень фосфорилэтаноламина в гипоталамусе крыс линии НИСАГ повышается с возрастом почти в два раза (p<0,05) (Табл. 3).

Табл. 3. Индивидуальные значения уровней метаболитов (в % от общего содержания всех исследуемых метаболитов) в гипоталамусе крыс НИСАГ и WAG.

Метаболиты в гипоталамусе	НИСАГ 1 месяц	НИСАГ 3 месяца	WAG 1 месяц	WAG 3 месяца
NAA %	11.65±0.51	10.94±0.80	12.94±0.83	13.48±1.89

GABA %	4.80±0.96	1.34±0.65##	3.32±0.71	2.16±0.92*
Ala %	6.42±1.39	2.96±0.82	3.83±1.24	3.62±1.27
Asp %	3.99±1.36	1.43±0.43	2.29±1.21	1.02±0.49
Cho %	2.16±0.29	1.65±0.29	1.08±0.23**	0.79±0.31*
Cr+PCr %	12.21±1.09	14.73±1.36	12.76±1.06	12.19±1.47
Glu+Gln %	19.06±1.35	25.24±2.65	19.63±1.89	20.99±2.13
Ins %	10.63±2.30	10.94±1.97	11.38±2.31	11.90±2.11
Tau %	2.33±0.53	2.81±0.63	3.59±1.01	1.43±0.56
Gly %	12.57±3.58	9.43±3.70	10.63±3.69	11.13±4.32
Lac %	5.94±1.15	3.68±1.40	5.01±1.65	2.36±1.00
PEA %	8.24±2.29	14.87±2.37#	13.55±2.07	18.93±3.05

Примечания – см. Табл. 2.

Изучение корреляций между гемодинамическими параметрами и нейрохимическими характеристиками мозга. Общий корреляционный анализ (методом Спирмена) позволил выявить некоторые взаимосвязи между исследуемыми характеристиками гемодинамики и нейрометаболизма.

Систолическое АД имеет положительную корреляцию с содержанием холиновых соединений в гипоталамусе (который, в свою очередь, ассоциирован с тормозными влияниями, опосредованными ГАМК), а также отрицательную корреляцию с уровнем аспартата в коре головного мозга, который связан с показателями активности энергетических процессов – N-ацетиласпартатом и креатином (Рис. 3).

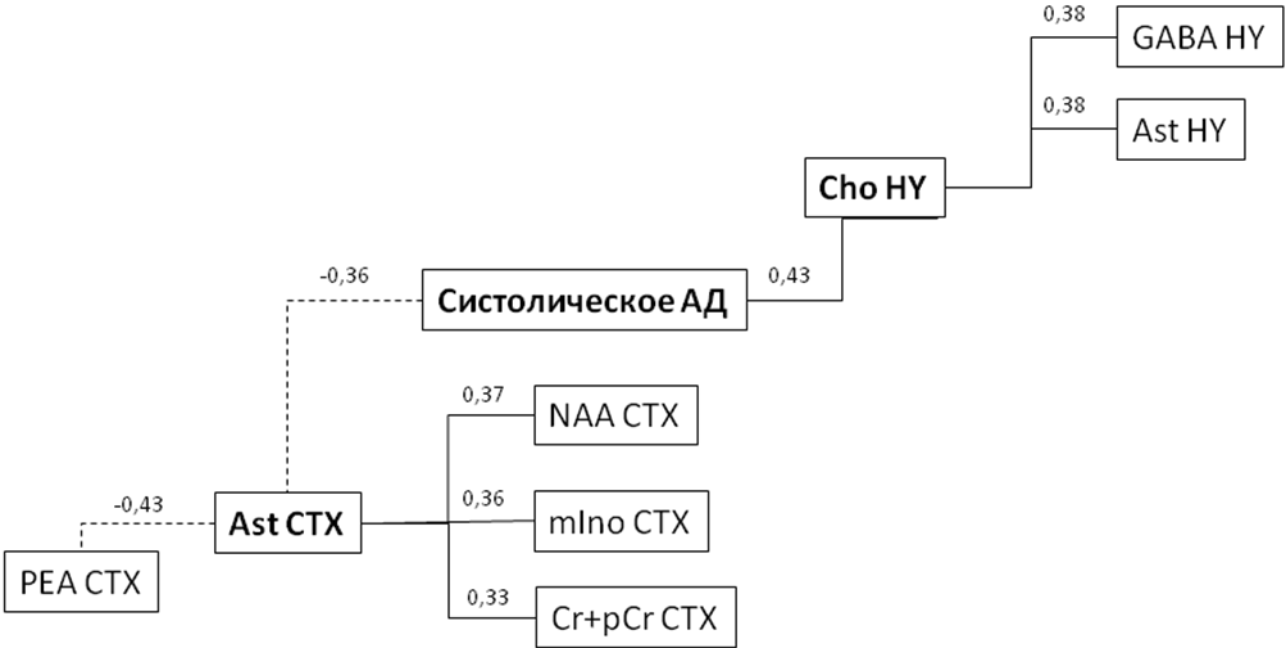


Рис. 3. Корреляционные взаимосвязи между величиной систолического АД и уровнями метаболитов в коре головного мозга и гипоталамусе самцов крыс НИСАГ и WAG в возрасте 1

и 3 месяцев. Приведены статистически значимые корреляции (с коэффициентами вдоль соответствующих линий), сплошной линией обозначены положительные корреляции, пунктирной – отрицательные.
Метаболиты коры головного мозга: Ast CTX – аспартат; NAA CTX – N-ацетиласпартат; mIno CTX – мио-инозитол; Cr+pCr CTX – креатин и фосфокреатин; PEA CTX – фосфорилэтаноламин.
Метаболиты гипоталамуса: Cho HY – холиновые соединения; GABA HY – ГАМК; Ast HY – аспартат.

Скорость кровотока в почечных артериях имеет положительную корреляцию с уровнем возбуждающего нейромедиатора глутамата в гипоталамусе, который, в свою очередь, положительно коррелирует с креатином и фосфокреатином гипоталамуса и глутаматом в коре головного мозга. Также для величины скорости кровотока в почечных артериях обнаружена отрицательная корреляция с холином и ГАМК в гипоталамусе (Рис. 4).

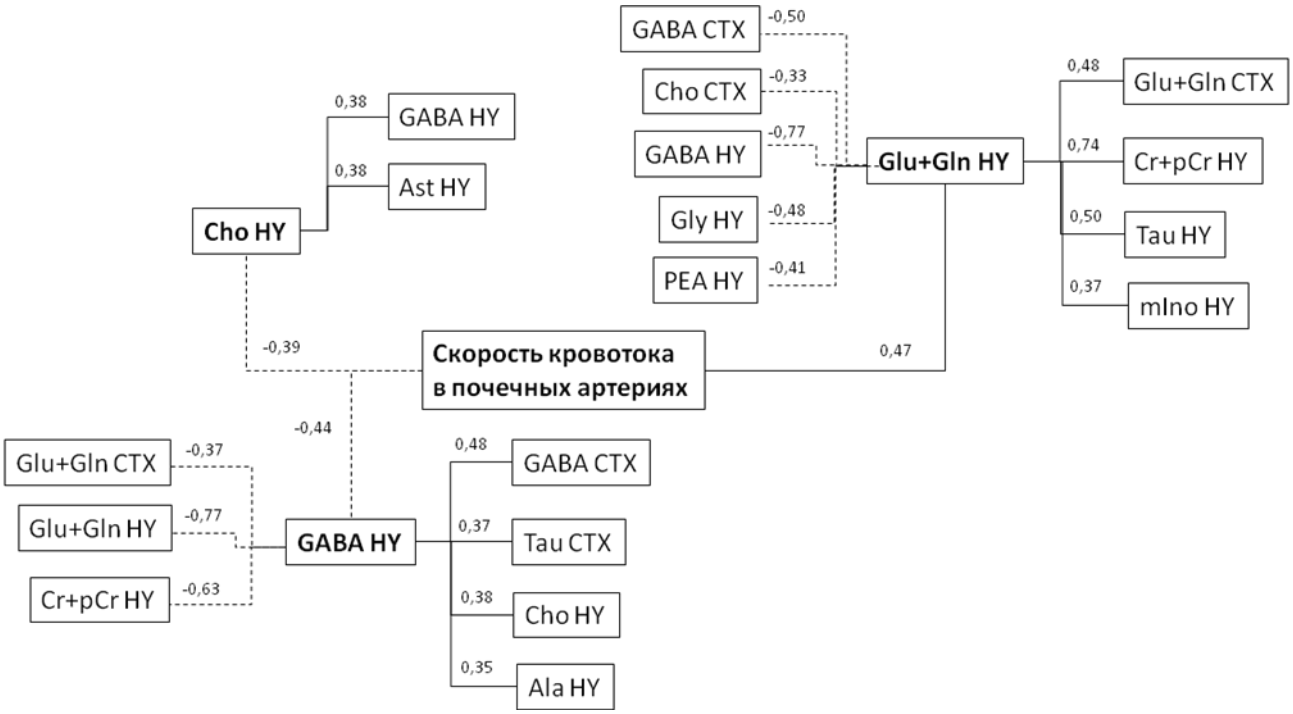


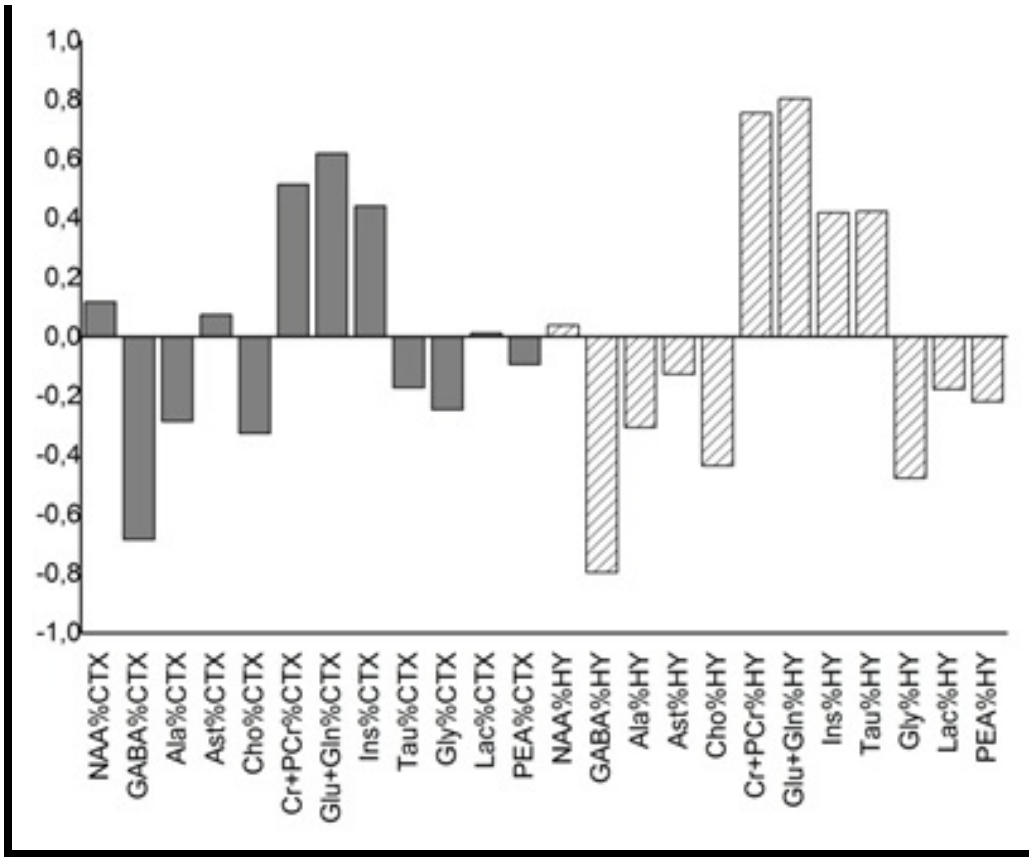
Рис. 4. Корреляционные взаимосвязи между величиной объёмной скорости кровотока в почечных артериях и уровнями метаболитов в коре головного мозга и гипоталамусе самцов крыс НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 месяцев. Приведены статистически значимые корреляции (с коэффициентами вдоль соответствующих линий), сплошной линией обозначены положительные корреляции, пунктирной – отрицательные.
Метаболиты коры головного мозга: Glu+Gln CTX – глутамат и глутамин; GABA CTX – гамма-аминомасляная кислота; Cho CTX – аланин; Tau CTX – таурин.
Метаболиты гипоталамуса: Cho HY – холиновые соединения; GABA HY – гамма-аминомасляная кислота; Glu+Gln HY – глутамат и глутамин; Cr+pCr HY – креатин и фос-

фокреатин;Gly HY – глицин; Tau HY – таурин; mIno HY – мио-инозитол; Ast HY – аспартат; PEA HY – фосфорилэтаноламин; Ala HY – аланин.

Анализ соотношения концентраций метаболитов в префронтальной коре головного мозга и гипоталамусе крыс линий НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 месяцев. Анализ данных по распределению метаболитов в головном мозге исследуемых животных методом главных компонент выявил три основных фактора (оси), в совокупности отвечающих за 43,7% общей вариации уровней метаболитов.

Первый фактор (компонента) берёт на себя 18,0% общей дисперсии уровней метаболитов в исследуемых отделах головного мозга крыс НИСАГ и WAG. (Рис. 5-А). Максимальные положительные нагрузки на эту компоненту, как в коре головного мозга, так и в гипоталамусе, дают креатин и глутамат, максимальную отрицательную – ГАМК. На основании этого можно предположить, что положительная часть данной компоненты соответствует преобладанию возбуждающих нейромедиаторов (глутамат) и активации энергетических процессов (креатин), отрицательная сопряжена с активностью тормозящих медиаторов (ГАМК).

Вторая компонента берёт на себя 15,2% дисперсии исследуемых признаков (Рис. 5-Б). Максимальные значения нагрузок обнаружены для фосфорилэтаноламина, причём в коре головного мозга это значение положительно, а в гипоталамусе отрицательно. Также наблюдается положительный вклад в данную компоненту возбуждающих влияний метаболитов в гипоталамусе и отрицательный вклад возбуждающих влияний в коре головного мозга.



А.

Б.

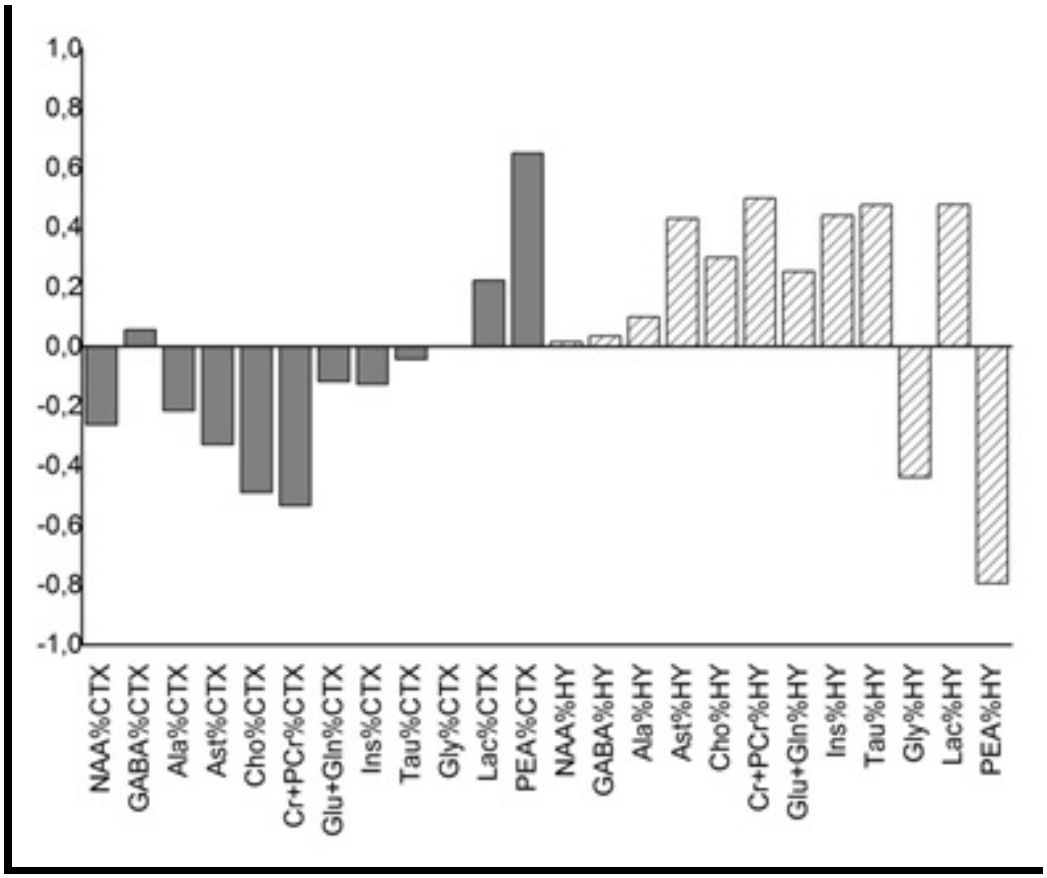


Рис. 5. Характеристика первой и второй компоненты, отражающих 33,2% дисперсии уровней метаболитов в коре головного мозга и гипоталамусе крыс НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 мес.

А – нагрузки уровней отдельных метаболитов на первую компоненту; Б – нагрузки уровней отдельных метаболитов на вторую компоненту; CTX – кора головного мозга, HY – гипоталамус; NAA – N-ацетиласпартат; GABA – гамма-аминомасляная кислота; Ala – аланин; Asp – аспартат; Cho – холиновые соединения; Cr и PCr – креатин и фосфокреатин; Glu и Gln – глутамат и глутамин; Ins – мио-инозитол; Tau, таурин;Gly – глицин; Lac, лактат; PEA – фосфорилэтаноламин.

По значениям нагрузок значений исследуемых метаболитов первую компоненту можно обозначить как соотношение процессов возбуждения и торможения в головном мозге, а вторая компонента свидетельствует о различиях в распределении возбудительных и тормозных процессов в коре и гипоталамусе (региональная специфичность по отделам мозга).

Третья компонента, отражающая 10,5% изменчивости уровней метаболитов головного мозга, не рассматривалась в итоговом анализе, т.к. распределение нагрузок метаболитов на данную компоненту дополняет две предыдущие компоненты.

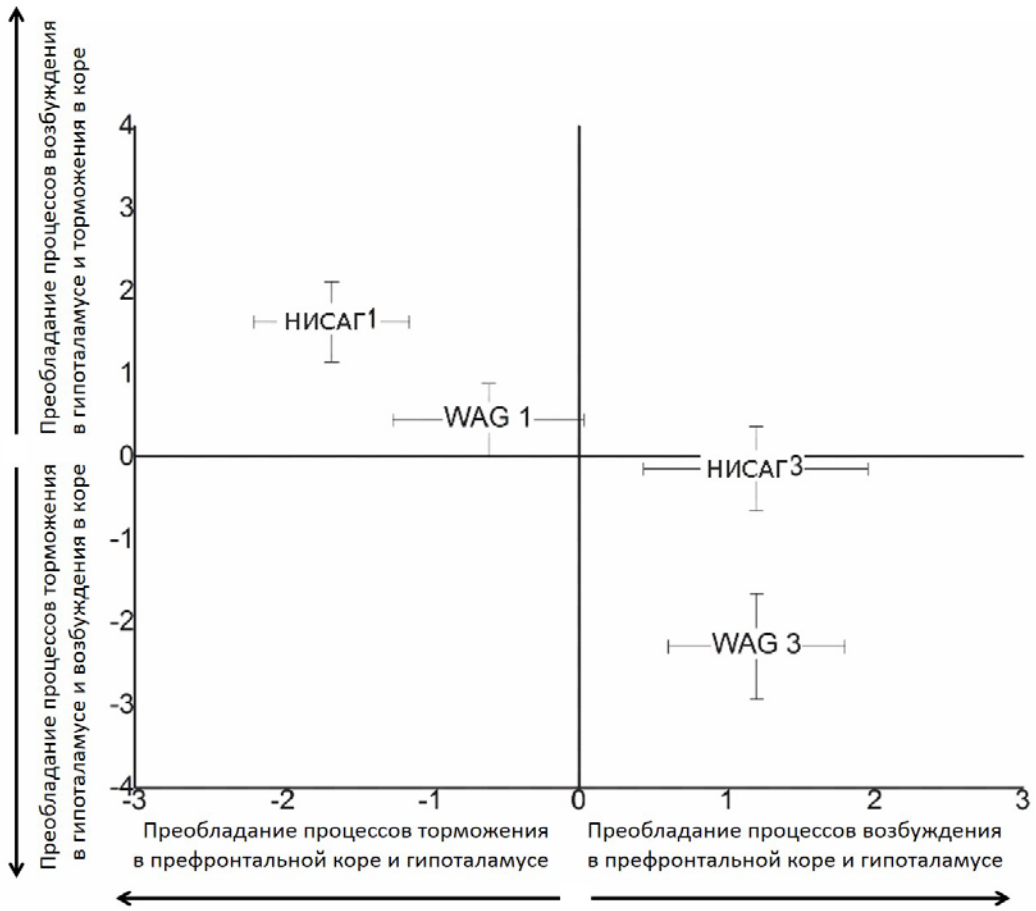


Рис. 6. Распределение собственных средних значений, характеризующих распределение крыс линии НИСАГ и WAG в возрасте 1 и 3 месяцев в координатах первой и второй компонент. *НИСАГ 1 – одномесячные крысы линии НИСАГ; НИСАГ 3 – трехмесячные крысы линии НИСАГ; WAG 1 – одномесячные крысы линии WAG; WAG 3 – трехмесячные крысы линии WAG.*

Распределение крыс в координатах первой и второй компонент показывает, что по первой компоненте животные кластеризуются по возрасту, а по второй компоненте – по генотипу (Рис. 6). У крыс WAG, в отличие от крыс НИСАГ, наблюдается преобладание энергетической активности и возбуждающих влияний в коре головного мозга, и это различие усиливается с возрастом. У гипертензивных крыс НИСАГ заметно преобладает активность гипоталамуса по сравнению с корой, в то время как у нормотензивных крыс WAG возбуждающие влияния в гипоталамусе, напротив, ослабевают с возрастом. Такое различие в соотношении возбуждающих и тормозных процессов в гипоталамусе можно связать с развитием и поддержанием у крыс линии НИСАГ повышенного нейроэндокринного тонуса, связанного с развитием гипертензивного статуса.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нормализованный по массе тела кровоток в сонных артериях крыс НИСАГ незначительно увеличивается с возрастом, у крыс WAG с возрастом он достоверно снижается. Таким образом, кровоснабжение бассейна сонных артерий у крыс линии НИСАГ в возрасте трёх месяцев оказывается более значительным, чем у крыс WAG того же возраста. При этом диаметр сосудов у крыс НИСАГ и WAG в возрасте 3 месяцев не различается, то есть кровоток увеличивается за счет повышения АД. Причину повышения кровотока в сонных артериях крыс НИСАГ можно понять из данных, полученных при МРТ-спектроскопии. Эти данные свидетельствуют, что у крыс линии НИСАГ по мере взросления увеличивается энергетическая активность гипоталамуса, увеличивается доля возбуждающих нейромедиаторов. Можно предположить, что повышение кровотока в общих сонных артериях взрослых крыс НИСАГ призвано обеспечить повышенную функциональную активность и энергетические траты гипоталамуса. У крыс линии НИСАГ в гипоталамусе обнаружена повышенная экспрессия 18 дифференциально экспрессирующихся генов, ассоциированных с артериальной гипертензией и повышенными энергетическими затратами, в том числе генов *Ephx2, Cst3, Ltbp2, Cyp11b1* и *Cyp11b2* (Klimov et al., 2016). Ограничение кровотока по общим сонным артериям крыс путем наложения лигатуры приводит к патологическим изменениям в различных структурах головного мозга, особенно в гипоталамусе, что свидетельствует об особой чувствительности гипоталамуса к дефициту кровоснабжения (Tsuchiya et al., 1991). Таким образом, поддержание кровоснабжения гипоталамуса имеет существенное значение в условиях развития артериальной гипертензии, чем можно объяснить отсутствие у крыс линии НИСАГ наблюдаемого у нормотензивных крыс возрастного снижения кровотока в общих сонных артериях.

В раннем возрасте у крыс НИСАГ наблюдается сниженный по сравнению с крысами WAG кровоток в почечных артериях на фоне повышенного сосудистого сопротивления в почечном бассейне; далее в онтогенезе у крыс НИСАГ значительно увеличивается АД, и скорость кровотока в почечных артериях 3-месячных крыс НИСАГ достигает значений, близких к уровню почечного кровотока у крыс WAG того же возраста; почечный кровоток у нормотензивных крыс не изменяется с возрастом. При этом кровоток в брюшной аорте крыс НИСАГ, напротив, снижается по мере взросления. Кроме того, несмотря на происходящее в течение жизни крыс линии НИСАГ снижение периферического сосудистого сопротивления в бассейне почечных артерий, значения ПСС в почечных артериях крыс НИСАГ в обоих возрастах выше, чем у крыс WAG. Очевидно, повышение АД у крыс НИСАГ призвано сохранить на нормальном уровне почечный кровоток и почечные функции – прежде всего, фильтрацию, на физиологическом уровне, несмотря на развитие признаков нефросклероза. Происходит типичное для гипертонической болезни смещение установочной точки (set point), когда вследствие изменений почечных сосудов для обеспечения нормального уровня клубочковой фильтрации и выделительной функции почек необходимо значительное повышение перфузионного и, следовательно, системного АД.

При этом отмечено наличие положительной корреляции почечного кровотока с активацией возбуждающих процессов в гипоталамусе (с глутаматом) и отрицательную – с ГАМК. Снижение концентрации ГАМК в гипоталамусе крыс линии НИСАГ с возрастом

также указывает на преобладание возбудительных процессов над тормозными. ГАМК-ергическая система гипоталамуса оказывает ингибирующее действие на центральные и периферические механизмы осуществления стресс-реакции (Shekhar et al., 2003).

В настоящей работе было отмечено почти двукратное повышение уровня фосфорилэтаноламина в гипоталамусе крыс линии НИСАГ с возрастом. В литературе существуют работы по ингибированию ренина фосфолипидными соединениями (Sen et al., 1967; Oldham et al., 1984), в том числе фосфатидилом-Е, который является синтетическим аналогом фосфорилэтаноламина (Miyazaki et al., 1976). Из предыдущих исследований известно, у крыс линии НИСАГ понижена активность почечной РАС, что позволяет рассматривать линию НИСАГ как модель низкорениновой АГ (Amstislavsky et al., 2006; Дубинина, 2016).

Можно предположить, что низкорениновая форма гипертензии у крыс НИСАГ ассоциирована, в частности, с повышением уровня фосфорилэтаноламина в гипоталамусе; происходящим одновременно с развитием АГ у крыс НИСАГ, что, возможно, является одним из механизмов адаптации к высокому уровню АД. Развитие низкорениновой формы АГ связывают также с увеличением массы циркулирующей крови, что с большой вероятностью можно предположить у крыс линии НИСАГ, у которых гипертензия имеет гиперкинетический характер.

ВЫВОДЫ

1) У гипертензивных крыс НИСАГ наблюдается возрастное увеличение относительной величины кровотока в бассейне почечных артерий. Поскольку с возрастом у крыс НИСАГ также наблюдалось повышение АД, можно предположить, что возрастное увеличение сниженного в раннем возрасте по сравнению с нормотензивными крысами WAG почечного кровотока связано с необходимостью поддержания нормального уровня клубочковой фильтрации.

2) У гипертензивных крыс НИСАГ, в отличие от нормотензивных крыс WAG, не происходит возрастного снижения кровотока в сонных артериях, что, возможно, также имеет компенсаторный характер для поддержания высокого уровня возбудительных процессов и метаболизма в гипоталамусе крыс НИСАГ.

3) У гипертензивных крыс НИСАГ наблюдаются возрастные изменения содержания метаболитов в гипоталамусе (сдвиг соотношения возбуждающих нейромедиаторов и тормозных в сторону первых), в то время как у нормотензивных крыс WAG происходили подобные возрастные изменения в соотношении возбуждающих и тормозных нейромедиаторов, но в префронтальной коре головного мозга. Такое перераспределение интенсивности возбуждающих процессов в головном мозге может свидетельствовать об усиливающейся роли гипоталамуса в нейроэндокринной регуляции АД в ходе развития АГ у крыс НИСАГ.

4) Скорость кровотока в почечных артериях положительно коррелировала с содержанием возбудительного медиатора – глутамата в гипоталамусе, и отрицательно – с тормозным медиатором – ГАМК в гипоталамусе. Эти данные также говорят в пользу гипотезы о том, что в процессе формирования гипертензивного статуса у крыс НИСАГ гипоталамус играет ключевую роль в регуляции АД и поддержании кровоснабжения и фильтрации в почке.

5) Полученные данные свидетельствуют о наличии взаимосвязи гемодинамических изменений с нейрохимическими изменениями в центральной нервной системе при стресс-зависимой форме артериальной гипертонии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Антонов Е.В. и др. Стресс и артериальная гипертония: крысы линии НИСАГ (ISIAH). / Е.В. Антонов, Ю.В. Александрович, **А.А. Серяпина**, Л.О. Климов, А.Л. Маркель // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19. – № 4. – С. 77-81.
2) Шевелев О.Б. и др. Метаболиты мозга у крыс линий НИСАГ и Вистар. / О.Б. Шевелев, **А.А. Серяпина**, А.Л. Маркель, М.П. Мошкин. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015.– Т. 9. – № 4. – С. 427-431.
3) Серяпина А.А. и др. Характеристика кровотока по магистральным артериям у гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) со стресс-зависимой артериальной гипертонией. / **А.А. Серяпина**, О.Б. Шевелев, М.П. Мошкин, А.Л. Маркель // Бюл. экспер. биол. мед. – 2016.– Т. 161. – № 4. – С. 452-456.
4) Seryapina A.A. *et al*. Stress-sensitive arterial hypertension, hemodynamic changes and brain metabolites in hypertensive ISIAH rats: MRI investigation. /**A.A. Seryapina**, O.B. Shevelev, A.L. Markel, M.P. Moshkin, A.E. Akulov // Exp. Physiol. – 2017. – V. 102. – N. 5. – P. 523-532.

5) **Серяпина А.А.**, Шевелев О.Б. Артериальная гипертония и морфология мозга у крыс линии НИСАГ: исследование с применением метода магнитно-резонансной томографии. / **А.А. Серяпина**, О.Б. Шевелев // Перспективы фундаментальных наук: Сборник трудов XII Междунар. конф. студентов и молодых ученых. – Томск: Изд-во Томского политехн. ун-та. – 2015. – С. 871-873.
6) **Серяпина А.А.**, Шевелев О.Б. Применение метода магнитно-резонансной спектроскопии в изучении формирования гипертензивного статуса у крыс линии НИСАГ. / **А.А. Серяпина**, О.Б. Шевелев // Материалы VIII Всероссийского с международным участием конгресса молодых учёных-биологов "Симбиоз – Россия 2015". – Новосибирск: Изд-во Новосибирского гос. ун-та. – 2015. – С. 143.
7) **Seryapina A.A.**, Shevelev O.B. Basic metabolomic patterns in early hypertensive rats: MRI study. / **A.A. Seryapina**, O.B. Shevelev // Experimental and Computational Biomedicine: Russian Conference with International Participation in memory of Professor Vladimir S. Markhasin. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. – 2016. – С. 25-26.
8) **Seryapina A.A.**, Shevelev O.B. The advantages of non-invasive techniques for investigation of physiological parameters in laboratory animals. / **A.A. Seryapina**, O.B. Shevelev // Belyaev Conference: a triumphant event in commemoration of the centenary of the birth of Academician Dmitri Belyaev. Новосибирск: Изд-во СО РАН. – 2017. – С. 93.