

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА  
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

*На правах рукописи*



МАРКОВ МИХАИЛ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**НОВАЯ МОДЕЛЬ ВТОРИЧНОЙ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ,  
АССОЦИИРОВАННАЯ С ОДНОСТОРОННЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ  
ИШЕМИЕЙ ЗОНЫ КАРОТИДНЫХ ТЕЛЕЦ**

Специальность 1.5.5. – физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Давыдова Мария Павловна

Москва 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Основные эффекты симпатической нервной системы.....</b>	<b>12</b>
1.1.1. Классификация адренорецепторов.....	12
1.1.2. Особенности физиологии симпатической нервной системы в некоторых органах и тканях.....	16
1.1.3. Нейропептид Y как медиатор симпатической нервной системы..	18
1.1.4. АТФ как медиатор симпатической нервной системы.....	20
<b>1.2. Легочная гипертензия.....</b>	<b>22</b>
1.2.1. Группы легочной гипертензии согласно ВОЗ.....	22
1.2.2. Гемодинамическая классификация легочной гипертензии.....	26
1.2.3. Функциональная классификация легочной гипертензии.....	27
1.2.4. Основные мишени для лечения легочной артериальной гипертензии.....	27
1.2.5. Патогенетические пути развития легочной гипертензии.....	30
<b>1.3. Влияние различных факторов на состояние гладких мышц сосудов     легких и их роль в развитии легочной гипертензии.....</b>	<b>33</b>
1.3.1. Гуморальные влияния.....	33
1.3.2. Влияние гипоксии.....	37
1.3.3. Влияния вегетативной нервной системы.....	41
1.3.4. Каротидные тельца.....	46
<b>1.4. Заключение из обзора литературы.....</b>	<b>48</b>
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>50</b>
<b>2.1. Содержание животных.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2. Моделирование состояния ишемии каротидных телец.....</b>	<b>50</b>
<b>2.3. Проведение гистологического и макроанатомического     исследования.....</b>	<b>52</b>
2.3.1. Взятие материала на гистологическое исследование.....	52
2.3.2. Взвешивание разных отделов сердца.....	53

2.3.3. Фиксация, проводка и окраска легких.....	53
<b>2.4. Проведение физиологического эксперимента на изолированных сосудах.....</b>	<b>55</b>
2.4.1. Описание установки для физиологического эксперимента.....	55
2.4.2. Приготовление раствора Кребса-Хенсляйта.....	56
2.4.3. Выделение внутрилегочных артерий второго порядка.....	56
2.4.4. Проведение физиологического эксперимента.....	57
<b>2.5. Проведение молекулярно-биологического исследования легочных сосудов у крыс.....</b>	<b>58</b>
2.5.1. Выделение РНК.....	59
2.5.2. Проведение обратной транскрипции.....	60
2.5.3. Проведение полимеразной цепной реакции.....	60
2.5.4. Проведение электрофореза.....	61
2.5.5. Подсчет концентрации ДНК-ампликонов.....	61
<b>2.6. Определение чувствительности барорефлекса и измерение гемодинамических параметров.....</b>	<b>62</b>
<b>2.7. Измерение уровня глюкозы крови у крыс.....</b>	<b>64</b>
<b>2.8. Протокол и дизайн эксперимента.....</b>	<b>64</b>
<b>2.9. Ретроспективное исследование пациентов с атеросклеротической бляшкой в каротидной области.....</b>	<b>66</b>
2.9.1. Критерии включения в исследование и исключения из исследования.....	67
2.9.2. Исследование историй болезни.....	68
<b>2.10. Статистическая обработка данных.....</b>	<b>69</b>
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....</b>	<b>70</b>
<b>3.1. Результаты гистологического и макроанатомического исследований.....</b>	<b>70</b>
<b>3.2. Результаты физиологических экспериментов на изолированных сосудах.....</b>	<b>73</b>
<b>3.3. Результаты ОТ-ПЦР.....</b>	<b>77</b>

3.4. Результаты ретроспективного исследования пациентов.....	80
3.5. Результаты измерений гемодинамических параметров.....	83
3.6. Результаты измерений уровня глюкозы в плазме крови крыс.....	87
<b>Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>88</b>
4.1. Обоснование выбранной модели ишемии каротидных телец.....	88
4.2. Обоснование выбранной модели удаления каротидных телец.....	92
4.3. Два пути NO-индуцированного расслабления легочных артерий....	93
4.4. Ишемия каротидных телец приводит к легочной гипертензии.....	94
4.5. Наличие бляшки в области бифуркации общей сонной артерии у пациентов может быть фактором риска развития легочной гипертензии..	102
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>104</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>105</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>106</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>108</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>122</b>

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность и степень разработанности проблемы

Легочная гипертензия – одно из тяжелых заболеваний сердечно-сосудистой системы, часто приводящее пациентов к инвалидизации и к смерти. В связи с большой актуальностью данной проблемы интересным представляется выяснение причин легочной гипертензии различных типов.

Существует множество моделей легочной гипертензии, в числе которых гипоксическая модель (используется как аналог вторичной легочной гипертензии по отношению к заболеваниям легких и легочной гипертензии у горцев), монокроталиновая модель (акцентирует внимание на воспалительных процессах в легких, сопровождающих развитие многих форм легочной гипертензии), аорто-кавальный шунт как аналог гиперкинетической составляющей легочной гипертензии при врожденных пороках сердца и т.д.

Один из самых важных факторов развития легочной гипертензии – альвеолярная гипоксия, которая через множество путей реализует свои эффекты, конечной точкой которых является гипертрофия меди легочных артерий с последующим их склерозом. Кроме прямого ответа на альвеолярную гипоксию – гипоксической вазоконстрикции легочных артерий, при этом имеет значение активация симпатической нервной системы.

Активация симпатической нервной системы является одним из патогенетических механизмов развития легочной гипертензии. На основании этого в терапии легочной гипертензии с некоторым успехом применяется десимпатизация легочных артерий (Chen et al., 2013; Chen et al., 2015; Liu et al., 2016). Некоторые модели направлены на изучение значения активации симпатической нервной системы для развития состояния легочной гипертензии – например, синоаортальная денервация, симуляция условий гипоксии в каротидных тельцах путем введения цианида натрия (Galiniere et al.; 1997, Sugito et al., 1998). Однако эти модели используются только в острых экспериментах. Интересно, что и одностороннее влияние на каротидные тельца в остром

эксперименте (создание тканевой гипоксии) приводило к транзиторному увеличению давления в малом круге кровообращения.

К сожалению, в литературе не представлено данных влияния длительной активации/инактивации/удаления рецепторов каротидных телец на состояние легочных сосудов. Таким образом, вопрос о влиянии долгосрочных изменений в работе рецепторов артериального русла на развитие вторичной легочной гипертензии остается неизученным. Проецируя результаты острых экспериментов на животных, можно предположить, что ишемия области бифуркации общей сонной артерии, ведущая к активации симпатической нервной системы, также может оказывать существенное влияние на состояние легочного русла. Это влияние, опосредованное изменением активности симпатической нервной системы, представляется весьма актуальным фактором для пациентов с атеросклерозом, у которых наблюдается как односторонний, так и двусторонний стеноз общих сонных артерий из-за наличия атеросклеротических бляшек, располагающихся в области бифуркации сонной артерии.

### **Цель работы**

Изучить влияние односторонней перевязки общей сонной артерии или одностороннего удаления каротидных телец на изменение функциональных и морфологических свойств легочных артерий и проявления симптомов легочной гипертензии у крыс. Сопоставить влияние ишемии каротидных телец на развитие легочной гипертензии у крыс с перевязкой общей или наружной сонной артерии и у пациентов с односторонней атеросклеротической бляшкой в области бифуркации общей сонной артерии.

### **Задачи работы**

- 1) Оценить морфологические признаки легочной гипертензии у интактных крыс, крыс с односторонней перевязкой общей сонной артерии, у крыс с односторонней перевязкой наружной сонной артерии,

а также у крыс с односторонним удалением каротидных телец – относительную массу правого желудочка, количество слоев гладкомышечных клеток и толщину меди легочных артерий;

- 2) Выявить изменения NO-опосредованной вазодилатации изолированных легочных артерий у крыс с односторонней ишемией каротидного тельца;
- 3) Выявить изменения NO-опосредованной вазодилатации изолированных легочных артерий у крыс с односторонним удалением каротидного тельца;
- 4) Оценить экспрессию АТФ-чувствительных калиевых каналов в легочных артериях у интактных крыс и крыс с перевязкой наружной сонной артерии;
- 5) Оценить чувствительность хронотропного барорефлекса у интактных крыс, крыс с перевязкой наружной сонной артерии, а также у крыс с удалением каротидных телец;
- 6) Оценить частоту встречаемости признаков легочной гипертензии у пациентов с атеросклеротической бляшкой разной степени выраженности в области бифуркации общей сонной артерии.

### **Научная новизна работы**

В проведенном исследовании впервые разработана новая модель легочной гипертензии – модель, связанная с хронической односторонней ишемией каротидных телец. Данная модель характеризуется умеренной легочной гипертензией, в отличие от гипоксической или монокроталиновой моделей.

Впервые показаны изменения в работе симпатической нервной системы при хронических изменениях в области каротидных телец одной из сонных артерий.

Кроме того, в настоящей работе впервые показано на пациентах влияние ишемии рецепторов сино-каротидной зоны на частоту встречаемости у этих пациентов признаков легочной гипертензии (у пациентов с гемодинамически

значимой атеросклеротической бляшкой частота встречаемости этих признаков выше).

### **Научно-практическая значимость работы**

Результаты настоящей работы значительно расширили представления о зависимости физиологии легочных артерий от состояния симпатической нервной системы.

Новая модель легочной гипертензии, связанная с хронической односторонней ишемией каротидных тел, может использоваться в дальнейшем при различных исследованиях, связанных с изучением патофизиологии и фармакологии легочной гипертензии. Таким образом, результаты данной работы являются значимыми для фундаментальной науки для дальнейшего изучения физиологии легочных артерий.

Наличие атеросклеротической бляшки в области бифуркации общей сонной артерии у пациентов может являться прогностическим признаком развития вторичной легочной гипертензии, которая, в свою очередь, требует коррекции. Таким образом, результаты настоящей работы не только являются теоретически значимыми, но и могут иметь прикладное значение.

### **Методология и методы исследования**

Для оценки морфологического состояния легочных артерий и верификации легочной гипертензии использовали гистологический (окраска гематоксилином-эозином легочных артерий) и морфометрический (взвешивание разных отделов сердца) анализы. Для оценки профиля NO-зависимого расслабления использовали физиологический эксперимент *in vitro* на изолированных внутрилегочных артериях второго порядка. Для оценки экспрессии калиевых каналов использовали молекулярно-биологический метод – полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией. Анализ уровня глюкозы в крови крыс и физиологический эксперимент по оценке барорефлекса *in vivo* на бодрствующих крысах проводили для комплексной оценки изменения



влияния симпатической нервной системы на организм животного в перечисленных выше модельных условиях. Все эксперименты были выполнены на базе кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Кроме того, для оценки влияния ишемии каротидных телец на состояние легочных артерий у пациентов проводили ретроспективный анализ историй болезни. Исследовали пациентов, проходивших лечение в ФГАУ Национальном медицинском исследовательском центре нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко МЗ РФ по поводу наличия в области бифуркации общей сонной артерии гемодинамически значимой атеросклеротической бляшки, а также пациентов, проходивших лечение в ФГБУ Национальном медицинском исследовательском центре кардиологии МЗ РФ по поводу различных заболеваний сердечно-сосудистой системы.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. По результатам гистологического и физиологического эксперимента разработана новая модель легочной гипертензии у крыс – модель односторонней ишемии каротидных телец.

2. При односторонней ишемии каротидных телец изменяется структура NO-зависимого расслабления легочных артерий в сторону большего влияния растворимой гуанилатциклазы.

3. У крыс с ишемией каротидных телец и у крыс с удалением каротидных телец имеет место изменение активности симпатической нервной системы в хроническом эксперименте.

4. У крыс с удалением каротидных телец уменьшается степень NO-зависимого расслабления.

5. У пациентов с атеросклеротической бляшкой в области общей сонной артерии чаще встречаются признаки легочной гипертензии, чем у пациентов без таковой бляшки.

## **Степень достоверности полученных результатов**

Настоящее исследование проведено с применением стандартизированных протоколов экспериментов. Результаты данного исследования были проанализированы и обработаны с использованием современных методов статистической обработки данных, представлены на российских и международных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах.

## **Апробация полученных результатов**

Результаты исследования были успешно представлены на научных конференциях всероссийского и международного уровней:

- XIX международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, Россия, 23 апреля 2016)
- XI международная конференция «Микроциркуляция и гемореология» (г. Ярославль, Россия, 3-5 июля 2017)
- V всероссийский конгресс "Легочная гипертензия" (Москва, Кардиологический центр, Россия, 13-14 декабря 2017)
- Кислород и свободные радикалы, Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь, 15-16 мая 2018
- 28 European Meeting on hypertension and cardiovascular protection (Барселона, Испания, 8-11 июня 2018)
- ESC Congress (Мюнхен, Германия, 25-29 августа 2018)
- VII Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии и патологии кровообращения (Москва, Россия, 3-6 февраля 2020)

## **Опубликованные работы по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликованы 12 печатных работ: 3 статьи в периодических изданиях, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web

of Science, RSBI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7(МГУ.03.06) по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных, и 9 тезисов в сборниках докладов международных и всероссийских научных конференций.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах диссертационной работы: в анализе актуальной научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении гистологических, молекулярно-биологических и физиологических частей работы, а также в работе с историями болезни, в интерпретации полученных результатов и их представлении на конференциях различного уровня, в написании научных статей.

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа изложена на 127 страницах и включает в себя 31 рисунок и 4 таблицы. В работе представлены следующие разделы: введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список использованной литературы из 7 источников на русском языке и 127 – на иностранном (всего 134 источников) и приложения.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Центральным звеном данного исследования было изучение влияния ишемии каротидных телец на морфологические и функциональные характеристики легочных сосудов, опосредованное симпатическим отделом вегетативной нервной системы. В связи этим, представляется правильным начать литературный обзор с описания физиологии симпатической нервной системы.

### 1.1. Основные эффекты симпатической нервной системы

Эффекты симпатической нервной системы сопряжены с действием двух важнейших медиаторов – адреналина и норадреналина. Норадреналин является медиатором, выделяющимся постганглионарными нейронами непосредственно на эффекторных органах. Именно он опосредует местные эффекты симпатической нервной системы. Системные эффекты симпатической нервной системы связаны с гормоном, выделяющимся из мозгового вещества надпочечников – адреналином. Кроме норадреналина в синаптическую щель выделяются и другие вещества, такие как нейропептид Y и АТФ.

#### 1.1.1. Классификация адренорецепторов

Основными рецепторами адреналина и норадреналина на эффекторных органах являются  $\alpha$  и  $\beta$ -адренорецепторы ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  и  $\beta_2$ ). Эти рецепторы различаются по строению и по свойствам, поэтому их распределение на органах влияет на конкретный эффект при активации или инактивации симпатической нервной системы.

Метаботропные  $\alpha_1$ -адренорецепторы располагаются постсинаптически и связаны с активацией  $G_q$ -белка, который ассоциирован с активацией системы фосфолипазы C, гидролизующей фосфатидилинозитол ( $PIP_2$ ) на два важных вторичных посредника – инозитолтрифосфат ( $IP_3$ ) и диацилглицерол (DAG).  $IP_3$  активирует  $IP_3$ -зависимые кальциевые каналы, что приводит к повышению

уровня кальция в клетке. DAG повышает активность различных изоформ протеинкиназы С, фосфорилирующей многие регуляторные белки.  $\alpha_1$ -адренорецепторы представлены в большом количестве в гладких мышцах сосудов, желудочно-кишечного тракта, выделительной системы, пиломоторных мышцах кожи, вызывая при активации их сокращение. Основными агонистами  $\alpha_1$ -адренорецепторов являются адреналин, норадреналин, а также их селективный агонист – фенилэфрин, часто использующийся в лабораторной практике, а также в офтальмологии для лечения воспалительных заболеваний оболочек глаза и в оториноларингологии при лечении ринитов (сужает местные кровеносные сосуды). При введении фенилэфрина развивается рефлекторная брадикардия (в связи со срабатыванием барорефлекса). Антагонисты  $\alpha_1$ -адренорецепторов (празозин, доксазозин) используются для расширения гладких мышц мочевого пузыря и простаты при лечении доброкачественной гиперплазии предстательной железы. При этом важным побочным эффектом применения  $\alpha_1$ -адреноблокаторов является снижение артериального давления, что связано с расширением периферических сосудов.

Выделяют несколько подтипов  $\alpha_1$ -адренорецепторов, среди которых  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ -адренорецепторы.  $\alpha_{1A}$ -рецепторы с точки зрения сердечно-сосудистой системы интересны тем, что они расположены на артериях и отвечают в основном за сужение мелких сосудов, в то время как  $\alpha_{1D}$ -рецепторы на артериях представлены в меньшей степени и сужают в основном крупные сосуды. Вероятно, это связано с тем, что крупные сосуды должны обладать большой чувствительностью к катехоламинам и оставаться суженными даже при удалении агониста из кровеносного русла, что будет препятствовать резкому изменению их просвета (а значит, и резким гемодинамическим изменениям). В мелких же сосудах чувствительность к катехоламинам меньше, поэтому эти сосуды легко меняют свой просвет в зависимости от уровня агониста, что оправдано физиологически. Функция  $\alpha_{1B}$ -рецепторов с позиций их действия на сосуды на данный момент не до конца изучена (Akinaga et al., 2019).

Метаботропные  $\alpha_2$ -адренорецепторы представлены как на пост-, так и на пресинаптической мембранах синапса. Находясь на пресинаптической мембране  $\alpha_2$ -адренорецепторы выполняют роль тормозных. Они тормозят дальнейшее высвобождение медиаторов симпатической нервной системы в синаптическую щель. Связаны  $\alpha_2$ -адренорецепторы с  $G_i$ -белками, ингибирующими активность аденилатциклазы и, таким образом, снижающими накопление циклической формы АМФ, что приводит к снижению активности протеинкиназы А. В гладких мышцах сосудов снижение активности протеинкиназы А приводит к сокращению мышц, что связано с тем, что протеинкиназа А фосфорилирует и, тем самым, инактивирует киназу легких цепей миозина (КЛЦМ).  $\alpha_2$ -адренорецепторы играют важную роль в регуляции артериального давления на уровне центральной нервной системы. При их активации артериальное давление существенно снижается, что связано с их расположением в продолговатом мозге. При этом важно учитывать, что на периферии  $\alpha_2$ -адренорецепторы отвечают за сужение кровеносных сосудов, что может приводить к увеличению диастолического артериального давления. Основные селективные агонисты  $\alpha_2$ -адренорецепторов – нафазолин и некоторые другие применяются для сужения сосудов слизистой оболочки носа при ринитах. Центральный активатор  $\alpha_2$ -адренорецепторов клонидин является важнейшим средством для снижения артериального давления. При этом  $\alpha_2$ -адреноблокаторы, действуя на пресинаптические рецепторы центральной нервной системы, оказывают на нее стимулирующее действие, а действуя на периферические сосуды, расширяют их, в связи с чем могут быть использованы для лечения импотенции.

Метаботропные  $\beta_1$  и  $\beta_2$ -адренорецепторы связаны с  $G_s$ -белками, активирующими аденилатциклазу. Таким образом, активация как  $\beta_1$ , так и  $\beta_2$ -адренорецепторов приводит к усилению активности протеинкиназы А. В сердечной мышечной ткани этот путь крайне важен, поскольку при этом открываются кальциевые каналы L-типа. Протеинкиназа А фосфорилирует важные мишени, такие как фосфоламбан (отвечающий за работу кальциевой

АТФ-азы SERCA), кальциевые каналы L-типа, тропонин I. Все это приводит к увеличению уровня кальция в клетке и к усилению сокращения сердечной мышцы (положительный инотропный эффект). Кроме того, стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов опосредует положительный хронотропный, дромотропный и батмотропный эффекты, что связано с их расположением на пейсмейкерных клетках и клетках проводящей системы (преимущественно это опосредуется  $\beta_1$ -адренорецепторами). В гладкомышечных клетках  $\beta$ -рецепторы (преимущественно представлены  $\beta_2$ -адренорецепторы) опосредуют противоположный эффект, поскольку активация аденилатциклазы приводит к фосфорилированию КЛЦМ (с ее последующей инактивацией). В результате снижается активность фосфорилирования легких цепей миозина, что затрагивает путь регуляции взаимодействия актина с миозином, что играет существенную роль в гладкой мускулатуре (в отличие от сердечной). Кроме того, активация аденилатциклазы приводит к фосфорилированию фосфоламбана, что опосредует снижение уровня внутриклеточного кальция. В почках  $\beta_1$ -адренорецепторы ответственны за секрецию ренина.

Важно отметить, что  $\beta_1$ -адренорецепторы подвержены влиянию как норадреналина, так и адреналина, при этом  $\beta_2$ -адренорецепторы активируются в основном за счет адреналина.  $\beta_1$ -адреномиметики (такие как добутамин), применяются при лечении острой сердечной недостаточности,  $\beta_2$ -адреномиметики (короткого и длительного действия) используются для купирования и лечения бронхиальной астмы, а также в качестве токолитиков (снижают активность родовой деятельности). С учетом действия  $\beta$ -адреномиметиков на сердце (положительный хронотропный эффект) и на сосуды (их расширение) побочным эффектом  $\beta_2$ -адреномиметиков являются тахикардия и снижение артериального давления.  $\beta$ -блокаторы используются для терапии ишемической болезни сердца (поскольку снижают нагрузку на сердце), артериальной гипертензии и хронической сердечной недостаточности. Важно

отметить, что побочным эффектом  $\beta$ -блокаторов является сужение периферических сосудов.

Чувствительность адренорецепторов к синаптическому норадреналину и внесинаптическому адреналину различная. К норадреналину чувствительны  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - и  $\beta_1$ -адренорецепторы, в то время как  $\beta_2$ -адренорецепторы оказываются почти нечувствительны к норадреналину. В связи с этим при активации эфферентов симпатической нервной системы не происходит расширения сосудов, обусловленного в основном  $\beta_2$ -адренорецепторами. Адреналин же действует на все типы адренорецепторов, при этом преимущественно на  $\beta$ -адренорецепторы, поэтому его действие на гладкомышечные клетки зависит от плотности соответствующего типа рецепторов в ткани. К примеру, адреналин вызывает сужение кровеносных сосудов в коже и внутренних органах, что обусловлено его действием на  $\alpha_1$ -адренорецепторы. В то же время адреналин расширяет кровеносные сосуды в скелетных мышцах, действуя на  $\beta_2$ -адренорецепторы. Кроме того, адреналин обладает токолитическим и бронхорасширяющим эффектом.

### ***1.1.2. Особенности физиологии симпатической нервной системы в некоторых органах и тканях***

#### **Сердце.**

С учетом широкой представленности  $\beta$ -адренорецепторов в области проводящей системы сердца, а также в сердечной мышечной ткани желудочков, симпатическая нервная система опосредует положительные инотропный, хронотропный, батмотропный и дромотропный эффекты, блокирующиеся  $\beta$ -адреноблокаторами.  $\alpha_1$ -адренорецепторы также представлены в сердечной ткани, однако их роль значительно ниже, чем у  $\beta$ -адренорецепторов. Их наличие было подтверждено еще в 1966 году (Wenzel et al., 1966) при стимуляции изолированной полоски желудочка сердца крысы фенилэфрином. Полученный положительный инотропный эффект снимался фентоламином ( $\alpha$ -



адреномиметиком). В последующем такие же результаты были получены и у других животных, а также у человека. Положительный хронотропный эффект на проводящую систему сердца от влияния  $\alpha_1$ -адренорецепторов также имеет место, однако выражен он значительно меньше, чем такой же эффект от  $\beta$ -адренорецепторов. Более того, в волокнах Пуркинье  $\alpha_1$ -адренорецепторы в отличие от  $\beta$ -адренорецепторов оказывают выраженный отрицательный хронотропный эффект. Относительно эффектов на сердце в целом  $\alpha_1$ -адреномиметики оказывают положительное инотропное влияние, однако это влияние характеризуется преобладанием статического компонента миокарда и сопровождается медленным расслаблением и удлинением систолы. Действие  $\alpha_1$ -адренорецепторов связано не с увеличением уровня цАМФ в клетках миокарда, а с цАМФ-независимым увеличением медленного кальциевого тока, который вызывает выделение кальция из саркоплазматического ретикулаума, что усиливает сокращение, но не делает его эффективным (Чинкин, 2006).

### Печень.

Симпатическая нервная система в печени играет колоссальную роль в регуляции уровня глюкозы крови. В воротной вене уровень глюкозы определяется с помощью переносчиков глюкозы GLUT2. При постепенном снижении уровня глюкозы в воротной вене сигнал по афферентам поступает в мозг, и тем самым активизируется пищевое поведение. Серьезное снижение уровня глюкозы в крови не остается без внимания симпатической нервной системы, и вследствие активации  $\beta_2$ -адренорецепторов происходит гликогенолиз, и уровень глюкозы в крови повышается. В случае активации симпатической нервной системы по иным причинам уровень глюкозы в крови также повышается, например, при стрессе. В экспериментах по десимпатизации печени уровень глюкозы в крови значимо падал в группе десимпатизированных животных, что говорит о том, что базальный симпатический тонус играет большую роль в поддержании стабильного уровня глюкозы в крови (Schmelck et al., 1980; Mizuno et al., 2017).

Влияние симпатической нервной системы на легочные сосуды будет рассмотрено в главе 1.3.3.

### ***1.1.3. Нейропептид Y как медиатор симпатической нервной системы***

Нейропептид Y состоит из 36 аминокислот. Кроме головного мозга и симпатической нервной системы, его обнаруживают также в слюнных железах, желудочно-кишечном тракте, щитовидной железе, поджелудочной железе (Shende et al., 2020). Нейропептид Y активирует ряд рецепторов, связанных с G<sub>1</sub>-белками (Y<sub>1</sub> – Y<sub>6</sub>). Рецепторы Y<sub>1</sub> расположены в нейронах миндалин, гиппокампа, таламуса, а также кровеносных сосудах, сердце, почках, желудочно-кишечном тракте. Активация этих рецепторов на кровеносных сосудах приводит к вазоконстрикции. Кроме того, они регулируют пищевое поведение, настроение, их активация связана с антидепрессивным эффектом, анальгезией и противоэпилептическим действием (Reichmann et al, 2016; Silva et al., 2002; Munglani et al., 1996; Martins et al., 2015). Рецепторы Y<sub>2</sub> расположены на постсинаптических мембранах нейронов фронтальной коры, в латеральном отделе гиппокампа, в стволе мозга в тонком кишечнике, таламусе, на крупных кровеносных сосудах, в сердце, печени, селезенке и на клетках жировой ткани. Активация этих рецепторов приводит к анксиолитическому, антиэпилептическому, нейропротективному эффектам, снижает аппетит. Кроме того, эти рецепторы расположены на пресинаптической мембране, в связи с чем являются регуляторами поступления нейропептида Y в синаптическую щель. Рецепторы Y<sub>3</sub> представлены на постсинаптической мембране в мозговом веществе надпочечников, мембранах клеток сердца. Их эффекты до конца не изучены, хотя есть данные об их ингибирующем эффекте на симпатическую нервную систему (Silva et al., 2002; Munglani et al., 1996). Рецепторы Y<sub>4</sub> в головном мозге представлены в гиппокампе и гипоталамусе. Кроме того, они находятся в щитовидной железе, сердце, скелетных мышцах, простате, желудке, в тонком и толстом кишечнике, поджелудочной железе, мозговом веществе

надпочечников, а также в слизистой оболочке носа. Эффекты данных рецепторов связаны с подавлением секреции гормонов поджелудочной железы, расслаблением желчного пузыря, стимулированием выработки лютеинизирующего гормона, а также пищевым поведением и нейропротекцией (Martins et al., 2015). Рецепторы  $Y_5$  находятся в лимбической зоне головного мозга и в других органах, таких как тонкий кишечник, яички и яичники, предстательная железа, поджелудочная железа, селезенка, печень, скелетные мышцы, почки, сердце и плацента. Они регулирует потребление пищи и циркадные ритмы, возбуждают аппетит, оказывают противосудорожное, анксиолитическое, нейропротекторное действие (Reichmann et al, 2016; Silva et al., 2002; Munglani et al., 1996; Martins et al., 2015). Функции рецепторов  $Y_6$  до конца не изучены. В сердечно-сосудистой системе представлены в основном  $Y_1$ ,  $Y_2$  и  $Y_5$  - рецепторы. В физиологических условиях аутокринные и паракринные эффекты NPY модулируют сократимость сердца, деградацию белка и пролиферацию кардиомиоцитов. Нейропептид  $Y$ , выделяющийся через симпатические сердечные нервы может связываться с рецептором  $Y_2$  на парасимпатическом нерве и ингибировать высвобождение ацетилхолина и его связывание с  $M_2$  - рецептором, снижая эффективность расслабления сердца и вызывая тахикардию. Циркулирующий нейропептид  $Y$  тромбоцитов может регулировать такие процессы, как агрегация тромбоцитов, активация лейкоцитов и выработка цитокинов. В сосудах нейропептид  $Y$  может стимулировать сужение сосудов, митогенез и индуцировать рост эндотелия сосудов через эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF). Кроме того, нейропептид  $Y$  может подавлять функциональные эффекты антиангиогенных факторов (ангиостатин и эндостатин) и вазодилататоров, таких как субстанция P, вазоактивный кишечный пептид (VIP) и ацетилхолин. При патологических условиях возрастает продукция нейропептида  $Y$  и увеличивается экспрессия  $Y$ -рецепторов. Это вызывает дисбаланс симпато-вагусного взаимодействия, усиливает сердечные сокращения, способствует ремоделированию сердечной ткани, усиливает ангиогенез и вызванную воспалением дисфункцию эндотелия

в тканях сердца. Таким образом, нейропептид Y обуславливает патогенез таких сердечно-сосудистых заболеваний, как гипертрофия сердца, аритмии, сердечная недостаточность, атеросклероз, ишемия и артериальная гипертензия. (Tan et al., 2018). По сравнению с норадреналином нейропептид Y вызывает более медленное и более продолжительное сокращение сосудов, что связано с отсутствием специфического механизма элиминации его из синаптической щели. При этом его «собственное» сократительное действие часто бывает не столь заметным, но при этом нейропептид Y увеличивает сократительные ответ при действии других медиаторов – норадреналина и АТФ (Todorov et al., 1999).

#### ***1.1.4. АТФ как медиатор симпатической нервной системы***

АТФ – небольшая молекула, являющаяся основным переносчиком энергии в организме человека. Однако вторая по важности функция АТФ – участие в различных сигнальных процессах периферической и центральной нервной системы. Совместно с ацетилхолином и вазомоторным интестинальным пептидом (VIP) АТФ участвует в реакциях парасимпатической нервной системы. В центральной нервной системе АТФ является котрансммиттером почти всех нейромедиаторов (глутамата, ГАМК и пр.). С позиций симпатической нервной системы АТФ является котрансммиттером норадреналина и нейропептида Y. С точки зрения действия на сосуды АТФ является более быстрым и менее продолжительным вазоконстриктором, что обусловлено химической природой этой молекулы. Пуринергические рецепторы, реагирующие на АТФ представлены двумя семействами – P2X и P2Y. P2X-рецепторы сопряжены с ионными каналами на поверхности клеток, пропускающими натрий и кальций, что обуславливает быструю реакцию клетки – быструю временную деполяризацию. Всего выделено 7 типов P2X-рецепторов (P2X<sub>1</sub> – P2X<sub>7</sub>), из которых наиболее представлен на постсимпатической мембране рецептор P2X<sub>1</sub>. Отсутствие быстрой временной деполяризации в семявыносящем протоке мышцей с нокаутом по рецепторам P2X<sub>1</sub> подтверждают, что они опосредуются рецепторами P2X<sub>1</sub> (Murlyan et al., 2000). Аналогичные свойства АТФ показаны в

артериях (McLaren et al., 1995; von K ugelgen et al., 1991). В чувствительных нейронах особенно представлены P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>-рецепторы, а также гетеромер P2X<sub>2/3</sub>. Они представлены на афферентных нервах, отвечающих за ноцицепцию, механочувствительность, тепловую, вкусовую чувствительность и на чувствительность к гипоксии и гиперкапнии. Большое значение эти рецепторы имеют на афферентных волокнах, идущих от клеток каротидных телец. Мыши, нокаутные по гену P2X<sub>2</sub>, показывают меньший дыхательный ответ на гипоксию по сравнению с контролем. Более того, ацетилхолин, так же опосредующий эту реакцию, не способен компенсировать данное состояние (Rong et al., 2003). P2X<sub>2/3</sub>-рецепторы широко представлены в афферентных волокнах блуждающего нерва, идущего от нижнезадней стенки левого желудочка. Кроме того, через эти рецепторы АТФ ослабляет активность симпатических нервов, идущих к почкам.

P2Y-рецепторы связаны с разными типами G-белков. У человека выделено 8 типов P2Y-рецепторов (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>). Существуют и их гетеродимеры. Каждый из данных типов имеет разную чувствительность к АТФ и к другим пуриновым и пиримидиновым трифосфатам. В сосудах расположены P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>-рецепторы (связаны с G<sub>q</sub>-белками), отвечающие за вазодилатацию (в то время как P2X<sub>1</sub> отвечает за быструю вазоконстрикцию). При этом источниками АТФ и других трифосфатов являются сами гладкие миоциты, подвергшиеся гипоксии, эндотелиальные клетки в результате shear-stress и эритроциты при низких значениях рН. При различных патологических состояниях (агрегация тромбоцитов, воспаление) источниками большого количества АТФ могут стать тромбоциты и лейкоциты, при этом, вероятно, АТФ, действуя через разные виды P2-рецепторов, вызывает вазоконстрикцию. P2Y<sub>12</sub>-рецепторы (связаны с G<sub>i</sub>-белками) особое значение имеют в тромбоцитах, при их активации происходит агрегация тромбоцитов. Именно поэтому они являются одними из важнейших терапевтических мишеней для лечения ишемической болезни сердца (антагонисты P2Y<sub>12</sub>-рецепторов клопидогрел и тикагрелор наравне с аспирином применяются и по сей день) (Savi et al., 2005).

Большая роль АТФ проявляется при симпатической регуляции артериального давления. Прессорный синокаротидный рефлекс преимущественно реализуется с помощью АТФ, при этом исключение пуринергического компонента приводит к повышению вариабельности системного артериального давления, что связано с быстрым действием АТФ на гладкие мышцы сосудов, в отличие от норадреналина, который обеспечивает лишь поддержание приемлемого среднего уровня артериального давления (Тарасова, 2005).

## **1.2. Легочная гипертензия**

### ***1.2.1. Группы легочной гипертензии согласно ВОЗ***

Легочная гипертензия – тяжелое заболевание сердечно-сосудистой системы, которое приводит к преждевременной смерти. Основным критерием развития легочной гипертензии у пациента является персистирующее повышение среднего давления в легочной артерии более 25 мм рт. ст. в покое и более 30 мм рт. ст. при физической нагрузке. Без лечения правый желудочек у таких больных испытывает перегрузку давлением, что приводит к его гипертрофии. Так как компенсационные возможности у правого желудочка значительно ниже, чем у левого, такое состояние быстро декомпенсируется, и гипертрофия может сменяться дилатацией, что приводит к развитию правожелудочковой сердечной недостаточности. С другой стороны, системная артериальная гипертензия, которая связана с нагрузкой давлением на левый желудочек, может течь годами, не приводя к симптомам левожелудочковой сердечной недостаточности.

Средняя выживаемость больных легочной гипертензией без лечения составляет 2-3 года, причем смерть наступает из-за развития «легочного сердца» (*cor pulmonale*). Это обстоятельство делает проблему легочной гипертензии чрезвычайно актуальной. По данным зарубежных исследований при эхокардиографическом скрининге признаки легочной гипертензии обнаруживались у 10,5% пациентов, посещавших кардиолога (Клин. рек. МЗ РФ,

2013). При этом самой частой (78,7%) причиной легочной гипертензии являются проблемы, связанные с левыми отделами сердца (Gabbay et al., 2007). В целом, данные по распространенности легочной гипертензии в мире до сих пор остаются неполными. В Великобритании легочная гипертензия выявляется у 97 человек на миллион населения (Рекомендации ESC/ERS, 2015). Смертность от легочной гипертензии в США составляет от 4,5 до 12,3 человек на миллион населения.

Последняя классификация легочной гипертензии *Simonneau et al.* (принята в 2008 г. в городе Дана-Поинт) предполагает наличие пяти основных клинических групп легочной гипертензии (Simonneau et al., 2004).

Первая (1) группа включает в себя идиопатическую легочную гипертензию, различные наследственные виды легочной гипертензии (связанные с мутациями в генах BMPR2, и другими), индуцируемую лекарствами легочную гипертензию (например, амфетамином, анорексигенными препаратами, которые снижают обратный захват серотонина тромбоцитами, что приводит к увеличению его уровня в легочном русле), легочную гипертензию вследствие портальной гипертензии, а также ассоциированную с различными инфекционными и паразитарными заболеваниями, такими как ВИЧ-инфекция, шистосомоз и др. Также в первую группу входит легочная гипертензия, возникшая вследствие врожденных пороков сердца. Группа 1 объединяется названием «легочная артериальная гипертензия» (давление заклинивания в легочной артерии  $\leq 15$  мм рт. ст.), изменения легочных сосудов в этой группе носят прекапиллярный характер и зачастую являются плексиформными. При этом эти изменения не являются вторичными к каким-либо заболеваниям легких или сердца и не связаны с хронической тромбоэмболией легочной артерии.

Внутри группы 1 выделяют группу 1', связанную с веноокклюзионной болезнью легких (которая в том числе может быть обусловлена генетическими причинами – мутациями в гене EIF2AK4) и/или легочным капиллярным

гемангиоматозом (плексиформная ЛГ), а также группу 1”, которую образует персистирующая легочная гипертензия новорожденных.

Таким образом, первая группа вобрала в себя случаи, традиционно рассматриваемые как первичная легочная гипертензия.

К группе 2 относится легочная гипертензия, возникающая вследствие патологии левых отделов сердца (вторичная легочная гипертензия). К ним относятся клапанные пороки, систолическая и диастолическая левожелудочковая сердечная недостаточность, обструкция выходного тракта левого желудочка при гипертрофической кардиомиопатии, а также стенозы (врожденные или приобретенные) легочных вен. Легочная гипертензия вследствие заболеваний левых камер сердца носит в начале своего развития посткапиллярный характер (повышение давления в легочных венах). Однако при повышении давления в легочных венах срабатывает один из важнейших гемодинамических рефлексов – рефлекс Китаева, который является разгрузочным рефлексом малого круга кровообращения. Его результатом является спазм легочных артериол, что защищает легочные капилляры от чрезмерного повышения в них давления и препятствует увеличению их проницаемости и отеку легких. Однако хроническое повышение давления в легочных венах приводит к хронической вазоконстрикции легочных артериол, что в дальнейшем приводит к их гипертрофии, склерозу и развитию прекапиллярной формы легочной гипертензии, что значительно утяжеляет состояние данных больных. Рефлекс Китаева является одной из причин развития прекапиллярной легочной гипертензии у пациентов с посткапиллярной легочной гипертензией. Также вероятно, что давление в легочных артериях повышается пассивно вместе с повышением давления в левых отделах сердца и, следовательно, уменьшением градиента давления между входом и выходом из малого круга кровообращения. Можно предположить, что хроническое срабатывание рефлекса Китаева опосредует хроническое повышение уровня кальция внутри гладкомышечных клеток легочных артерий, что запускает кальцинейриновый путь, активация которого приводит к снижению плотности



калиевых потенциалзависимых каналов на поверхности гладкомышечных клеток (Bonnet et al, 2007). Кроме того, давление в легочных артериях может расти пассивно, пропорционально с ростом давления в левых отделах сердца. Усугубляет положение то, что при капиллярном застое в легких эритроциты могут пропитываться в межклеточное пространство, где поедаются альвеолярными макрофагами, которые становятся сидерофагами (клетки «сердечных пороков»). Сидерофаги могут способствовать повреждению мелких сосудов легких и приводить к развитию склероза (Wood, 1958).

Для группы 2 важно отметить роль вегетативной нервной системы в развитии легочной гипертензии. При большинстве хронических заболеваний, связанных с левыми отделами сердца (ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия и пр.) повышается активность симпатического отдела нервной системы. В свою очередь симпатическая нервная система может оказывать существенное влияние на состояние легочного русла, поскольку в легочных артериях содержатся адренорецепторы, о чем подробнее будет сказано ниже.

Легочная гипертензия, которая развивается вторично на фоне заболеваний легких, относится к группе 3. Она включает в себя многочисленные заболевания, которые связаны с альвеолярной гипоксией, вследствие которой может развиваться легочная гипертензия. К ним относятся хроническая обструктивная болезнь легких (хронический бронхит, эмфизема легких и их сочетания), различные интерстициальные болезни легких, в том числе группа профессиональных болезней, альвеолярная гиповентиляция вследствие нарушения проходимости дыхательных путей или расстройств центральной регуляции дыхания, длительное пребывание в горах (легочная гипертензия у горцев), синдром обструктивного апноэ во сне и др. Хроническая альвеолярная гипоксия приводит к вазоконстрикции и гипертрофии легочных артерий, а при присоединении воспалительного компонента – к артериосклерозу, из-за чего развивается прекапиллярная форма легочной гипертензии (Ball et al., 2014).

Группа 4 связана с хронической тромбоэмболией легочных артерий, которая может возникнуть вследствие онкологических заболеваний, связанных с хроническим воспалением (хронический остеомиелит), после спленэктомии, у пациентов с установленным центральным венозным катетером, элетрокардиостимулятором, у пациентов, находящихся на заместительной терапии при гипотиреозе, при различных тромбофилиях, гемоглинопатиях, антифосфолипидном синдроме. Кроме того, к данной группе относят и другие виды обструкции легочных артерий (ангиосаркома, артериит и др.).

В группу 5 включаются все виды легочной гипертензии с неясными или множественными механизмами развития (гемолитические анемии, включая серповидно-клеточную, системные заболевания соединительной ткани, такие как системная красная волчанка, склеродермия, синдром Гудпасчера, а также болезни накопления и др.).

Из данной классификации следует, что не существует единой патогенетической картины для легочной гипертензии и совершенно разные причины приводят к её развитию.

### ***1.2.2. Гемодинамическая классификация легочной гипертензии***

Согласно гемодинамической классификации, выделяют прекапиллярную и посткапиллярную формы легочной гипертензии.

Прекапиллярная форма легочной гипертензии характеризуется увеличением сопротивления мелких сосудов легочного ствола, что проявляется, кроме увеличения СДЛА более 25 мм рт. ст., увеличением также и легочного сосудистого сопротивления выше 3 единиц Вуда. При этом давление заклинивания легочной артерии (ДЗЛА) остается ниже 15 мм рт. ст. Подобная форма легочной гипертензии характерна для 1, 3, 4 и 5 групп ЛГ по классификации ВОЗ (Дана-Поинт, 2008 г.).

Посткапиллярная форма легочной гипертензии характеризуется уменьшением оттока крови из легочных вен в левое предсердие, что проявляется, кроме увеличения СДЛА более 25 мм рт. ст., увеличением также ДЗЛА выше 15

мм рт. ст. при сохранном легочном сосудистом сопротивлении (ниже 3 единиц Вуда). Такая форма ЛГ характерна для 2 и 5 групп ЛГ по классификации ВОЗ.

Существует также и смешанная (пре- и посткапиллярная) форма легочной гипертензии.

### ***1.2.3. Функциональная классификация легочной гипертензии***

Кроме патофизиологической (гемодинамической) и клинической классификации, существует еще функциональная классификация легочной гипертензии, направленный на оценку состояния пациента. В данной классификации выделяют 4 класса легочной гипертензии. К I классу относятся пациенты с отсутствием клинических проявлений (одышка, слабость, боли в грудной клетке, предобморочные состояния). Ко II классу относятся пациенты со средней толерантностью к физической нагрузке, при этом в покое значимых проявлений не наблюдается. Пациенты, относящиеся к III классу, имеющие крайне низкую толерантность к физической нагрузке. В покое одышки не наблюдается, однако при минимальной нагрузке она возникает. IV класс легочной гипертензии связан с минимальной толерантностью к физической нагрузке, при этом симптомы проявляются уже и в покое.

### ***1.2.4. Основные мишени для лечения легочной артериальной гипертензии***

Лечение легочной гипертензии 2-5 групп связаны так или иначе с непосредственной коррекцией причины, вызвавшей развитие легочной гипертензии – сердечной недостаточности, ХОБЛ и т.д. Зачастую успешное лечение первичных заболеваний существенно улучшает состояние пациентов и не требует дополнительного лечения легочной гипертензии.

Особой группой в лечении является группа 1 – легочная артериальная гипертензия (ЛАГ). На сегодняшний день используются следующие группы препаратов для лечения легочной гипертензии:

- блокаторы кальциевых каналов (БКК). Повышение уровня внутриклеточного кальция, по-видимому, является одним из важнейших звеньев патогенеза ЛАГ, в связи с чем данная группа препаратов может использоваться для ее лечения. При ЛАГ используют две группы БКК – бензотиазепины (дилтиазем) и дигидропиридины (нифедипин и пр.). Назначают определенную группу исходя из оценки ЧСС у пациентов с ЛАГ. В случае тахикардии предпочтительнее дилтиазем, при этом при сопутствующей брадикардии – нифедипин. Назначение БКК оправдано у пациентов с положительным ответом на острый тест с вазодилататорами (Yamamura et al., 2016).

- антагонисты рецепторов к эндотелину (АРЭ). Эндотелин является важнейшим вазоконстриктором малого круга кровообращения. Вазоконстрикторное действие эндотелина обусловлено его связыванием с эндотелиновыми рецепторами типа А (ER-A). При этом через связывание с ER-B эндотелин способствует вазодилатации. Кроме вазоконстрикторных свойств эндотелин также обладает свойствами митогена, в связи с чем способствует пролиферации гладких мышц легочных артерий. В ряде работ показано, что при ЛАГ повышается активность системы эндотелина и затрудняется его элиминация из кровотока, в связи с чем оправдано назначение таких АРЭ, как бозентан (неселективный АРЭ), амбризентан (антагонист ER-A), мацитентан (Gu et al., 2018).

- ингибиторы фосфодиэстеразы V типа (ИФДЭ-5). Использование ИФДЭ-5 приводит к накоплению в гладкомышечных клетках циклического ГМФ, в связи с чем происходит выраженная вазодилатация. Для этой группы препаратов показаны также антипролиферативные эффекты, что говорит о значимости данного пути, реализуемого через рГц в

развитии ЛГ (Kelly et al., 2017). В настоящий момент используются препараты, зарекомендовавшие себя в лечении эректильной дисфункции – силденафил, тадалафил и варденафил.

- стимуляторы гуанилатциклазы. На данный момент из данной группы известен только один препарат – риосигуат. Также как и ИФДЭ-5, этот препарат усиливает путь рГЦ – цГМФ, что способствует вазодилатации (Frey et al., 2017). В экспериментах на животных данный препарат наравне с ИФДЭ-5 показал антипролиферативный эффект (Rai et al., 2018).

- аналоги простациклина и агонисты рецепторов простациклина. Ряд работ предполагает уменьшение роли пути простациклина у пациентов с ЛАГ (Galie et al., 2003). Кроме того, простациклин препятствует активации тромбоцитов (в том числе выходу из тромбоцитов различных вазоактивных факторов, например, тромбоксана  $A_2$ , серотонина, лейкотриенов), расширяет сосуды и обладает антипролиферативной активностью (Clapp et al., 2015; Jones et al., 1995).

Помимо вышеуказанных препаратов исследовались также ингибиторы серотониновых рецепторов (серотонин, так же как и эндотелин, является вазоконстриктором легочного русла), ингибиторы тирозинкиназы (считается, что ЛАГ является некоторым промежуточным состоянием между воспалением и опухолевым ростом), однако все эти препараты показали свою неэффективность. На данный момент активно исследуются ингибиторы Rho-киназы (Sun et al., 2018) (Rho-киназа фосфорилирует легкие цепи миозина, а также фосфатазу легких цепей миозина, оказывая на нее ингибирующий эффект), ингибиторы эластазы (Dewatcher et al., 2010).

Кроме терапевтических методов обсуждается метод десимпатизации легочных артерий (Galie et al., 2013), который рассматривается ниже.

### *1.2.5. Патогенетические пути развития легочной гипертензии*

Несмотря на то, что единого патогенетического пути развития легочной гипертензии не существует, существует единая конечная точка – гипертрофия и склерозирование легочных артерий. Выделим основные предрасполагающие факторы для гипертрофии гладких мышц легочной артерии.

- 1) Генетический. Данный фактор чаще всего опосредует развитие 1-го типа легочной гипертензии. К частым мутациям, приводящим к развитию легочной гипертензии, относится мутация в гене рецептора костного морфогенетического белка II типа (BMPR2), который связывает группу костных морфогенетических белков (BMPs), которые опосредуют остеогенез, клеточный рост и дифференцировку (Rabinovitch et al., 2012). Эти белки относятся к суперсемейству трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Данный рецептор обладает серин-треонинкиназной активностью и влияет на процессы транскрипции в клетке. Его роль для легочных сосудов заключается в том, что он способствует выживанию эндотелиальных клеток, что защищает сосудистую стенку от повреждения (Rabinovitch et al., 2015). Кроме того, сигналинг через BMPR2 в гладких мышцах опосредует торможение их пролиферации. Это будет иметь особенно важное значение при повреждении, так как факторы, выделяющиеся при повреждении, способствуют пролиферации гладкомышечных клеток. Мутации в гене BMPR2 могут способствовать тому, что TGF $\beta$  начинает активировать пролиферацию гладкомышечных клеток.
- 2) Альвеолярная гипоксия. Гипоксия является важнейшим фактором развития легочной гипертензии. Отдельно о гипоксии, ее рецепции и различных путях влияния на состояние легочных артерий будет рассказано в п. 1.3.2.
- 3) Повышение давления в легочных венах и левых отделах сердца является самой частой причиной развития легочной гипертензии. Это связано в том числе с тем, что при повышении давления в левом

предсердии и легочных венах включается рефлекс Китаева, приводящий к спазму легочных артерий, как было описано выше, наравне с другими причинами «пассивной» легочной гипертензии.

- 4) Повышение минутного объема крови, проходящей через малый круг кровообращения, редко самостоятельно приводит к развитию легочной гипертензии. Однако у новорожденных с врожденными пороками сердца по бледному типу гиперкинетический компонент дополняет отсутствие ремоделирования легочного русла. Вместо расслабления легочных артерий и снижения давления в легочном русле, которые происходят сразу после рождения, сосуды при наличии порока сердца по бледному типу сокращаются в ответ на увеличенный объем протекающей через них крови и начинают себя вести, как сосуды большого круга кровообращения (реализуется миогенная ауторегуляция – реакция Бейлиса-Остроумова). Это усиливает развитие легочной гипертензии. Однако, гиперкинетическая составляющая при данном состоянии является лишь вспомогательным механизмом развития легочной гипертензии. Легочная гипертензия на фоне врожденных пороков сердца составляет синдром Эйзенменгера. Это подтверждается тем, что при хирургической коррекции порока удается убрать сброс крови слева направо, однако не всегда предотвращает развитие легочной гипертензии. Важную роль в случае гиперкинетического компонента играет увеличенное давление, под которым кровь поступает слева направо. Например, при дефекте межпредсердной перегородки кровь поступает слева направо под небольшим давлением, и легочная гипертензия у таких пациентов развивается медленно (десятки лет) (Manuel et al., 2017). В случае же дефекта межжелудочковой перегородки или незакрытого боталлового протока, когда кровь под большим давлением сбрасывается слева направо легочная гипертензия развивается в подавляющем большинстве случаев. Стоит отметить, что при врожденных пороках

сердца бледного типа гипертонус легочных артерий формально носит компенсаторный характер, то есть препятствует сбросу крови слева направо, причем чем выше легочная гипертензия, тем лево-правый градиент меньше (de Campos et al., 2017). В какой-то момент градиент может даже поменять направление, и в таком случае хирургическая коррекция порока строго противопоказана из-за возможной декомпенсации сердечной недостаточности правого желудочка.

- 5) Гипероксия. Вдыхание воздуха с повышенным содержанием кислорода крайне губительно сказывается на состоянии эндотелия легочных сосудов, поскольку в таком случае местно образуется множество активных форм кислорода (в частности, супероксид-радикал), которые повреждают клеточные и органоидные мембраны (Alphonse et al., 2011). Повреждение эндотелия приводит к пролиферации соединительной ткани легочных артерий, что также опосредует развитие фиброза меди, из-за чего развивается легочная гипертензия.
- б) Легочная гипертензия вследствие хронической тромбоэмболии имеет много причин. Важно отметить то, что при эмболизации ветвей легочной артерии возникает «болезнь мелких сосудов», приводящая к ремоделингу легочного русла. Тромбоциты, содержащиеся в сгустках крови, выделяют вазоактивные вещества (серотонин, тромбоксан  $A_2$ , лейкотриены, а также ионы кальция), приводящие к спазму сосудов с возможной последующей пролиферацией меди (Simonneau et al., 2017). Кроме того, показано, что в крови у пациентов с хронической тромбоэмболией возрастает уровень эндотелина-1, важнейшего вазоконстриктора малого круга кровообращения. Важно отметить и то, что закупорка ветвей легочных артерий ведет к перераспределению крови между остальными ветвями и, соответственно, к повышению в них давления (Reesnik et al., 2006).
- 7) Различные токсические факторы способны влиять на состояние легочных артерий, вызывая повреждение эндотелия. Токсическое



действие может быть связано с отсутствием детоксикации в печени, что наблюдается при портальной гипертензии, или наоборот, вследствие метаболизма в гепатоцитах образуется более токсичное соединение. В частности, ко второму случаю относится действие монокроталина, который используется в качестве модельного вещества для развития легочной гипертензии (Van Albada et al., 2005).

- 8) Некоторые экзогенно поступающие вещества, не проявляющие токсических свойств, способны вызывать развитие легочной гипертензии благодаря своим фармакологическим свойствам. В частности, анорексигенные вещества снижают обратный захват серотонина тромбоцитами. Серотонин является одним из важнейших вазоконстрикторов легочного русла. В связи с персистирующей вазоконстрикцией развивается легочная гипертензия (Weir et al., 1998).
- 9) Влияние вегетативной нервной системы на состояние легочных артерий является объектом изучения настоящей работы. Обзор публикаций о влиянии вегетативной нервной системе на развитие легочной гипертензии представлен в п. 1.3.3.

### **1.3. Влияние различных факторов на состояние гладких мышц сосудов легких и их роль в развитии легочной гипертензии**

#### ***1.3.1. Гуморальные влияния***

На легочные артерии оказывают влияния различные гуморальные факторы, такие как серотонин, эндотелин, NO, адреналин, ангиотензин, тромбоксан A<sub>2</sub>, простаглицлин и другие.

Серотонин является одним из важнейших нейромедиаторов, относится к классу моноаминов. Существует 7 основных типов рецепторов к серотонину (5-НТ<sub>1</sub> – 5-НТ<sub>7</sub>), имеющих суммарно 14 подтипов. При этом три из этих 14 подтипов (5-НТ<sub>2А</sub>, 5-НТ<sub>2В</sub>, 5-НТ<sub>1В</sub>) могут играть роль в развитии легочной гипертензии.

Первые два подтипа относятся к типу 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов, которые сопряжены с G<sub>q</sub>-белками, то есть в гладких мышцах через них может реализовываться сокращение. Кроме того, с учетом того, что через данный тип рецепторов повышается уровень внутриклеточного кальция, возможно усиление пролиферации гладкомышечных клеток (Adnot et al., 2013). Использование тергурида (антагонист 5-НТ<sub>2B</sub>-рецепторов) способствовало уменьшению пролиферативной активности гладкомышечных клеток в монокроталиновой модели легочной гипертензии (Dumitrascu et al., 2011). 5-НТ<sub>1B</sub>-рецептор сопряжен с G<sub>i</sub>-белком, то есть через него тоже реализуется сокращение гладких мышц. Ингибирование данного рецептора замедляет ремоделирование гладкомышечных клеток при гипоксической легочной гипертензии у крыс (Keegan et al., 2001). Еще одним важным белком является переносчик серотонина (5-НТТ). Показано, что гиперэкспрессия 5-НТТ у мышей приводит к спонтанной легочной гипертензии (Guignabert et al., 2005). Вероятно, это связано с сигнальными путями (возможно, через Rho-киназу), направленными на пролиферацию гладкомышечных клеток и фибробластов при обратном захвате серотонина. Это подтверждается тем, что при прогрессировании легочной гипертензии на фоне гиперэкспрессии 5-НТТ в гладкомышечных клетках повышается активность малого белка RhoA и его мишени – Rho-киназы (Guilluy et al., 2009). 5-НТТ является мишенью для действия селективных ингибиторов захвата серотонина, использующихся для лечения депрессии. При этом известно, что анорексигенные препараты, выделенные из антидепрессантов в отдельную группу (в том числе блокируют 5-НТТ), способны вызывать первичную легочную гипертензию, что может объясняться тем, что анорексигенные препараты могут оказывать на 5-НТТ влияние, схожее с серотонином, запуская митогенные эффекты в гладкомышечных клетках артерий и фибробластах (Eddahibi et al., 2002; Maclean et al., 2010). Интерес представляют также 5-НТ<sub>7</sub>-рецепторы, которые сопряжены с G<sub>s</sub>-белком и вызывают дилатацию легочных артерий (Jähnichen et al., 2005).

Эндотелин-1 (ЕТ-1) – гуморальный фактор пептидной природы, состоящий из 21 аминокислоты. Существует три основных типа рецептора к эндотелину – ЕТ<sub>А</sub>-рецептор, ЕТ<sub>В</sub>-рецептор (с двумя подтипами ЕТ<sub>В1</sub> и ЕТ<sub>В2</sub>) и ЕТ<sub>С</sub>-рецептор. При активации ЕТ<sub>А</sub>-рецептора (связан с G<sub>q</sub>-белком) в гладкомышечных клетках происходит вазоконстрикция, то есть через данный рецептор реализуется увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме. Кроме того, этот рецептор способствует пролиферации гладкомышечных клеток (Barton et al., 2008; Hyyrynen et al., 2006). Через ЕТ<sub>В1</sub>-рецептор, напротив, реализуется вазодилатация, то есть данный рецептор представляется эндогенным антагонистом ЕТ<sub>А</sub>-рецептора. Он также связан с G<sub>q</sub>-белком, однако представлен на поверхности эндотелия, поэтому запускает похожие на ацетилхолин-зависимую вазодилатацию реакции сосудов. При активации ЕТ<sub>В1</sub>-рецептора увеличивается активность фосфолипазы С в клетках эндотелия, что также способствует выделению NO и последующей вазодилатации (Barton et al., 2008). Кроме того, с помощью данного рецептора происходит клиренс эндотелина (Kedzierski et al., 2001). При экспериментальной легочной гипертензии, а также при легочной гипертензии у людей уровень эндотелина в крови повышается (Thenappan et al., 2018). Блокаторы ЕТ<sub>А</sub>-рецепторов бозентан, амбрисертан, мацитентан являются зарегистрированными препаратами для лечения первичной легочной гипертензии. Эти препараты улучшают качество жизни, снижают тяжесть клинических проявлений и риски осложнений (Galie et al., 2008; Galie et al., 2008; Oudiz et al., 2009). Вероятнее всего, повышение уровня эндотелина при легочной гипертензии является вторичным, возникает вследствие усиления провоспалительной активности в легких и приводит к дополнительным осложнениям (Barton et al., 2019).

Оксид азота (NO) играет ключевую роль в регуляции сосудистого тонуса как в большом, так и в малом круге кровообращения. С помощью NO опосредуются механизмы эндотелий-зависимой вазодилатации, в том числе поток-зависимой вазодилатации, реализуются антипролиферативные механизмы. NO-зависимое расслабление происходит через растворимую

гуанилатциклазу с последующей активацией протеинкиназы G (Lucas et al., 2000). Кроме данного пути, в настоящей работе подробно описывается и рассматривается путь, связанный с прямой активацией оксидом азота калиевых каналов. С учетом вазодилатирующих и антипролиферативных свойств оксид азота и зависимые от него пути рассматриваются в качестве ключевых фармакологических агентов для лечения легочной артериальной гипертензии. Важным классом препаратов для лечения легочной гипертензии являются ингибиторы фосфодиэстеразы V типа, действие которых приводит к накоплению циклического ГМФ. Данные препараты не только улучшают качество жизни пациентов, но и тормозят развитие легочной гипертензии, поскольку обладают антипролиферативным эффектом (Kelly et al., 2017). Кроме того, для лечения легочной гипертензии используется прямой активатор растворимой гуанилатциклазы – риосигуат, также обладающий антипролиферативным эффектом (Rai et al., 2018).

Ангиотензин II – олигопептид, состоящий из 8 аминокислот, является эффекторным звеном ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. С учетом того, что ангиотензин-превращающий фермент осуществляет свою работу преимущественно в легочной ткани, роль данного гормона в развитии легочной гипертензии представляет большой интерес. Ангиотензин II образуется в результате действия на ангиотензиноген ангиотензин-превращающим ферментом (АПФ) и является вазоконстриктором. В легочной ткани ангиотензин II не только синтезируется, но и инактивируется – превращается в ангиотензин-(1-7) с помощью ангиотензин-превращающего фермента 2 типа (АПФ2) (Zhang et al., 2019). При этом ангиотензин-(1-7) обладает противоположными ангиотензину II свойствами. Это вазодилататор, опосредующий свое действие через выброс NO эндотелием. Кроме того, он обладает антипролиферативными, противовоспалительными и антитромботическими свойствами (Samraio et al., 2007). При легочной гипертензии снижается уровень и активность АПФ2 (Dai et al., 2013), таким образом снижается соотношение ангиотензин-(1-7)/ангиотензин II, в связи с чем увеличивается активность вазоконстрикторных и

пролиферативных факторов, что неблагоприятно сказывается на течении заболевания (Zhang et al., 2021).

Также интересна роль простаноидов в развитии легочной гипертензии. В частности, тромбоксан A<sub>2</sub> является вазоконстриктором в легочном русле, реализуя свои эффекты через рецептор, сопряженный с G<sub>q</sub>-белком (Francois et al., 2004). Показано, что в модели монокроталиновой легочной гипертензии снижение активности системы NO-рГЦ приводит к повышению чувствительности гладкомышечных клеток к тромбоксану, что может иметь последствия для пациентов с легочной гипертензией (Cho et al., 2021). Селективный блокатор тромбоксановых рецепторов NTP42 показал свою эффективность в сравнении даже с классическим силденафилом на монокроталиновой модели легочной гипертензии у крыс. При одинаковой степени снижения легочного сосудистого сопротивления NTP42 значительно снижал воспалительный статус легочных артерий (Mulvaney et al., 2020).

Простаглицлин (простагландин I<sub>2</sub>) в легочном русле выполняет роль, противоположную тромбоксану A<sub>2</sub>. Его путь связан с активацией рецептора, сопряженного с G<sub>s</sub>-белком, чем опосредуются его функции – вазодилатация, антипролиферативный и противовоспалительный эффекты. Такие эффекты обосновывают активное применение препаратов простаглицлина и его синтетических аналогов при лечении легочной гипертензии (Sitbon et al., 2017; Honorato Perez et al., 2017; Gessler et al., 2018).

### ***1.3.2. Влияние гипоксии***

В первую очередь экзогенная гипоксия воспринимается дыхательной системой. Уже на уровне бифуркации бронхов присутствуют нейроэпителиальные тельца, которые улавливают снижение парциального давления кислорода в воздухе. Их принцип действия основан на активации и инактивации калиевых каналов, зависимых от пероксида водорода. Рядом с этими каналами в мембране рецепторных клеток находится фермент NADPH-оксидоредуктаза, превращающая кислород в супероксид-анион. При гипоксии

супероксид-аниона вырабатывается мало, вследствие чего внеклеточная супероксиддисмутаза не имеет субстрата для синтеза перекиси водорода. Дефицит перекиси приводит к закрытию этих калиевых каналов, что опосредует деполяризацию цитоплазматической мембраны рецепторных клеток. Сигналы от рецепторов нейроэпителиальных телец идут в продолговатый мозг (Wang et al., 1996).

Альвеолярная гипоксия детектируется непосредственно гладкомышечными клетками легочных артерий, при этом импульсы в головной мозг не посылаются. Ранним эффектом гипоксии является закрытие кислород-чувствительных калиевых каналов в мембране гладкомышечных клеток. Механизм закрытия связан с тем, что при гипоксии накапливается субстрат фермента NADPH-оксидоредуктазы NADPH. NADPH-оксидоредуктаза является регуляторной субъединицей калиевых каналов и при отсутствии возможности окисления с этой субъединицей NADPH происходит закрытие каналов. Их закрытие приводит к деполяризации мембраны гладкомышечных клеток, повышению уровня внутриклеточного кальция и, как следствие, к вазоконстрикции. Данный феномен носит название «гипоксической вазоконстрикции». Повышение уровня кальция приводит также к запуску пролиферативных процессов в гладкомышечных клетках, что заканчивается гипертрофией меди. Существуют также другие длительно реализуемые эффекты гипоксии, связанные с активацией различных путей, приводящих к пролиферации гладких мышц и, как следствие, к гипертрофии меди. Реализация патогенетического пути в частности происходит через фактор, индуцируемый гипоксией (HIF),  $\alpha$ -субъединица которого в состоянии нормоксии гидроксилируется и связывается с белком Гиппеля-Линдау, затем подвергается убиквитинилированию и деградации в протеасомах (Wenger et al., 2002). В состоянии же гипоксии она связывается с  $\beta$ -субъединицей HIF и в таком состоянии белок HIF $\alpha\beta$  переходит в ядро, где связывается с промоторами генов таких белков, как VEGF, эритропоэтин, ферменты гликолиза, транспортер глюкозы, трансферрин, индуцибельная NO-синтаза (Compernelle et al., 2002).

Также есть гены, транскрипцию которых HIF подавляет. В частности, к ним относятся гены белков калиевых потенциалзависимых каналов, которые играют важнейшую роль в поддержании мембранного потенциала (Bonnet et al., 2006). Снижение экспрессии калиевых каналов опосредует персистирующее повышение мембранного потенциала, что приводит к увеличению уровня внутриклеточного кальция. Повышение уровня кальция внутри гладкомышечной клетки приводит к ее сокращению, что поддерживается неэффективной NO-опосредованной вазодилатацией вследствие снижения уровня калиевых потенциалзависимых каналов (Sharf et al., 2001; Wang et al., 1997). Повышение уровня кальция также запускает важный кальцинейриновый путь. Активация кальцинейрина (фосфатазы) приводит к дефосфорилированию нуклеарного фактора активации Т-лимфоцитов (NFAT), который перемещается в ядро и связывается с ядерными рецепторами (Bonnet et al., 2007). В частности, такое связывание приводит к репрессии генов  $K_v1.5$ -каналов и к промоции гена *bcl-2*. Все это приводит к замыканию положительной обратной связи (уровень калиевых потенциалзависимых каналов продолжает снижаться), а повышение уровня *bcl-2* снижает вероятность митохондриально-опосредованного апоптоза, что увеличивает выживаемость гладкомышечных клеток. Последний путь похож на путь, который запускается при канцерогенезе, что связывает механизмы легочной гипертензии с механизмами опухолевого роста. Применение циклоспорина (ингибитор кальцинейрина, часто используется для иммуносупрессии) в модели монокроталиновой легочной гипертензии приводит к уменьшению выраженности гипертрофии медиа легочной артерии и гипертрофии правого желудочка (Bonnet et al., 2007). Таким образом, при альвеолярной гипоксии существует множество патологических путей с положительной обратной связью, которые усугубляют пролиферацию и гипертрофию гладкомышечных клеток и приводят к развитию легочной гипертензии.

В центральном кровотоке гипоксия определяется при помощи системы каротидных телец хеморецепторами - клетками 1 типа, которые реагируют на

содержание как углекислого газа, так и кислорода, при этом система рецепции основана на изменениях в работе калиевых каналов. За рецепцию повышенного уровня углекислого газа ответственны калиевые каналы типа TASK, зависящие от pH, а за рецепцию кислорода – кислородчувствительные калиевые каналы, идентичные таковым в гладкомышечных клетках легочных артерий (Patel et al., 2001).

От каротидных телец сигналы при гипоксии и гиперкапнии передаются по волокнам языкоглоточного нерва в продолговатый мозг (Kumar et al., 2012), в область дыхательного центра, откуда запускаются различные вегетативные рефлексы, ответственные за регуляцию дыхания, системы кровообращения и пр. Основными реакциями являются увеличение ЧСС и частоты дыхания. Кроме того, вероятно, симпатическая нервная система при стимуляции каротидных телец оказывает влияние на тонус легочных артерий (реализуется центральная часть механизма Эйлера-Лильестранда).

В ЦНС параметры, связанные с гипоксией, определяются на уровне продолговатого мозга, в клетках дыхательного центра. При этом клетки-рецепторы реагируют не на гипоксию, а на гиперкапнию и ацидоз. Основная реакция дыхательного центра связана с тем, что углекислый газ может превращаться в угольную кислоту, которая диссоциирует на гидрокарбонат-ион и протон. Последний как раз и действует на клетки дыхательного центра. Типичными реакциями в ответ на ацидоз являются повышение ЧСС, увеличение частоты и глубины дыхательных движений. При этом не имеет значения, какой на самом деле уровень углекислого газа и кислорода. При метаболическом ацидозе клетки дыхательного центра будут отвечать также, как и при дыхательном. Крайним выражением реакции дыхательного центра на ацидоз является дыхание Куссмауля – глубокое частое дыхание с гипервентиляцией. При этом гиперкапния самостоятельно также детектируется продолговатым мозгом. Такую реакцию осуществляют клетки глиии, в мембране которых находится коннексин-26, чувствительный к уровню углекислого газа. При закрытии поры коннексина-26 высвобождается АТФ из клеток глиии, в результате



чего АТФ связывается с пуриновыми рецепторами  $P_2X$  на поверхности чувствительных нейронов, что приводит к их деполяризации (Spyer et al., 2009).

Подытоживая вышесказанное, стоит отметить, что истинную гипоксию могут улавливать нейроэпителиальные тельца, каротидные тельца, а также непосредственно гладкомышечные клетки легочных артерий, при этом от последних информация в дыхательный центр не передается. Все эти детекторы истинной гипоксии так или иначе могут прямо или опосредованно через центральную нервную систему оказывать влияние на состояние легочных артерий, а значит могут влиять на развитие легочной гипертензии.

### ***1.3.3. Влияния вегетативной нервной системы***

Про вегетативную систему в этом контексте говорят редко, хотя она оказывает огромный вклад в регуляцию сосудистого тонуса (Синельников и др., 1996; Kadowitz et al., 1976; Langer et al., 1982; Verity et al., 1968).

Среди вегетативных нервов, иннервирующих легочные артерии примерно 71% относятся к симпатической нервной системе (Rothman et al., 2015). Анатомически симпатические нервы, иннервирующие легочные артерии отходят от симпатического ствола на уровне нижнего шейного ( $C_{VII}$ ) и пяти верхних грудных ( $Th_{I-V}$ ) узлов. Основная плотность норадренергических синапсов сосредоточена в крупных легочных сосудах, что является отличительной чертой малого круга (в большом круге большая часть синапсов расположена в артериях мелкого калибра и артериолах) (Kummer et al., 2011).

В легочных артериях представлены все виды  $\alpha_1$ -адренорецепторов, однако доминирующее положение занимают  $\alpha_{1A}$ -рецепторы. Активация этих рецепторов приводит к усилению миграции и пролиферации гладкомышечных клеток артерий легких. Вероятно, это происходит через кальций/кальмодулин-зависимую протеинкиназу II типа (Luo et al., 2019). Кроме того, через данные рецепторы возможна и вазоконстрикция (Evlakhov et al., 2019). Есть данные об определяющей роли  $\alpha_{2C}$ -адренорецепторов в вазоконстрикции сосудов при легочной гипертензии у свиней (Jantschak et al., 2012). В норадренергических

синапсах легочных артерий имеет место котрансмиссия (использование более чем одного медиатора). Вместе с норадреналином эффекторными веществами являются также АТФ и нейропептид Y. Это объясняет, в частности, почему действие блокаторов  $\alpha_1$ -адренорецепторов не снимает симпатического действия на легочные артерии. В покое симпатическая нервная система обеспечивает базальный тонус легочных артерий, а при симпатэктомии легочное сосудистое сопротивление снижается (Kummer et al., 2011; Liu et al., 1997). С другой стороны, в легочных артериях представлены  $\beta$ -адренорецепторы, вызывающие обратный эффект –  $\beta$ -блокаторы увеличивают легочное сосудистое сопротивление у овец и людей (Rodman et al., 1997).

Симпатическая нервная система отвечает за сужение легочных артерий при системной гипоксии (при этом не участвует в реакции гипоксической вазоконстрикции, возникающей при альвеолярной гипоксии). Исследования на собаках показали, что при симпатэктомии не происходит сужения легочных артерий при системной гипоксии, которая не сопровождается альвеолярной, при этом при альвеолярной гипоксии легочное сосудистое сопротивление всё-таки повышается, в обход симпатической нервной системы (Szidon et al., 1977).

Кроме того, симпатическая нервная система выполняет трофические функции. Еще в 1984 году Маккензи и Кляйн отмечали, что гипобарическая гипоксия у крыс в течение 3-7 дней приводит к увеличению массы и абсолютного содержания белка в легочном стволе, что значимо снижается у животных, подвергнутых неонатальной химической симпатэктомии гуанетидином (McKenzie et al., 1984). В 1999 году Сальви предложил « $\alpha_1$ -адренергическую гипотезу легочной гипертензии», сосредоточив внимание на антиапоптотических и пролиферативных эффектах, опосредованных  $\alpha_1$ -адренорецепторами. Эксперименты на клеточных культурах дали возможность предположить трофический сигнальный путь, включающий генерацию активных форм кислорода NADPH-оксидазой (Bleeke et al., 2004), различные подтипы которой экспрессируются в легочных артериях (Hohler et al., 2000; Mittal et al., 2007) и последующей активацией рецептора эпидермального

фактора роста и МАРК-киназ (Zhang et al., 2004). Котрансмиттер норадреналина нейропептид Y также является стимулятором разрастания гладких мышц легочных артерий (Movafagh et al., 2006; Abe et al., 2007).

В последнее время появляется все больше работ, посвященных исследованию влияния вегетативной нервной системы на развитие легочной гипертензии (Chen et al., 2013; Chen et al., 2015; Chen et al., 2013; Ciarka et al., 2010; Hoerper et al., 2016; Liu et al., 2016; Na et al., 2014; Rothman et al., 2015; Vaillancourt et al., 2017; Velez-Roa et al., 2004; Verity et al., 1968). Работа *Velez-Roa et al.* показала повышение активности симпатической нервной системы у пациентов с легочной гипертензией. В качестве методов использовали микронейрографию, оценку ЧСС, а также уровня плазменных катехоламинов (Ciarka et al., 2010, Velez-Roa et al., 2004). Вдыхание 100% кислорода резко снижало активность симпатической нервной системы, что выражалось в значимом снижении частоты сердечных сокращений и в снижении активности симпатических нервов (по данным микронейрографии).

*Liu C. et al.* проводили эксперимент на собаках (Liu et al., 2016). В качестве модели легочной гипертензии авторы выбрали монокроталиновую модель. Части собак с развившейся монокроталиновой легочной гипертензией проводили денервацию легочной артерии. Спустя 6 недель авторы оценивали состояние легочных артерий, сердца, некоторые гемодинамические параметры, а также состояние местной ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. В ходе эксперимента было выяснено, что у оперированных животных значимо ниже среднее, систолическое и диастолическое давления в легочной артерии, снижено легочное сосудистое сопротивление. Также денервация легочной артерии улучшает функцию правого желудочка, что проявляется в снижении среднего и систолического правожелудочковых давлений, а также в сниженной по сравнению с неоперированной группой относительной массе правого желудочка. Кроме того, в группе с денервацией легочной артерии оказался снижен важнейший маркер сердечной недостаточности – предсердный натрийуретический пептид, выделяющийся в ответ на растяжение

кардиомиоцитов. Морфологическое исследование легочных артерий показало, что толщина меди в группе с денервацией легочной артерии меньше, чем в группе без денервации, что говорит об обратном ремоделировании легочного русла. Кроме того, выяснилось, что в монокроталиновой модели в легочной ткани повышается уровень факторов локальной ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (ангиотенизина II, АПФ, ренина, рецепторов к ангиотензину II и рецепторов к минералокортикоидам), что было определено анализом Вестерн-блот. При денервации легочных артерий уровень данных маркеров близок к контрольным значениям.

Другая работа была посвящена острой модели легочной гипертензии у собак, при которой авторы производили временную окклюзию левой междолевой легочной артерии (Chen et al., 2013). Это приводило к развитию острой легочной гипертензии. Причина, по которой такая окклюзия вызывает острую легочную гипертензию, выяснена не до конца. Авторы считают, что это связано с наличием пульмо-пульмонального рефлекса, который запускается с барорецепторов легочной артерии. При этом нет достаточных доказательств наличия симпатических нервов в этой рефлекторной дуге. Однако, предварительная десимпатизация легочных артерий приводила к тому, что острая легочная гипертензия в данной модели не развивалась. Острая модель легочной гипертензии также была исследована на свиньях, однако для острого повышения легочного сосудистого сопротивления использовали тромбоксан A<sub>2</sub>. Денервация легочных артерий приводила к тому, что в ответ на то же количество тромбоксана A<sub>2</sub> давление в легочной артерии повышалось не столь значительно, как в группе без денервации.

Помимо собак работы по десимпатизации проводились также на крысах, однако моделью служила не прямая десимпатизация, а введение в шейные симпатические ганглии раствора местного анестетика ропивакаина (Na et al., 2014). У крыс с монокроталиновой моделью легочной гипертензии данная процедура приводила к уменьшению относительной массы правого желудочка, а также приближала к контрольным значениям такие показатели, как активность

супероксиддисмутазы (повышена в монокроталиновой модели), активность аргиназы 2 типа (повышена в монокроталиновой модели). Оксидативный стресс также измеряли с помощью оценки уровня малондиальдегида и нитротирозина, которые образуются при оксидативном стрессе. В монокроталиновой модели уровень этих маркеров резко возрастал, при этом у крыс, подвергшихся десимпатизации, опускался практически до контрольных значений. Кроме того, при десимпатизации повышалась активность эндотелиальной NO-синтазы, которая резко падала в монокроталиновой модели, а также повышался уровень нитритов. Измерение уровня нитритов является непрямым способом оценки количества образующегося оксида азота. То есть при десимпатизации, вероятно, восстанавливался уровень оксида азота – важнейшего вазодилататора легочного русла. Также, как у собак, у крыс при десимпатизации легкие подвергались обратному ремоделированию, что снижало тяжесть легочной гипертензии.

Методика десимпатизации легочных артерий хорошо себя показала не только в экспериментальных моделях на животных, но и в клинике. *Chen S.-L. et al.* показали, что денервация легочных артерий у пациентов с легочной гипертензией приводит к улучшению гемодинамических параметров (Chen et al., 2013). Авторы отбирали пациентов со средним давлением в легочной артерии  $\geq 25$  мм рт. ст., получающими стандартную терапию при легочной гипертензии. Исключали пациентов с онкологическими заболеваниями, активными инфекциями, с легочной гипертензией, вызванной токсинами, портальной гипертензией, ХТЭЛГ. Десимпатизацию проводили с помощью абляции легочной артерии через внутривенно введенный катетер. Через 6 месяцев после десимпатизации среднее давление в легочной артерии значительно снизилось, хотя и не достигло значений нормы, также значительно снизилось легочное сосудистое сопротивление, тест «6-минутная ходьба» показал увеличение толерантности к физической нагрузке, а важный маркер сердечной недостаточности NT-proBNP также оказался значительно ниже, чем до процедуры денервации.

В ответ на статью *Chen S. L. et al.* рядом авторов (*Galie` et al.*) была опубликована статья, в которой подвергаются сомнению выводы, приведенные

в данной работе (Galie et al., 2013). В частности, высказываются сомнения в биологической обоснованности того, что пациенты с идиопатической легочной гипертензией, у которых произошло ремоделирование легочного русла, показали функциональное улучшение. Кроме того, авторы статьи указывают на недостаточность данных по безопасности данного метода. Также теми же авторами было опубликовано открытое письмо в адрес *Chen SL et al.* с призывом придерживаться методики рандомизированных исследований, а также с рядом сомнений в правильности определения выживаемости пациентов с денервацией легочных артерий. (Hoepfer et al., 2016). В ответ *Chen SL et al.* опубликовали письмо с разъяснением данных вопросов, где согласились с необходимостью дальнейших рандомизированных исследований по данной теме (Chen et al., 2016). Кроме того, в 2015 году этот же коллектив авторов сделал более массовое исследование, подтвердившее их предыдущие данные (Chen et al., 2015). *Sandoval J.* считает, что это является поводом для дальнейших исследований по данной теме, называя данный метод перспективным (Sandoval, 2018).

#### ***1.3.4. Каротидные тельца***

С учетом большого влияния на тонус сосудов со стороны симпатической нервной системы и влияния на состояние симпатической нервной системы со стороны рецепторов каротидной зоны можно предположить, что гипоксия каротидных телец опосредованно через симпатическую нервную систему влияет на состояние легочных артерий.

Другой важный рецептор зоны бифуркации общей сонной артерии – каротидный синус. Он также способен влиять на состояние артерий малого круга кровообращения.

В литературе нет статей, показывающих влияние хронической гипоксии каротидных телец на состояние легочных артерий, однако есть ряд статей, демонстрирующих роль того или иного острого воздействия на каротидную зону на легочные сосуды. В частности, двусторонняя денервация каротидного синуса у собак (каротидный синус, в отличие от каротидных телец, иннервируется

волоконми блуждающего нерва) приводила к значимому увеличению артериального давления, увеличению ЧСС и к увеличению давления в легочной артерии (Galiniier et al., 1997). С учетом того, что помимо увеличения давления в легочной артерии увеличивается и артериальное давление, можно предположить посткапиллярный механизм развития острой легочной гипертензии: резкая перегрузка левых отделов сердца приводит к повышению давления в правых отделах. Однако нет точного ответа на вопрос, по какой причине возникает повышение легочного сосудистого сопротивления при денервации каротидного синуса.

Sugito et al. проводили эксперименты на крысах, оценивая влияние гипоксии каротидных телец на состояние легочных артерий в остром эксперименте (Sugito et al., 1998). В условиях альвеолярной нормоксии крысам стимулировали каротидные тельца с одной стороны, вводя цианид натрия, который вызывает местную тканевую гипоксию. Это приводило к транзиторному значимому повышению легочного артериального давления. При этом такая же стимуляция каротидных телец у крыс с их односторонней денервацией (перерезка ветвей языкоглоточного нерва) не приводила к изменениям в легочных артериях. При этом в литературе не описано долгосрочных влияний односторонней гипоксии каротидных телец на морфофункциональное состояние легочных артерий.

Можно предположить, что при односторонней ишемии каротидных телец (например, при перевязке общей сонной артерии) каротидные тельца активируются, что усиливает нервную передачу по волокнам языкоглоточного нерва в продолговатый мозг, откуда запускаются различные вегетативные сигналы, в том числе влияющие на состояние легочных артерий. Возможно, ведущую роль в данном процессе играет симпатическая нервная система. Однако, стоит отметить, что односторонняя перевязка общей сонной артерии, кроме ишемии каротидных телец, может привести также и к ишемии каротидного синуса и головного мозга, что может оказать дополнительное влияние на состояние легочных артерий.

В ранних работах показано, что иннервация легочных артерий одного порядка различается у крыс и у человека (Kummer, 2011). У человека имеется разветвленная симпатическая иннервация на уровне как крупных артерий (легочные артерии первого порядка), так и на уровне мелких артерий и артериол. В то же время у крыс показано наличие симпатической иннервации только на уровне наиболее крупных внутрилегочных артерий, вблизи корня легкого. Впрочем, стоит отметить, что влияние симпатической нервной системы может оказываться через хорошо представленную иннервацию бронхиальных артерий, бронхов и *vasa vasorum*, которые присутствуют в легочных артериях (в том числе второго порядка у крыс). Эти влияния могут осуществляться как через основной медиатор симпатической нервной системы (норадреналин), так и через комедиаторы (например, NPY) (Crnkovic et al., 2014). Также показано, что у маленьких крыс (100 – 150 г) симпатическая иннервация легочных артерий распространяется на сосуды малого диаметра (Zussman et al., 1966).

#### **1.4. Заключение из обзора литературы**

Изучение литературы позволяет заключить, что тема исследования влияния долгосрочной ишемии каротидных телец на долгосрочное морфофункциональное состояние легочных артерий недостаточно изучена. Представлены лишь единичные данные о влиянии транзиторной ишемии на состояние малого круга кровообращения. При этом в литературе описана колоссальная роль симпатической нервной системы в развитии легочной гипертензии, что находит большое клиническое применение (денервация легочных артерий как один из способов лечения легочной гипертензии).

Кроме того, интересно также исследовать, влияет ли наличие гемодинамически значимой бляшки в области бифуркации общей сонной артерии на состояние легочных артерий у пациентов. Область бифуркации общей сонной артерии является одной из наиболее частых локализаций атеросклеротических бляшек у больных атеросклерозом - можно предположить, что гемодинамически значимая бляшка в этой области влияет не только на



крово́снабжение голо́вного мозга, но и на крово́снабжение рецепторов каротидной зоны. Ише́мия данных рецепторов у пациентов, как и у крыс, может повлиять на состояние легочных артерий.

Все это делает заявленную тему новой, интересной и актуальной.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Содержание животных

Исследования *in vivo* и *in vitro* выполняли на самцах белых беспородных крыс. Операции по моделированию ишемии области каротидных телец проводили на крысах массой 120 – 150 г. При этом оценка барорефлекса и гемодинамических параметров, физиологические эксперименты на легочных артериях, молекулярные, а также гистологические исследования проводились спустя месяц после операции, когда их вес достигал 250 – 300 г.

Крыс содержали в условиях вивария с полным доступом к пище и воде, с регулируемым световым режимом – 12 часов дня и 12 часов ночи. Поддерживали температуру 18-20°C, крыс содержали в стандартных клетках размера Т4 по 3 – 6 животных в зависимости от возраста. В качестве рациона использовали стандартный сухой комбикорм для крыс. Крыс выдерживали в карантине не менее 14 дней. При проведении экспериментов руководствовались требованиями приказа МЗ РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”, с разрешения биоэтической комиссии МГУ имени М.В. Ломоносова. Эксперименты одобрены комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (номер протокола заседания: 109-д, дата заседания - 04.02.2020).

### 2.2. Моделирование состояния ишемии каротидных телец

Крыс наркотизировали хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг. Препарат в концентрации 50 мг/мл вводили внутривенно. Операционное поле на шее в месте проекции левой общей сонной артерии очищали от шерсти, протирали кожу этиловым спиртом, затем ножницами выполняли разрез на коже параллельно трахее длиной 1 см. Потом по линии разреза вскрывали



Рис. 1. Выделение общей сонной артерии у крысы

поверхностную фасцию шеи и *musculus platysmae*. В подкожно-жировой клетчатке находили наружную яремную вену и брали её на лигатуру. После стеклянным крючком отводили грудинно-ключично-сосцевидную мышцу и протыкали поверхностный листок собственной фасции шеи, обнажая левую общую сонную артерию. Артерию выделяли из сосудисто-нервного пучка (рис. 1), постепенно продвигаясь в сторону бифуркации общей сонной артерии. При достижении бифуркации выделяли также наружную сонную артерию (отличается от внутренней более медиальным положением в месте ее бифуркации, а также наличием большого количества веточек, отходящих от нее – от внутренней сонной артерии в области бифуркации не встречается отходящих веточек). Затем операция могла идти разными путями в зависимости от набираемой группы:

1 группа – крысы с перевязанной общей сонной артерией (группа ОСА): выполняли перевязывание общей сонной артерии на 5 мм ниже ее бифуркации и пересекали.

2 группа – крысы с перевязанной наружной сонной артерией (группа НСА): выполняли перевязывание наружной сонной артерии сразу после ее отхождения от общей сонной артерии и выше области каротидных тельц, а также все веточки, отходящие от нее между двумя лигатурами. Таким образом, каротидные тельца оставались физически интактными, но ишемизированными.

3 группа – крысы с удаленными каротидными тельцами (группа УКТ): выполняли перевязывание наружной сонной артерии так же, как и в первой группе, включая все веточки, отходящие от нее между двумя лигатурами, затем сосудистыми ножницами удаляли область наружной сонной артерии, заключенную между двумя лигатурами на наружной сонной артерии.

В результате операции в первой группе происходило прекращение кровоснабжения всех рецепторов области бифуркации общей сонной артерии (как каротидных тельц, так и каротидного синуса). Кроме того, наступала ишемия головного мозга, которая у крыс слабо выражена при односторонней перевязке общей сонной артерии из-за большой роли Виллизиевого круга. Кроме

того, вегетативные центры крысы оказываются в таком случае совсем неиннервированными, поскольку основное кровоснабжение они получают из системы позвоночных артерий. Во второй группе имела место ишемия лишь каротидных тельц, поскольку каротидные тельца получают кровоснабжение преимущественно от веточек, отходящих от наружной сонной артерии, при этом головной мозг и каротидный синус оставались интактными. В третьей группе достигалось удаление каротидных тельц, получающих кровоснабжение из бассейна наружной сонной артерии в области ее начала.

В рану с целью препятствования распространения гнойных осложнений закладывали антибиотик ряда цефалоспоринов «Цефазолин». Рану ушивали нитками, после чего обрабатывали спиртовым раствором йода.

Перед проведением следующих экспериментов крыс держали 28 суток при тех же условиях, что и перед операцией. Физиологические эксперименты на легочных артериях проводились на контрольных крысах, крысах с перевязанной общей сонной артерией, крысах с удаленными каротидными тельцами. Гистологическое исследование проводилось на контрольных крысах, на крысах с перевязанной общей сонной артерией, на крысах с перевязанной наружной сонной артерией, на крысах с удаленными каротидными тельцами. Молекулярно-биологическое исследование проводилось на контрольных крысах и крысах с перевязкой наружной сонной артерии. Все остальные эксперименты проводились на контрольных крысах, на крысах с перевязкой наружной сонной артерии, а также на крысах с удаленными каротидными тельцами.

## **2.3. Проведение гистологического и макроанатомического исследования**

### ***2.3.1. Взятие материала на гистологическое исследование***

Крыс через 28 дней после операции наркотизировали хлоралгидратом (доза 400 мг/кг). Затем ножницами разрезали кожу по всей длине грудной клетки вдоль грудины. После чего делали разрез мышц под мечевидным отростком и

пересекали мышцы и ребра по всей длине грудной клетки параллельно грудины слева и справа от нее, вскрывая тем самым грудную клетку, обнажая сердце и легкие. После зажимами пережимали верхние и нижнюю полые вены для предотвращения оттока промывающей жидкости из правого желудочка. Затем в правый желудочек с помощью шприца вводили раствор 10% формалина (4% формальдегида) для промывания легких. После сердце и легкие иссекали и извлекали из грудной клетки. Наибольшую по размеру долю правого легкого выделяли и помещали в 10%-ый раствор формалина для дальнейшей фиксации. От сердца отрезали предсердия с фиброзными кольцами, а желудочковый аппарат разделяли на три части – внешнюю стенку правого желудочка (определяли по более тонкой стенке), внешнюю стенку левого желудочка и межжелудочковую перегородку (имеет менее гладкую поверхность, чем внешние стенки желудочков).

### ***2.3.2. Взвешивание разных отделов сердца***

Полученные отделы сердца (внешняя стенка правого желудочка, внешняя стенка левого желудочка, межжелудочковая перегородка) взвешивали на весах с точностью до 0,01 г. Для оценки степени гипертрофии правого желудочка измеряли индекс массы правого желудочка ( $R = m_{пж}/m_{желудочкового\ аппарата}$ ).

### ***2.3.3. Фиксация, проводка и окраска легких***

*Фиксация:* выделенную долю легкого фиксировали в растворе нейтрального 10% формалина (4% формальдегид) в течение 24 часов после взятия материала.

*Проводка:* легкие промывали проточной водой в течение 12 часов. После промывки образцы обезвоживали, последовательно (1 -> 8) меняя растворы, представленные в таблице (см. Приложение 1).

После проводки образцы заливали в парафин. Спустя 24 часа образцы в виде парафиновых блоков крепили на кубики для долгосрочного хранения.

Образцы ориентировали так, чтобы на поперечных срезах оказывался срез доли легкого в сагиттальной плоскости.

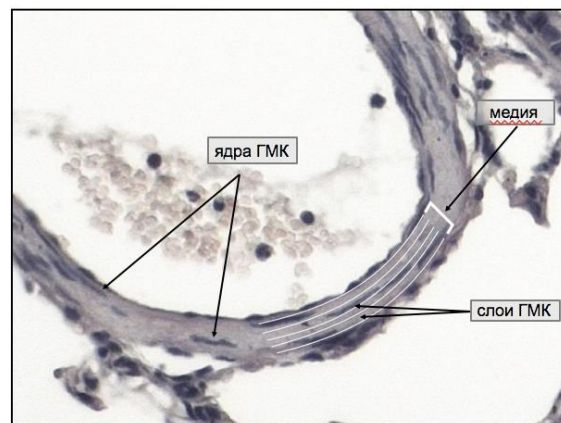
*Изготовление срезов:* парафиновые блоки нарезали на микротоме ERGOSTAR HM 200 (Microm, Германия) на поперечные срезы толщиной 5 мкм, переносили на стекло с покрытием Superfrost. Затем срезы выдерживали 24 часа в термостате при температуре 50°C.

*Окрашивание образцов гематоксилином-эозином:* полученные срезы подвергали сначала депарафинизации, пропуская стекла последовательно через растворы, представленные в таблице (см. Приложение 3, растворы 1 -> 7).

После депарафинизации срезы окрашивали по стандартной методике гематоксилином-эозином (Wood, 1958), после чего выполняли обратную проводку, последовательно пропуская стекла через растворы, представленные в таблице (см. Приложение 2), в обратном порядке (7 -> 1). Экспозиция каждого раствора при обратной проводке составляла 1 мин. Срезы помещали под покровные стекла для длительного хранения.

*Микроскопическое исследование:* микроскопическое исследование проводили с помощью микроскопа Zeiss Imager A1 Axio (Zeiss, Германия), изображения получали и анализировали с помощью программы Axio Vision 3.5 (Zeiss, Германия). Легочные артерии определяли по их тесному соседству с бронхами. С помощью программы ограничивали замкнутыми линиями сосуд со стенкой и просвет сосуда, тем самым определяли площадь сосудистой стенки (в  $\text{мкм}^2$ ).

Для вычисления нормированной на диаметр толщины легочной артерии использовали следующую формулу:  $T = S/d^2$ , где  $T$  – нормированная толщина,  $S$  – площадь стенки артерии,  $d$  – диаметр артерии. Кроме того, подсчитывали количество слоев меди легочной артерии (рис. 2).



**Рис. 2.** Принцип подсчета числа слоев гладкомышечных клеток.

## 2.4. Проведение физиологического эксперимента на изолированных сосудах

### 2.4.1. Описание установки для физиологического эксперимента (рис. 3)

В состав установки для измерения давления в изолированных сосудах входили насосы, предназначенные для обеспечения тока раствора по двум потокам – внутреннему (проходящему через сосуд, насос 2 на рис. 3) и наружному (омывающему сосуд, насос 3 на рис. 3). Температуру раствора для внешнего потока на уровне 37°C поддерживали при помощи бани (5), при этом подогретая жидкость поступала в специальный стеклянный теплообменник, через который проходил раствор внешнего протока. В теплообменнике раствор согревался и поступал в сосуд, закрепленный в ванночке (1). Жидкость из ванночки оттекала с помощью насоса для оттока (4). Давление жидкости в трубках внутреннего потока передавалась также через тройник на датчик давления (тензодатчик СТАТНАМ, США, 6 на рис. 3), в котором изменение давления опосредует изменение электрического сопротивления, то есть происходит преобразование

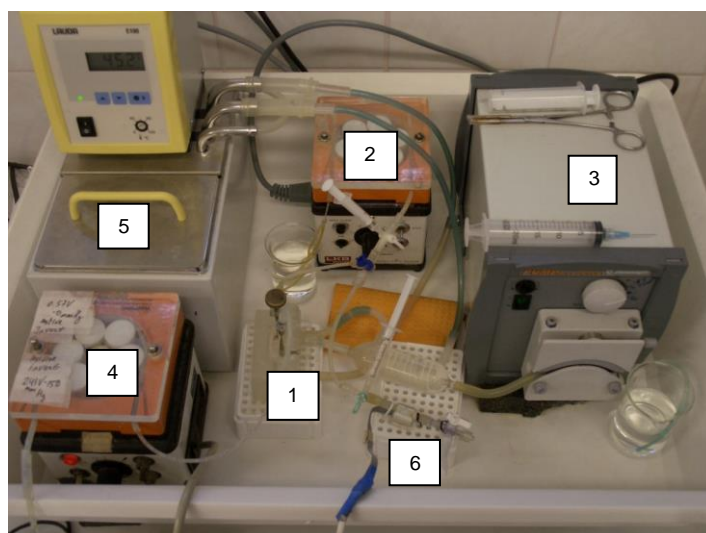


Рис. 3. Установка для физиологического эксперимента

механического давления в электрический сигнал. С помощью аналогово-цифрового преобразователя сигнал регистрировали на компьютере в у.е. После калибровки прибора измерение проводили в мм рт. ст. Для регистрации гидростатического давления использовали частоту оцифровки 2 Гц.

#### 2.4.2. Приготовление раствора Кребса-Хенсляйта

Для перфузии использовали модифицированный физиологический раствор Кребса-Хенсляйта. Состав раствора приведен в табл. 1. Ионный состав и концентрация глюкозы в растворе соответствует их содержанию в крови. pH раствора поддерживался в пределах от 7,35 до 7,45. В случае отклонения значений pH в щелочную сторону (из-за удаления из раствора  $\text{CO}_2$  при хранении – гидролиз гидрокарбоната натрия) добавляли по каплям 1 М раствор  $\text{HCl}$  до достижения pH 7,38. Измерение pH проводили с помощью pH-метра «Mettler Toledo» (Швейцария).

Компонент раствора	Молярная концентрация (мМ)
$\text{NaCl}$	118
$\text{KCl}$	4,7
$\text{CaCl}_2$	2,5
$\text{MgSO}_4$	2,4
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,18
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5
$\text{NaHCO}_3$	24,9

Табл. 1. Состав р-ра Кребса-Хенсляйта.

#### 2.4.3. Выделение внутрилегочных артерий второго порядка

Крыс через 28 дней после операции наркотизировали хлоралгидратом (доза 400 мг/кг, концентрация 100 мг/мл). Затем ножницами делали разрезы по всей длине грудной клетки параллельно грудине слева от нее, пересекая последовательно



Рис. 4. Выделение легочной артерии второго порядка для физиологического эксперимента.

кожу, мышцы и ребра, а также подрезали мышцы под мечевидным отростком, вскрывая тем самым грудную клетку, обнажая сердце и легкие. После корень левого легкого брался пинцетом и пересекался. Выделенное левое легкое



промывали охлажденным раствором Кребса-Хенсляйта и помещали на парафиновую подложку дорсальной стороной вверх. При помощи булавок легкое растягивали чуть больше его размеров. Препаровку легочной артерии проводили под бинокуляром и с помощью тонких пинцетов (прямого и загнутого) и микрохирургических ножниц. Перевязывали сосуды третьего порядка для того, чтобы не было изменения интенсивности потока раствора по ходу всего сосуда. Для того, чтобы не травмировать исследуемую артерию, канюлю вводили во внутрилегочную артерию первого порядка лишь заводя ее конец в исследуемую внутрилегочную артерию второго порядка (рис. 4). Канюлю закрепляли лигатурой. Нужную часть артерии вырезали вместе с небольшим количеством паренхимы и сопутствующим бронхом.

#### ***2.4.4. Проведение физиологического эксперимента (Давыдова и др., 2003)***

Канюлю с артерией закрепляли в ванночке. Скорость потока через сосуд (внутренний поток) держали постоянным – 2 мл/мин. Скорость внешнего потока составляла 5 мл/мин. Для стабилизации давления сосуд держали в режиме постоянного потока в течение 20 минут, не вводя никаких веществ. После стабилизации по внутреннему потоку стали пропускать раствор 5-НТ (серотонина), приготовленный на растворе Кребса-Хенсляйта (концентрация 5-НТ составляла  $5 \cdot 10^{-6}$  М) до достижения стабилизации сосудистого тонуса (примерно 10 мин). Затем крыс рандомизировали на 3 группы. Первой группе вводили раствор 5-НТ, второй – раствор 5-НТ с блокатором растворимой гуанилатциклазы ODQ (1H-[1,2,4]оксадиазоло[4,3-а]хиноксалин-1-он в концентрации 1 мкМ), третьей – раствор 5-НТ с блокатором калиевых каналов (с действием преимущественно в выбранной концентрации на кальций зависимые  $K^+$ -каналы) ТЭА (тетраэтиламмоний в концентрации 5 мМ) (Evans et al.). Затем ожидали еще 10 минут до стабилизации тонуса сосуда. В группе без блокаторов раствор 5-НТ не меняли. Изучали дозозависимую дилатацию легочной артерии на возрастающие концентрации донора оксида азота SNP (нитропрусида

натрия) ( $10^{-11}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-9}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-7}$  М), последовательно меняя растворы на содержащие SNP в большей концентрации по сравнению с предыдущим. В случаях, когда не наблюдалось расслабления на концентрацию SNP  $10^{-7}$  М, вводили раствор, содержащий SNP в концентрации  $10^{-6}$  М. SNP вводили кумулятивно. В случае, если расслабления на последнюю концентрацию не наблюдалось, данная крыса не включалась в статистическую обработку и эксперимент считался неудачным. Состав растворов (все приготовлены на физиологическом растворе Кребса-Хенсляйта) приведен в таблице (см. Приложение 3), протокол эксперимента приведен на рис. 4. Результаты получены в виде дозозависимой кривой расслабления легочной артерии. В узлах ломаной представлены следующие значения:  $(P_{[SNP]} - P_{\text{начальное}}) * 100\% / P_{\text{начальное}}$ . Иными словами, представлялся процент расслабления легочной артерии от начального тонуса, полученного при перфузии раствором 5-НТ (или 5-НТ с блокатором), в ответ на введение SNP (рис. 5).

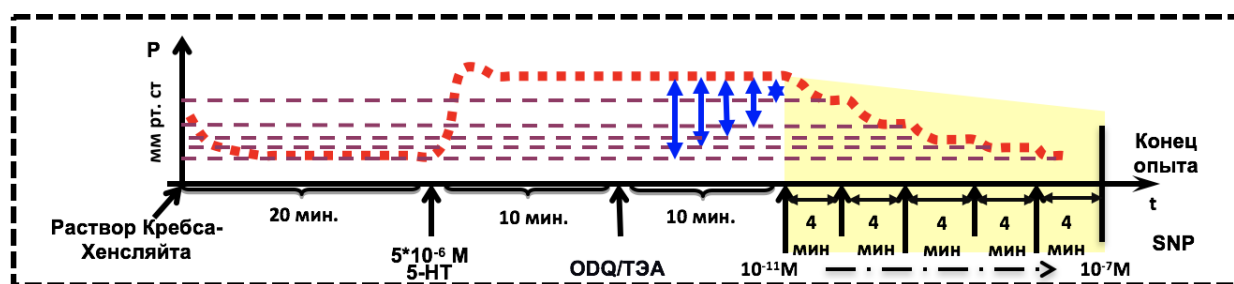


Рис. 5. Протокол физиологического эксперимента

## 2.5. Проведение молекулярно-биологического исследования легочных сосудов у крыс

Молекулярно-биологическое исследование проводили с целью выявления уровня экспрессии генов, кодирующих калиевые каналы, в частности субъединиц  $K_{ir}$  6.1 и SUR2B для  $K_{ir}$ -канала. Именно SUR2B характерен для АТФ-чувствительных калиевых каналов гладких мышц кровеносных сосудов.

### **2.5.1. Выделение РНК**

Через сутки после проведения исследований по барорефлексу крыс анестезировали хлоралгидратом (доза 400 мкг/кг внутривенно), после чего вскрывали грудную клетку и вынимали из нее легкие. Легкие помещали в охлажденный физиологический раствор (0,9% NaCl). Затем под бинокляром выделяли легочные артерии второго порядка и переносили в пробирку. РНК выделяли хлороформно-фенольным методом с предварительной инкубацией при 37°C в течение 25 минут при постоянном перемешивании в 100 мкл раствора 0,2% коллагеназы в фосфатно-солевом буфере (1,7 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,2 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 мМ NaCl, pH = 7,4) с добавлением ингибитора РНК-аз (10 единиц активности). Затем добавляли 500 мкл TRIzol-реагента ("Sigma-Aldrich", США), после чего гомогенизировали на Vortex 15 мин. Нерастворенные частицы осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и добавляли 0,1 мл хлороформа. В течение 60 секунд образцы встряхивали, затем инкубировали 10 минут при комнатной температуре. С целью разделения раствора на фазы проводили центрифугирование при 13500 g в течение 15 минут при 20°C. Получившийся раствор включал в себя три фазы, верхняя из которых содержала РНК. Эту фазу переносили в стерильную пробирку. После к ней приливали изопропиловый спирт в соотношении 1 : 1,1 (образец : изопропиловый спирт). Смесь тщательно перемешивали, затем инкубировали 10 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 14000 g в течение 35 минут при 20°C. В результате центрифугирования оставался осадок РНК под водно-спиртовой фазой. Водно-спиртовую фазу удаляли, а к осадку прибавляли 75% раствор этанола в объеме 500 мкл. Получившуюся смесь повторно центрифугировали при 12000 g в течение 5 минут, водно-спиртовую фазу снова снимали и повторно прибавляли 75% раствор этанола в объеме 500 мкл. После еще одного центрифугирования в этих же условиях водно-спиртовую фазу удаляли, а промытый осадок растворяли в 20 мкл воды, которая подверглась предварительной обработке

диэтилпиروкарбонатом (H<sub>2</sub>O-DEPC) и содержала 2 единицы активности ингибитора РНК-аз.

### ***2.5.2. Проведение обратной транскрипции***

ДНК-азную обработку после разведения РНК не проводили. Для последующей нормировки понадобились соответствующие пробы для каждого образца, в которых не прошла обратная транскрипция («минусовые» пробы). Для проведения обратной транскрипции в пробирки помещали по 6 мкл пробы после разведения РНК. Затем пробы прогревали 7 минут при 70°C с последующим охлаждением на льду. После к пробам добавляли по 100 ед. активности ревертазы (обратной транскриптазы) MMuLV ("Fermentas", США), 1 ед. ингибитора РНК-азы, 0.1 мкг олиго-dT праймеров (18 нуклеотидов, "Sintol"), 60 пкмоль гексарандом праймеров ("Sintol"), 400 мкМ дезоксинуклеотидфосфатов ("Fermentas", США). Общий объем инкубационной пробы для обратной транскрипции составлял 20 мкл. После этого инкубировали пробы 10 мин при 25°C. Обратную транскрипцию проводили в течение 60 минут при 42°C. В «минусовые» пробы раскапывали всё вышеперечисленное, кроме ревертазы. Успешность обратной транскрипции оценивали последующим ПЦР на ген «домашнего хозяйства» β-актин.

### ***2.5.3. Проведение полимеразной цепной реакции***

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали амплификатор «Терцик-400». ПЦР проводили под слоем минерального масла. В пробирки вносили пробы, содержащие продукт обратной транскрипции (комплементарную ДНК) или соответствующие «минусовые» пробы в объеме 3 мкл, а также буферный раствор для ПЦР (50 мМ Трис-НСl, рН=8.8, 15 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 мМ КСl, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton-X100), 7,7% глицерина, 0,12 мМ Cresol red, 0,13 мМ дезоксинуклеотидфосфатов, 4 пкмоль специфических праймеров, и 0,5 ед. активности Taq-полимеразы. Для β-актина устанавливали следующие температурные и временные условия: 94°C (плавление) – 22 с, 59°C

(отжиг праймера) – 25 с, 72°C (полимеризация) – 20 с. ПЦР проводили в течение 41 цикла. Для  $K_{ir}$  6.1-субъединицы устанавливали следующие температурные и временные условия: 94°C (плавление) – 22 с, 58,1°C (отжиг праймера) – 25 с, 72°C (полимеризация) – 35 с. ПЦР проводили в течение 53 циклов. Для SUR2B-субъединицы устанавливали следующие температурные и временные условия: 94°C (плавление) – 22 с, 60,3°C (отжиг праймера) – 25 с, 72°C (полимеризация) – 20 с. ПЦР проводили в течение 49 циклов. Последовательности праймеров представлены в Приложении 5 (Yokoshiki et al., 1998; Duan et al.).

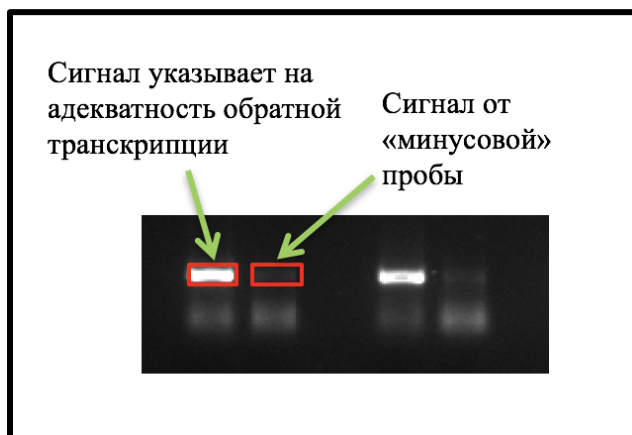
#### ***2.5.4. Проведение электрофореза***

Для оценки степени амплификации проводили электрофорез проб после ПЦР в 2% агарозном геле. Гель готовили следующим образом: к 3 г агарозы («Helicon», Россия) приливали 150 мл разведенного на дистиллированной воде однократного буфера ТАЕ для электрофореза (использовали 50-кратный буфер, «Fermentas», США), содержащего 40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты и 1 мМ ЭДТА. Затем полученный раствор варили в микроволновой печи на мощности 700 В в течение 2 минут до вязкого однородного состояния. Затем к полученному раствору добавляли 7 мкл раствора бромистого этидия (10 мг/мл) для флуоресцентной окраски ДНК. Гель заливали в ванночку, в которой с помощью гребенок делали лунки для проб. Застывший гель с проделанными лунками помещали в камеру, заполненную однократным раствором ТАЕ для электрофореза, после чего проводили электрофорез ( $U = 200$  В,  $I = 400$  мА,  $t = 15$  мин). ДНК визуализировали с помощью ультрафиолетового света. Наличие кДНК считали доказанным в тех пробах, в которых в результате электрофореза наблюдалась светящаяся полоса, соответствующая известной длине ампликона. Производилась фотосъемка геля на цифровую камеру "Kodak DC 290 Zoom".

#### ***2.5.5. Подсчет концентрации ДНК-ампликонов***

Подсчет яркости проб производили при помощи программы GellImager. Для подсчета относительного содержания ампликонов (а значит, концентрации

кДНК и мРНК)  $K_{ir}$ , SUR и  $\beta$ -актина вычитали яркость «минусовой» пробы из соответствующей пробы, в которой прошла обратная транскрипция (рис. 6). Относительную концентрацию кДНК  $K_{ir}$  и SUR нормировали на концентрацию кДНК (мРНК) гена «домашнего хозяйства»  $\beta$ -актина.



**Рис. 6.** Ампликоны кДНК  $\beta$ -актина. При проведении электрофореза после ПЦР в соседние с образцами лунки помещали образцы, в которые не добавляли ревертазу

## 2.6. Определение чувствительности барорефлекса и измерение гемодинамических параметров

Определение чувствительности барорефлекса проводили на бодрствующих крысах с использованием установки для регистрации давления. За сутки до эксперимента крысам ставили два катетера – венозный для введения веществ и артериальный для измерения гемодинамических параметров. Для этого крыс наркотизировали хлоралгидратом (доза 400 мкг/кг внутривенно), выделяли бедренную артерию, а также наружную яремную вену. В бедренную артерию катетер проводили так, что его кончик находился в брюшном отделе аорты. Свободные концы катетеров проводили под кожей, выводили на холке и закрепляли.

Во время эксперимента свободный конец артериального катетера присоединяли через тройник к датчику давления (тензодатчик STATNAM, США), а венозного – к инсулиновому шприцу, содержащему растворы. В тензодатчике изменение давления опосредует изменение электрического сопротивления, то есть происходит преобразование механического давления в

электрический сигнал. С помощью аналогово-цифрового преобразователя сигнал регистрировали на компьютере в у.е. После калибровки прибора измерение проводили в мм рт. ст. Для регистрации гидростатического давления использовали частоту оцифровки 100 Гц. По волнам пульсового давления автоматически высчитывалась частота сердечных сокращений (ЧСС).

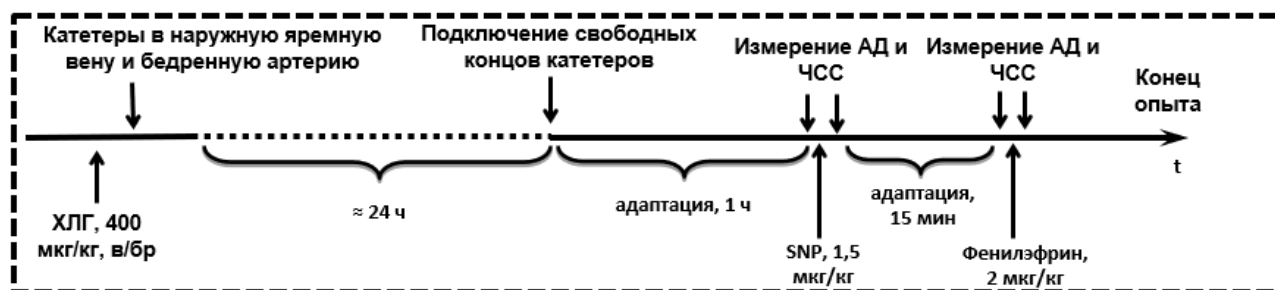
В качестве веществ для оценки кардиобарорефлекса использовали донор оксида азота нитропруссид натрия (SNP), а также  $\alpha_1$ -адреномиметик фенилэфрин. Все растворы готовили, используя раствор NaCl 0,9%.

Во избежание тромбоза артериального и венозного катетеров профилактически (либо через тройник, присоединенный к артериальному катетеру, либо через шприц, присоединенный к венозному катетеру) вводили раствор гепарина натрия (20 мкл, 50 МЕ/мл). Для приготовления раствора использовали гепарин натрия (компания ОАО «Синтез», Россия) 5000 МЕ/мл. Указанный препарат разводили в соотношении 1:100 раствором NaCl 0,9%.

После присоединения катетеров крысы адаптировались к условиям в течение часа. За это время у них стабилизировались ЧСС и артериальное давление. Через час отмечали уровень артериального давления и ЧСС как начальный уровень до введения препаратов. После этого вводили раствор SNP (1,5 мкг/мл, готовили первичный раствор 1,5 мг/мл, затем разводили 1:100 на растворе NaCl 0,9%, в шприц набирали объем, равный [вес крысы, г/10] мкл, объем доводили раствором NaCl, 0,9% до 50 мкл) и повторно отмечали артериальное давление и ЧСС. SNP как донор оксида азота действует на гладкие мышцы артерий, вызывая их расслабление, вследствие чего давление в большом круге падает. В ответ на падение давления активируется барорефлекс и, как следствие, симпатическая нервная система, что приводит к возрастанию ЧСС. После введения SNP крысы снова адаптировались в течение 15 минут. За это время SNP метаболизируется в организме, а ЧСС и артериальное давление возвращается к норме. Через 15 минут снова отмечали уровень артериального давления и ЧСС. Затем вводили фенилэфрин (2 мкг/мл, готовили маточный раствор 2 мг/мл, затем разводили 1:100 на растворе NaCl 0,9%, в шприц набирали

объем, равный [вес крысы, г/10] мкл, объем довели раствором NaCl, 0,9% до 50 мкл) и еще раз измеряли уровни ЧСС и артериального давления. Фенилэфрин как адреномиметик приводил к увеличению тонуса сосудов, что повышало артериальное давление. Вследствие этого активировалась парасимпатическая нервная система, что приводило к снижению ЧСС. Протокол эксперимента представлен на рис. 7.

После проведения всех измерений рассчитывали чувствительность барорефлекса. Для этого подсчитывали отношение разниц среднего артериального давления и ЧСС до и после введения веществ. Чувствительность рассчитывали по формуле  $H = |\Delta\text{ЧСС}|/|\Delta\text{СрАД}|$ .



**Рис. 7.** Протокол эксперимента по определению чувствительности барорефлекса

## 2.7. Измерение уровня глюкозы крови у крыс

Измерение уровня глюкозы крови у крыс проводили с помощью глюкометра «OneTouch Select Plus, Lifescan Europe» (Швейцария). Для этого крысам ножницами надрезали конец хвоста, чтобы взять кровь из русла хвостовой артерии. Кровь наносили на датчик глюкометра.

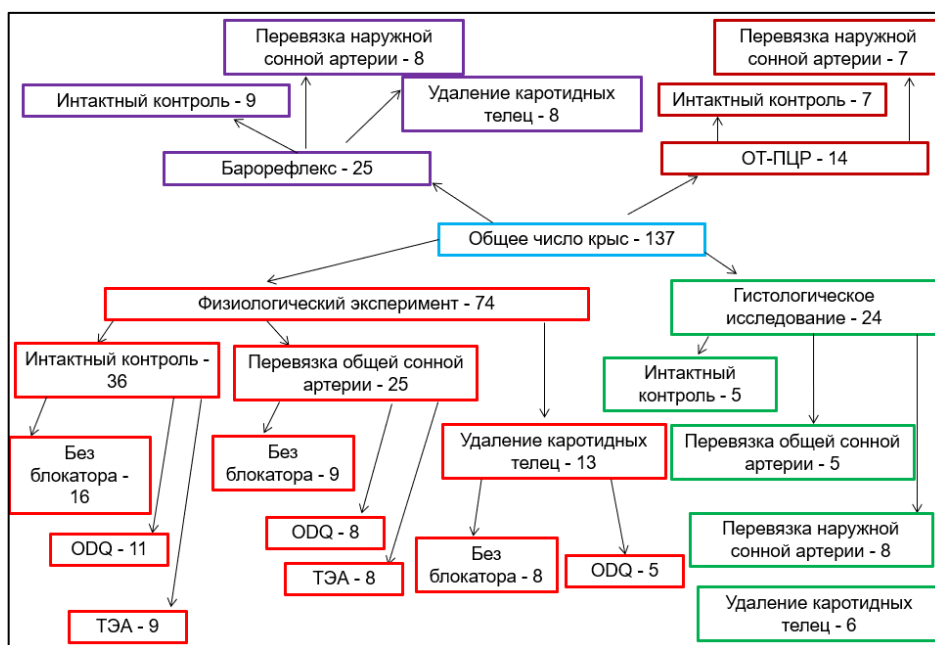
## 2.8. Протокол и дизайн эксперимента

Для гистологического исследования в общей сложности было взято 22 крысы, из которых 5 крыс в группе интактного контроля, 5 крыс в группе с перевязкой общей сонной артерии, 8 крыс в группе с перевязкой наружной сонной артерии, 6 крыс в группе с удалением каротидных телец. Для физиологического эксперимента на изолированных сосудах было взято всего 74 крысы, из которых 36 крыс в группе интактного контроля (16 крыс – опыты без блокатора, 11 крыс – опыты с блокатором ODQ, 9 крыс – опыты с блокатором



ТЭА), 25 крыс в группе с перевязкой общей сонной артерии (9 крыс – опыты без блокатора, 8 крыс – опыты с ODQ, 8 крыс – опыты с ТЭА), 13 крыс в группе с удалением каротидных телец (8 крыс – опыты без блокатора, 5 крыс – опыты с ODQ). Для исследований барорефлекса было взято всего 25 крыс, из которых 9 крыс попали в группу интактного контроля, 8 крыс – в группу с перевязкой наружной сонной артерии, еще 8 крыс – в группу с удалением каротидных телец. Для проведения ОТ-ПЦР было взято 14 крыс, из которых 7 крыс попали в группу интактного контроля, а 7 крыс – в группу с перевязкой наружной сонной артерии. Для всех крыс проводили измерение массы желудочков. Таким образом, всего для данной работы было взято 137 крыс.

Разделение крыс на группы представлено на рис. 8.



**Рис. 8.** Протокол эксперимента на лабораторных животных

Дизайн эксперимента представлен на рис. 9.

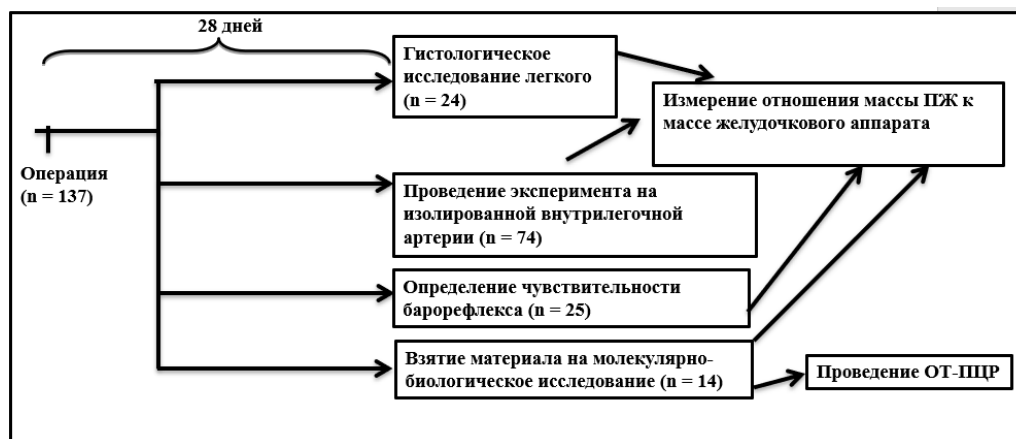


Рис. 9. Дизайн эксперимента на лабораторных животных

## 2.9. Ретроспективное исследование пациентов с атеросклеротической бляшкой в каротидной области

Исследование на пациентах проводилось с целью выявить соответствие между клиническими данными и лабораторными. У пациентов с атеросклерозом каротидной зоны рецепторы бифуркации общей сонной артерии ишемизированы, так же, как и у крыс с перевязанной общей или наружной сонной артерией. Это обстоятельство позволяет предположить, что у таких пациентов может развиваться состояние, похожее на легочную гипертензию. Для этого была исследована частота встречаемости признаков легочной гипертензии у этих больных.

Исследовали пациентов, проходивших лечение в ФГАУ Национальном медицинском исследовательском центре нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко МЗ РФ по поводу наличия в области бифуркации общей сонной артерии гемодинамически значимой атеросклеротической бляшки. Таким пациентам было рекомендовано проведение каротидной эндартерэктомии – удаление атеросклеротической бляшки из этой области. Всем пациентам до операции проводили ультразвуковую доплерографию брахиоцефальных артерий, а также эхокардиографическое исследование сердца.

Кроме того, исследовали пациентов, проходивших лечение в ФГБУ Национальном медицинском исследовательском центре кардиологии МЗ РФ по поводу различных заболеваний сердечно-сосудистой системы.

В общей сложности проводили ретроспективное исследование историй болезни 60. пациентов (36 из центра Бурденко и 24 из Кардиологического центра).

Кроме оценки частоты встречаемости признаков легочной гипертензии из историй болезни были выкопированы и исследованы некоторые лабораторные показатели.

Показатели общего и биохимического анализа крови исследовались с целью оценки метаболического статуса пациента.

### ***2.9.1. Критерии включения в исследование и исключения из исследования***

Критерии включения в исследование: пациенты, которые были включены в исследование, должны были иметь атеросклеротическую бляшку в области бифуркации общей сонной артерии. Включались пациенты, имеющие как одностороннее, так и двустороннее поражение сонных артерий. Также не имел значения возраст и пол пациентов. В истории болезни этих пациентов обязательно должны были присутствовать эхокардиографическое исследование сердца (Эхо-КГ), а также ультразвуковая доплерография (УЗДГ) брахиоцефальных артерий.

Критерии исключения из исследования: заболевания, связанные с самостоятельным развитием легочной гипертензии:

- сердечная недостаточность любого функционального класса по NYHA;
- инфаркт миокарда в анамнезе, постинфарктный кардиосклероз после перенесенного инфаркта миокарда;
- артериальная гипертензия  $\geq 3$  степени;

- врожденные пороки сердца со значительным изменением гемодинамики;
- приобретенные пороки сердца любого генеза, за исключением трикуспидальной недостаточности, которая является следствием легочной гипертензии;
- портальная гипертензия;
- бронхиальная астма;
- хроническая обструктивная болезнь легких;
- эмфизема легких;
- бронхоэктатическая болезнь;
- интерстициальные заболевания легких;
- постоянная и персистирующая формы фибрилляции предсердий;
- тромбофлебит вен нижних конечностей.

### ***2.9.2. Исследование историй болезни***

Из историй болезни выкопировались следующие данные:

- клинический диагноз, включая сопутствующие и фоновые заболевания;
- данные УЗИ брахиоцефальных артерий (с процентом перекрытия атеросклеротической бляшкой просвета сонных артерий)
- Эхо-КГ (переднезадний размер правого желудочка, расчетное давление в легочной артерии, размеры левого предсердия, конечный систолический объем левого желудочка, наличие или отсутствие признаков легочной гипертензии);
- данные общеклинического анализа крови (эритроциты, тромбоциты, скорость оседания эритроцитов (СОЭ));

- данные биохимического анализа крови (общий холестерин, липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), глюкоза, С-реактивный белок).

По полученным результатам пациентов разделили на две группы:

- имеющие гемодинамически значимую бляшку (> 75% перекрытия просвета сосуда);
- имеющие гемодинамически незначимую бляшку (< 45% перекрытия просвета сосуда).

Получившиеся две группы сравнивали между собой по вышеперечисленным параметрам.

## 2.10. Статистическая обработка данных

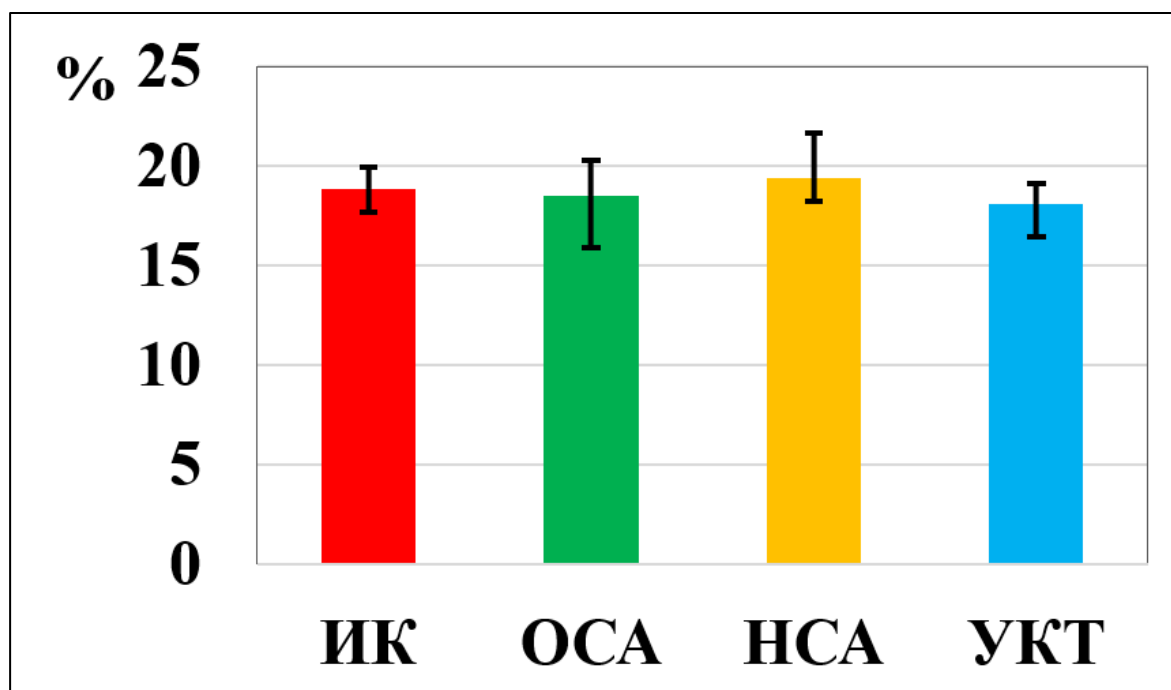
Для обработки данных использовали пакет программ STATISTICA 10 (Stat Soft Inc). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  SEM, если распределение было нормальным, либо в виде медиан и квартилей (верхнего и нижнего), если распределение не являлось нормальным. Данные по графикам физиологического эксперимента находятся в таблицах Приложений. Для оценки распределения на нормальность использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Если распределение не являлось нормальным хотя бы в одной из сравниваемых групп, для статистического анализа использовали точный критерий Фишера в случае малых групп и тест Манна-Уитни для сравнения независимых групп. Критерий Краскела-Уоллиса для множественного сравнения нескольких независимых групп не применяли ввиду того, что все опытные группы сравнивали с контролем, а не между собой. Для множественного сравнения непараметрических выборок с контролем отдельного теста не существует. Если распределение являлось нормальным в двух сравниваемых группах, то для статистического анализа использовали t-тест Стьюдента. Для частотного анализа использовали критерий  $\chi^2$  (Пирсона). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Результаты гистологического и макроанатомического исследований

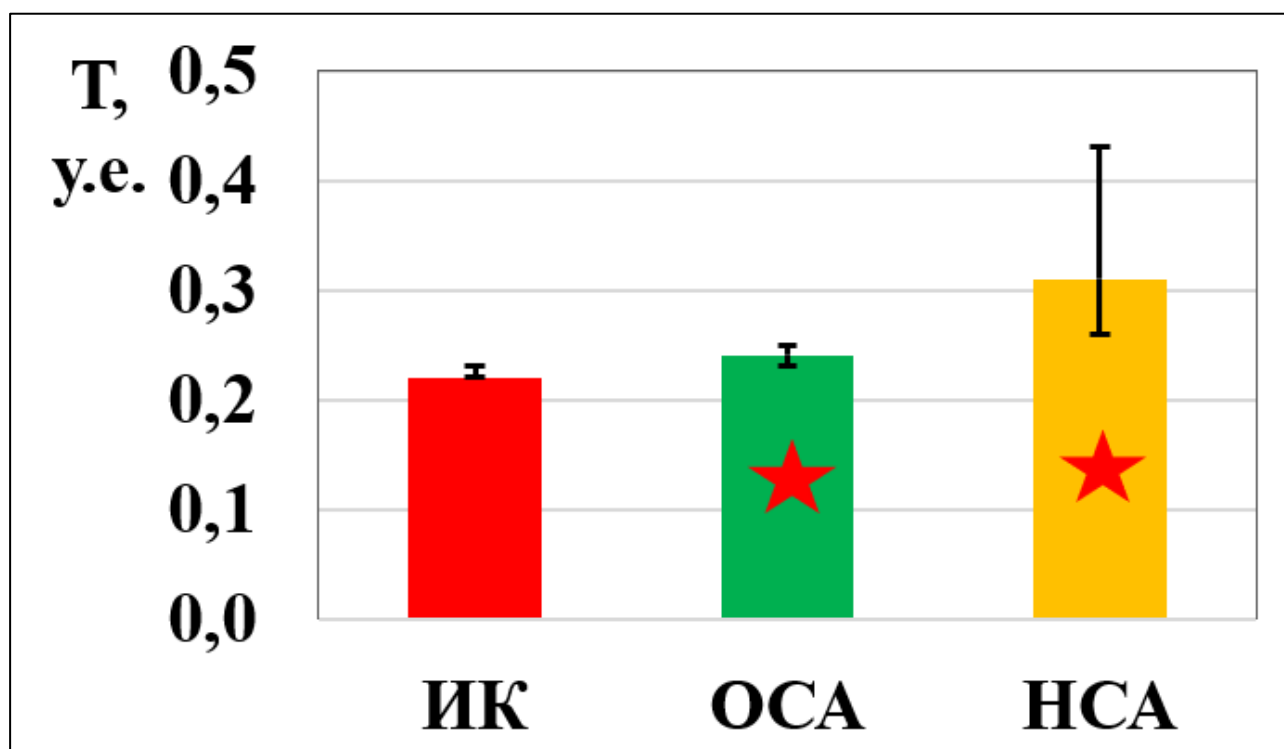
Для оценки развития легочной гипертензии были проведены морфогистологические оценки состояния легочных артерий малого диаметра. Так как при легочной гипертензии ожидается компенсаторное увеличение массы правого желудочка, оценивали относительную массу правого желудочка

Медиана относительной массы правого желудочка у интактных крыс составила 18,83% (нижний квартиль – 17,67%, верхний квартиль – 19,94%) от общей массы желудочкового аппарата, у крыс с пересеченной общей сонной артерией – 18,47% (нижний квартиль – 15,87%, верхний квартиль – 20,29%), у группы крыс с перевязанной наружной сонной артерией – 19,35% (нижний квартиль – 18,23%, верхний квартиль – 21,66%), у крыс удаленными каротидными тельцами – 18,09% (нижний квартиль – 16,46%, верхний квартиль – 19,12%). Значимых отличий параметра, применяемого для оценки гипертрофии миокарда, у всех трех опытных групп от контроля не наблюдалось, что говорит о том, что относительная масса правого желудочка остается в пределах значений контрольной группы (рис. 10).



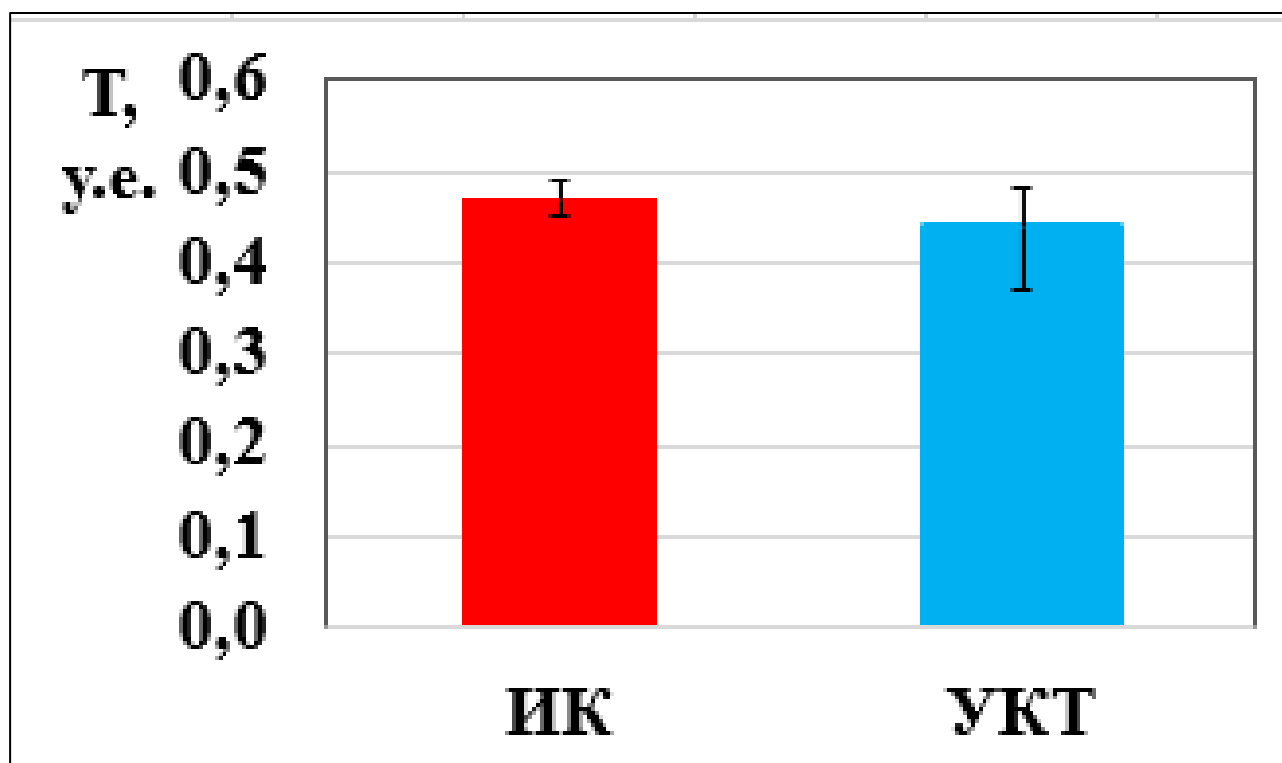
**Рис. 10.** Сравнение относительной массы правого желудочка в разных группах (ИК-интактный контроль, ОСА – группа с перевязкой общей сонной артерии, НСА – группа с перевязкой наружной сонной артерии, УКТ – группа с удалением каротидных телец).

С другой стороны, были получены значимые отличия в параметрах поперечных сечений легочных артерий. У интактных крыс медиана  $T$  (нормированная на квадрат диаметра площадь меди легочной артерии) составила 0,22 у.е. (нижний квартиль – 0,22 у.е., верхний квартиль – 0,23 у.е.), у крыс с перевязкой общей сонной артерии – 0,24 у.е. (нижний квартиль – 0,23 у.е., верхний квартиль – 0,25 у.е.), у группы с перевязкой наружной сонной артерии – 0,31 у.е. (нижний квартиль – 0,26 у.е., верхний квартиль – 0,43 у.е.). Значения во всех группах с ишемией области каротидных телец значительно отличались от контроля в сторону увеличения ( $p < 0,05$ ), что говорит о том, что у крыс как с перевязанной общей, так и с перевязанной наружной сонной артерией наблюдается умеренное, но значимое увеличение толщины легочной артерии. Наиболее выражено это проявляется в группе с перевязкой наружной сонной артерии (рис. 11, 15).



**Рис. 11.** Сравнение нормированной на квадрат диаметра площади меди легочной артерии в разных группах,  $T$  (ИК-интактный контроль, ОСА – группа с перевязкой общей сонной артерии, НСА – группа с перевязкой наружной сонной артерии).

Техника фиксации для гистологического анализа материала легочных артерий у крыс с удаленными каротидными тельцами отличалась от таковой в других группах (не было промывки формалином легочного русла), поэтому для этой группы был предусмотрен свой контроль. Как показали данные по интактному контролю, другой способ фиксации приводил к значимому визуальному утолщению стенок легочных артерий. По этим данным медиана Т в группе интактного контроля составила 0,46 (нижний квартиль – 0,45, верхний квартиль – 0,49), а в группе крыс с удаленными каротидными тельцами – 0,46 (нижний квартиль – 0,45, верхний квартиль – 0,5). Таким образом, значимых различий между данными двумя группами относительно толщины легочных артерий не наблюдалось (рис.12, 16).

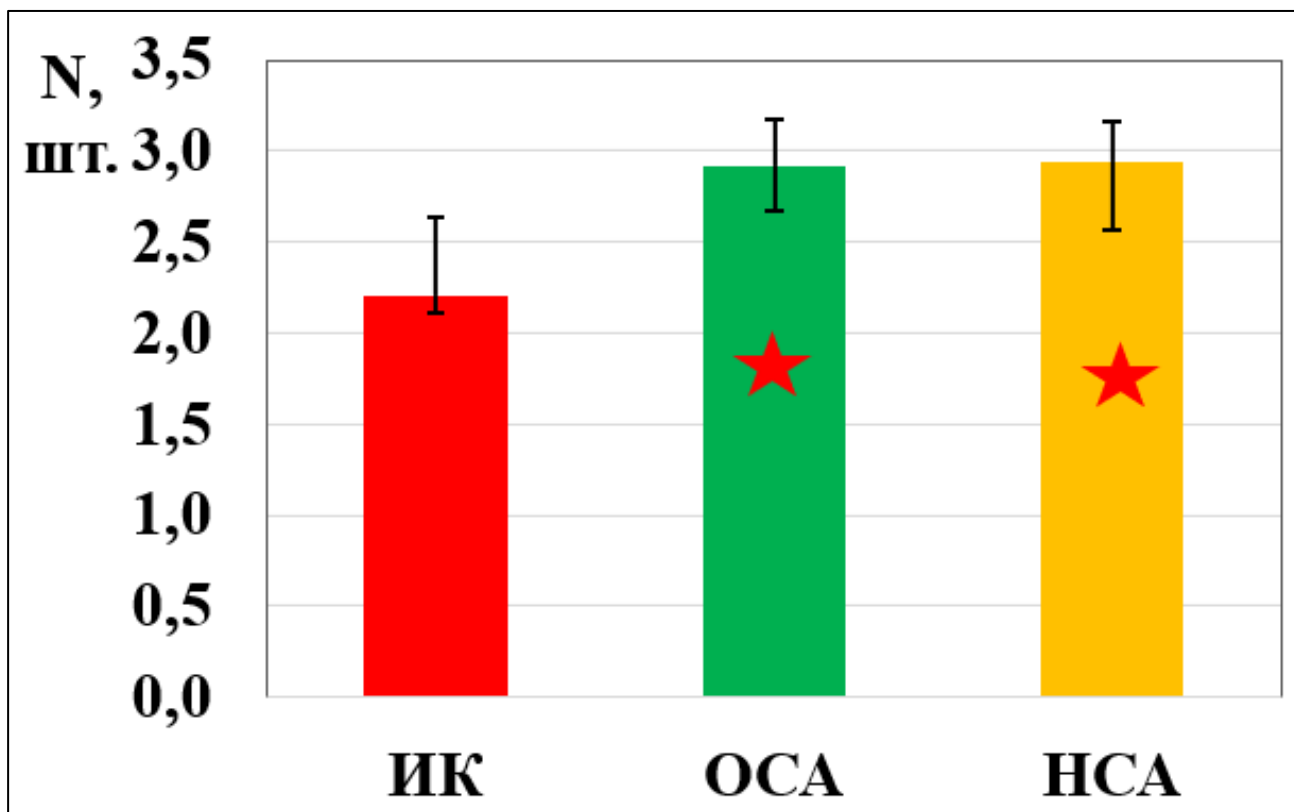


**Рис. 12.** Сравнение нормированной на квадрат диаметра площади меди легочной артерии в разных группах, Т (ИК-интактный контроль, УКТ – группа с удалением каротидных телец).

У интактных крыс медиана количества слоев меди легочных артерий N составляет 2,20 (нижний квартиль – 2,11, верхний квартиль – 2,63), у крыс с перевязкой общей сонной артерии – 2,92 (нижний квартиль – 2,67, верхний квартиль – 3,17), у крыс с перевязкой наружной сонной артерии – 2,94 (нижний

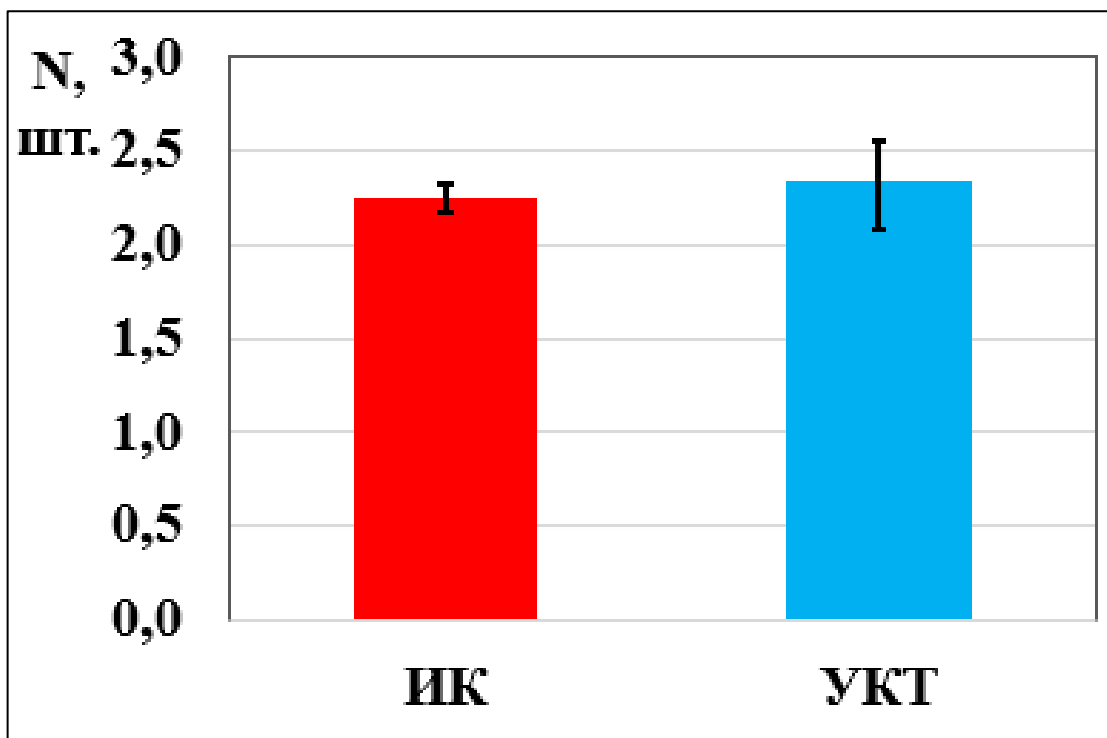


квартиль – 2,57, верхний квартиль – 3,16). Значения во всех группах с ишемией каротидных телец были значимо выше, чем в группе интактного контроля, что говорит не только о гипертрофии, но и о гиперплазии гладкомышечных клеток легочных артерий (рис. 13, 15).

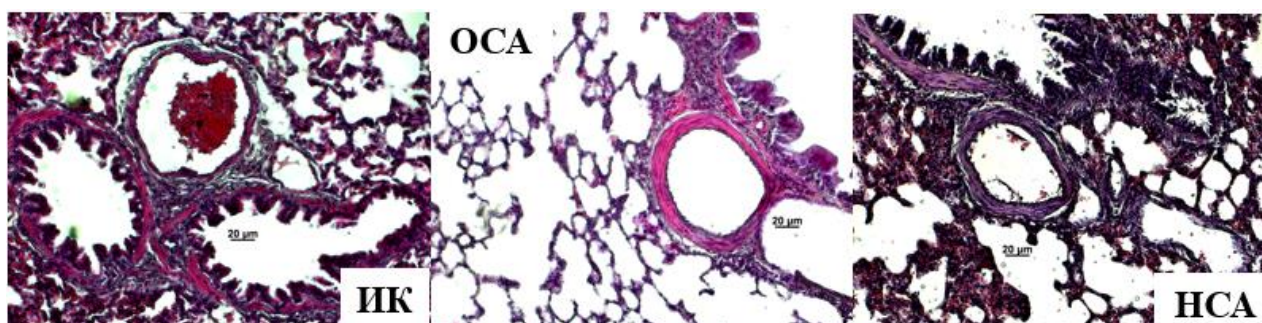


**Рис. 13.** Сравнение количества слоев меди легочной артерии в разных группах N (ИК-интактный контроль, ОСА – группа с перевязкой общей сонной артерии, НСА – группа с перевязкой наружной сонной артерии).

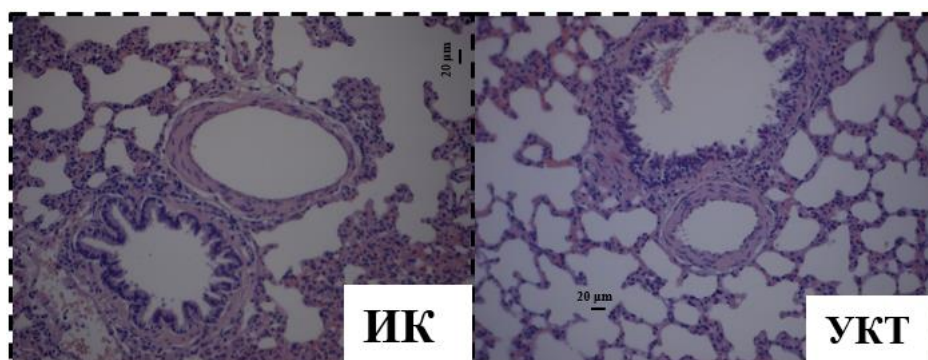
Для группы с удаленными каротидными тельцами, как было сказано выше, использовали отдельный контроль. По этим данным медиана количества слоев меди легочных артерий N в контрольной группе составляет 2,35 (нижний квартиль – 2,09, верхний квартиль – 2,56), в группе с удаленными каротидными тельцами – 2,29 (нижний квартиль – 2,19, верхний квартиль – 2,38). В группе с удалением каротидных телец не наблюдалось значимого снижения количества слоев гладкомышечных клеток по сравнению как с группой интактного контроля (рис. 14, 16).



**Рис. 14.** Сравнение количества слоев меди легочной артерии в разных группах N (ИК-интактный контроль, УКТ – группа с удалением каротидных телец).



**Рис.15** (а-в). Примеры снимков гистологических срезов легочных артерий у разных крыс (ИК-интактный контроль, ОСА – группа с перевязкой общей сонной артерии, НСА – группа с перевязкой наружной сонной артерии).

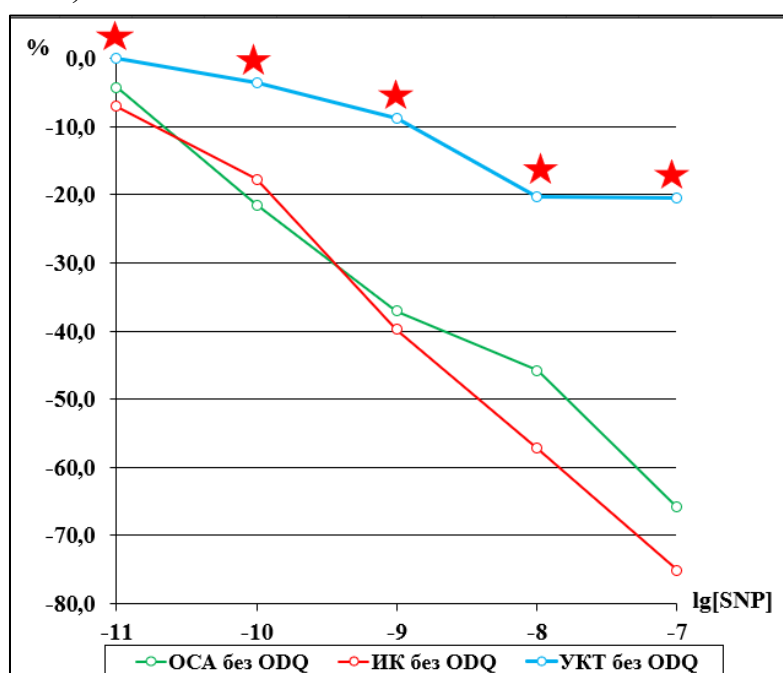


**Рис. 16** (а-б). Примеры снимков гистологических срезов легочных артерий у разных крыс (ИК-интактный контроль, УКТ-группа с удалением каротидных телец).

### 3.2. Результаты физиологических экспериментов на изолированных сосудах

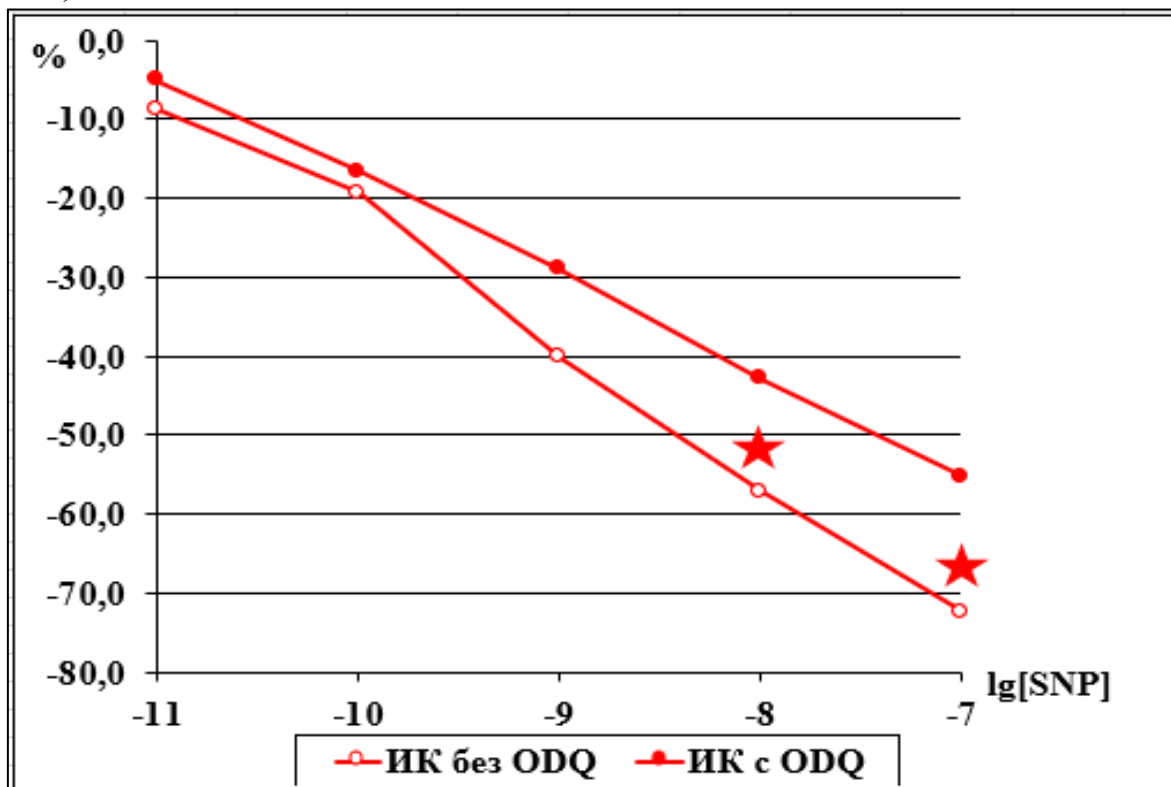
Из морфогистологического исследования можно предположить развитие умеренной легочной гипертензии. Как правило, развитие легочной гипертензии связывают с дефицитом вазодилататорных реакций, поэтому была проведена оценка NO-зависимого расслабления. По результатам физиологического эксперимента была получена ломаная дозозависимого расслабления легочного сосуда в ответ на донор NO. В контрольной группе, в группе с перевязкой общей сонной артерии и группе с удалением каротидных телец были получены значения расслабления легочных артерий в процентах от полученного в ответ на перфузию серотонином прироста гидростатического давления (см. Приложение).

Статистически значимых отличий между контрольной группой и группой с перевязанной общей сонной артерией в экспериментах без использования блокатора получено не было. При этом были обнаружены статистические отличия на всех концентрациях донора оксида азота между контрольной группой и группой с удаленными каротидными тельцами в опытах без использования блокатора (рис. 17).



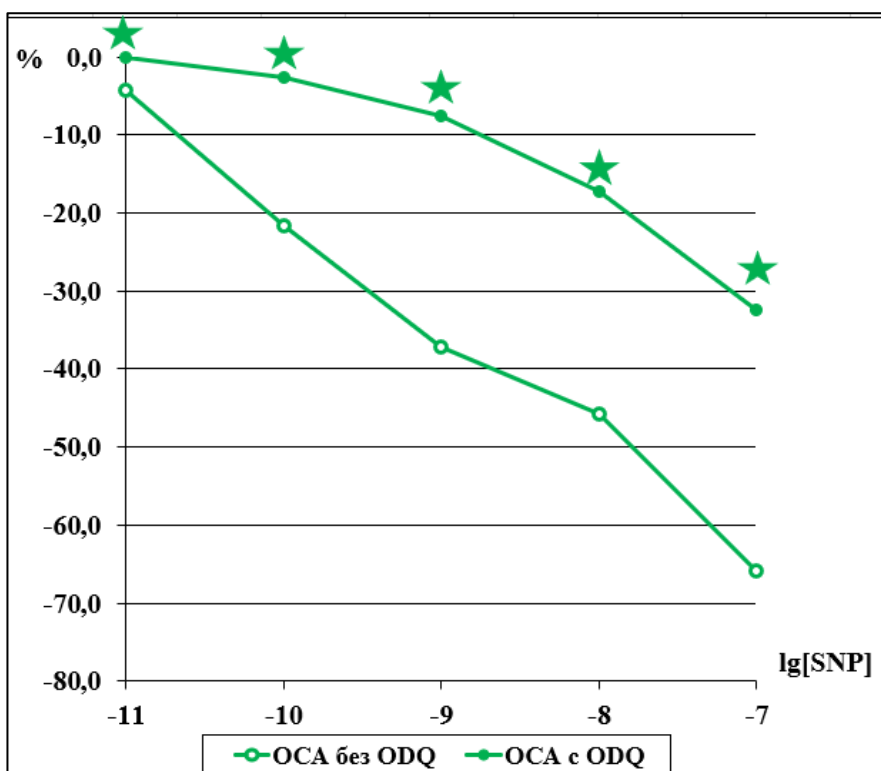
**Рис. 17.** Результаты физиологического эксперимента в группах интактного контроля (ИК), перевязки общей сонной артерии (ОСА) и удаления каротидных телец (УКТ) без блокаторов.

В ходе статистического анализа выяснено, что в группе интактного контроля при предъявлении блокатора растворимой гуанилатциклазы ODQ значительно подавлялось расслабление только лишь при высоких концентрациях донора оксида азота SNP ( $10^{-8}$  и  $10^{-7}$  М) по сравнению с опытом без блокатора (рис. 18).



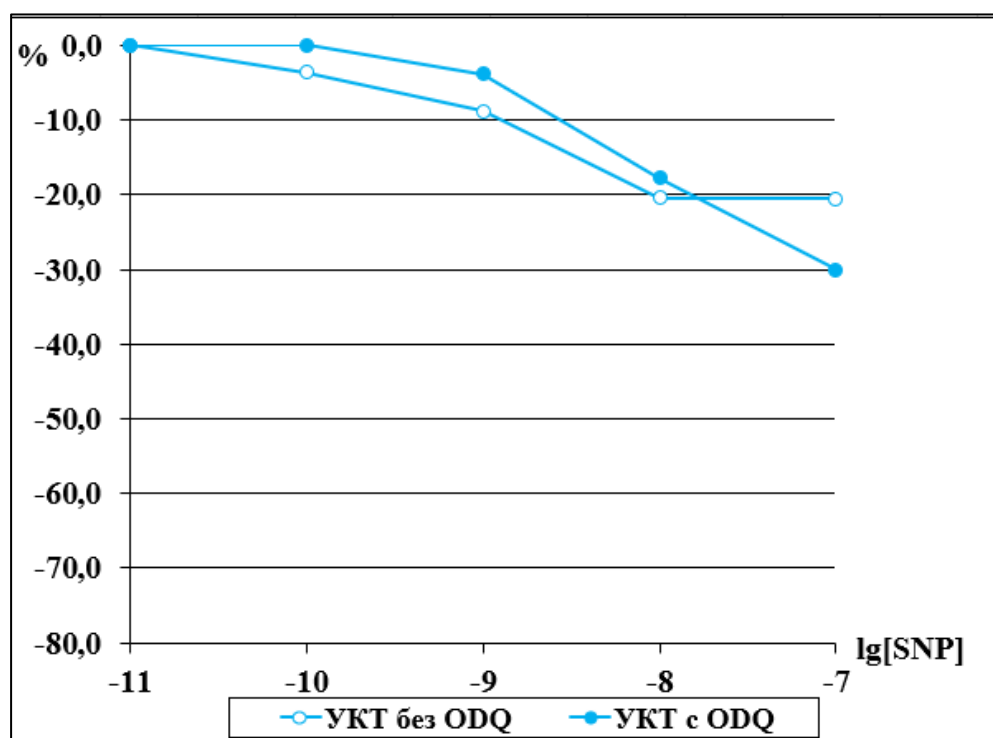
**Рис. 18.** Результаты физиологического эксперимента в группе интактного контроля (ИК) с блокатором ODQ

При этом в группе с перевязкой общей сонной артерии значимое подавление расслабления наблюдалось на всем диапазоне исследуемых концентраций SNP (рис. 19).



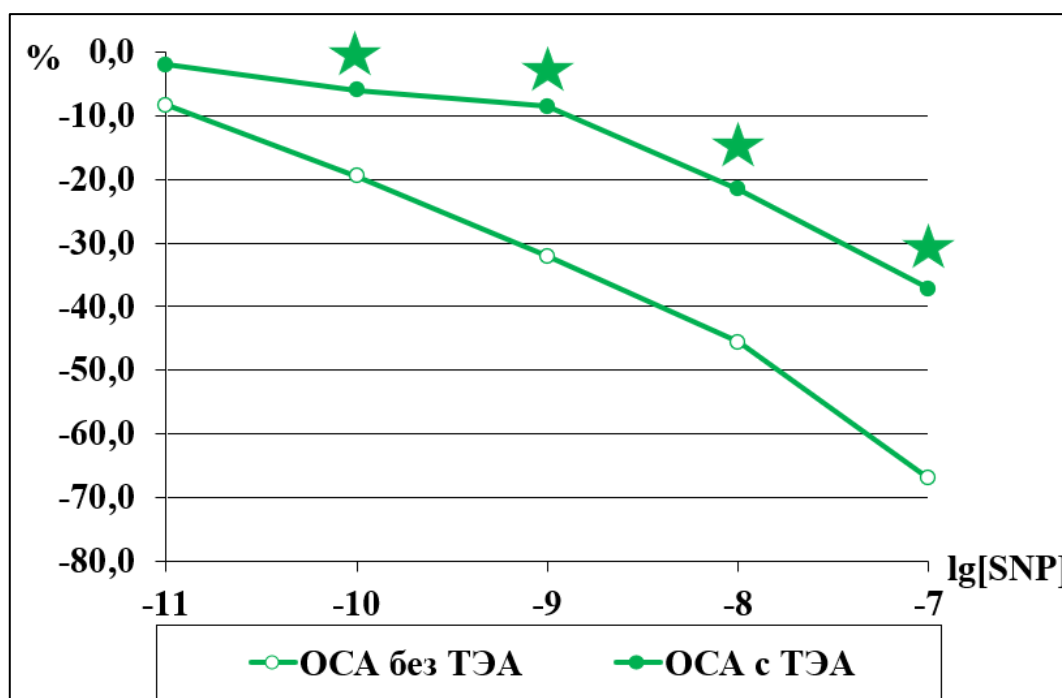
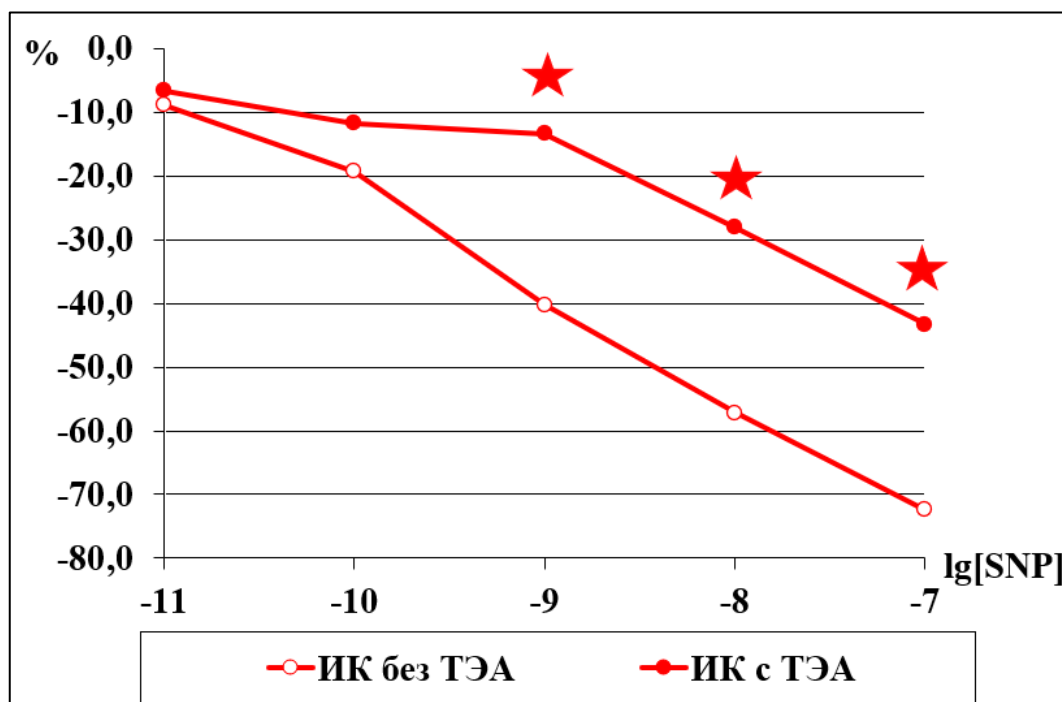
**Рис. 19.** Результаты физиологического эксперимента в группе с перевязкой общей сонной артерии (OCA) с блокатором ODQ

В группе с удалением каротидных телец значимых различий на всех концентрациях нитропрусида обнаружено не было (рис. 20).



**Рис. 20.** Результаты физиологического эксперимента в группе с удалением каротидных телец (УКТ) с блокатором ODQ

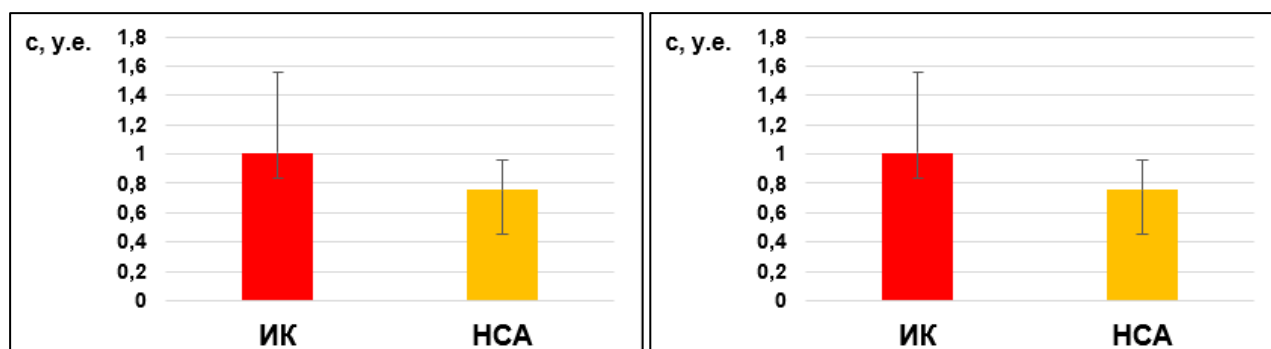
В группе интактного контроля блокатор потенциалзависимых калиевых каналов тетраэтиламмоний значительно подавлял расслабление в ответ на введение SNP при концентрациях от  $10^{-9}$  до  $10^{-7}$  М. В группе с перевязкой общей сонной артерии значимое подавление расслабления наблюдалось в более широком диапазоне концентраций SNP: от  $10^{-10}$  до  $10^{-7}$  М (рис. 21, 22).



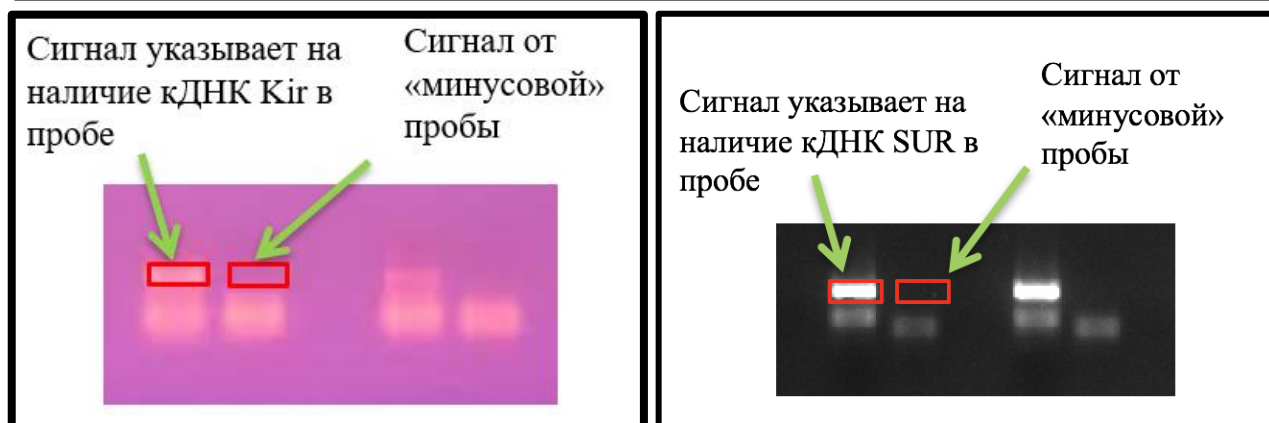
**Рис. 21, 22.** Результаты физиологического эксперимента с блокатором калиевых потенциалзависимых каналов ТЭА. (ИК – интактный контроль, ОСА – группа с перевязкой общей сонной артерии)

### 3.3. Результаты ОТ-ПЦР

В дополнение к физиологическим оценкам изменения профиля NO-зависимого расслабления, было проведено исследование экспрессии калиевых АТФ-зависимых каналов в ткани легочных артерий малого диаметра. По результатам проведенного ПЦР показано, что медиана относительного содержания кДНК SUR2B в пробах легочных артерий интактных крыс (с) составляет 1,2 у.е. (нижний квартиль – 0,9 у.е., верхний квартиль – 1,5 у.е.), а в пробах крыс с перевязкой наружной сонной артерии – 1,0 у.е. (0,8 у.е., 1,1 у.е.). Медиана относительного содержания кДНК  $K_{ir}$  6.1 в пробах легочных артерий интактных крыс (с) составляет 1,0 у.е. (нижний квартиль – 0,8 у.е., верхний квартиль – 1,5 у.е.), а в пробах крыс с перевязкой наружной сонной артерии – 0,7 у.е. (0,5 у.е., 1,1 у.е.). Значимых различий между данными группами обнаружено не было ( $p = 0,09$  и  $0,08$ ), однако все же наблюдается некоторая тенденция к снижению экспрессии калиевых АТФ-чувствительных каналов (рис. 23, 24).



**Рис. 23.** Относительное содержание мРНК  $K_{ir}$  (слева) и SUR (справа) у интактных крыс (ИК) и крыс с перевязкой наружной сонной артерии (НСА) в легочных артериях.



**Рис. 24.** Ампликоны кДНК  $K_{ir}$  (слева) и SUR (справа). При проведении электрофореза после ПЦР в соседние с образцами лунки помещали образцы, в которые не добавляли ревертазу

### 3.4. Результаты ретроспективного исследования пациентов

Для оценки значения односторонней ишемии каротидных телец для развития легочной гипертензии у людей было проведено ретроспективное исследование. По результатам исследования историй болезни было выделено две группы пациентов. Первая имела гемодинамически значимую бляшку в области бифуркации общей сонной артерии хотя бы с одной стороны, вторая имела гемодинамически незначимые бляшки в области бифуркации общей сонной артерии с одной либо с обеих сторон. Гемодинамически значимой считалась бляшка, перекрывающая более 75% просвета сосуда. Гемодинамически незначимой считалась бляшка, перекрывающая менее 45% просвета сосуда. Таким образом, к первой группе было отнесено 36 пациентов (из 60), а ко второй – 24.

Среди исследованных пациентов 39 (68,4%) было мужского пола (в первой группе 26, во второй – 13), 21 (31,6%) – женского (первая группа – 10, вторая – 11). Возраст пациентов в первой группе составил от 57 до 85 лет, средний возраст – 68,4 лет ( $\pm 8,8$  лет). Возраст пациентов во второй группе составил от 37 лет до 81 года, средний возраст – 58,7 лет ( $\pm 13,0$  лет). Данные приведены в таблице 2:

Табл. 2. Половозрастная структура исследованных пациентов.

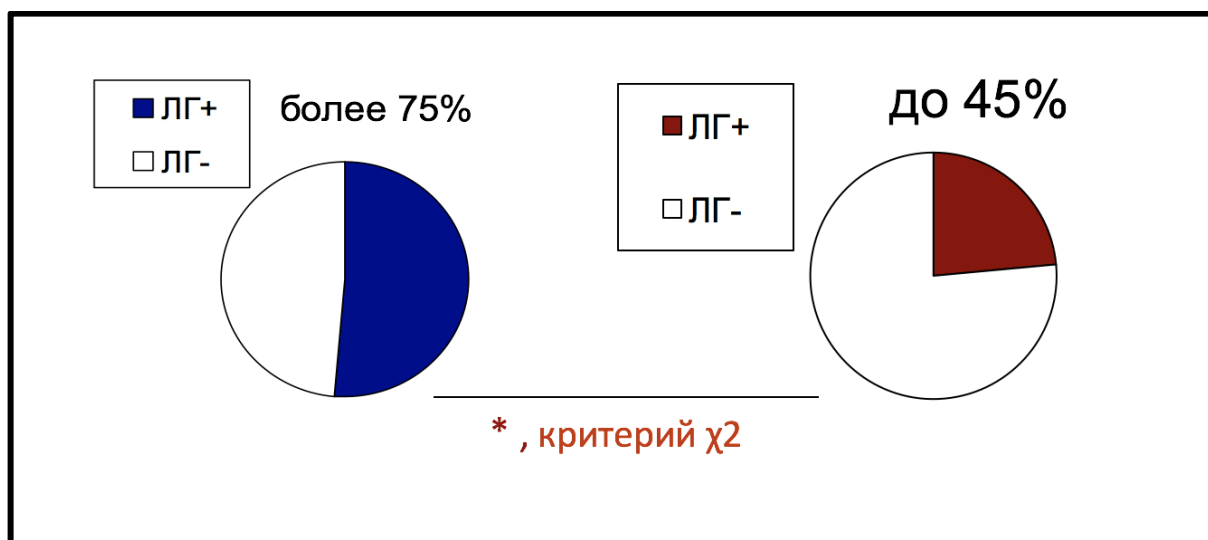
№ группы	Разделение пациентов по полу		Средний возраст пациентов (лет)
	М	Ж	
1	26	10	68,4 $\pm$ 8,8
2	13	11	58,7 $\pm$ 13,0
<b>Итого</b>	39	21	64,5 $\pm$ 11,2

Среди пациентов из первой группы (с наличием как минимум одной гемодинамически значимой бляшки) 52,8% пациентов (19 человек из 36) имели признаки легочной гипертензии (повышение среднего давления в легочной артерии  $> 25$  мм рт. ст., дилатация правого желудочка, недостаточность трикуспидального клапана). При этом гемодинамически значимая бляшка с одной стороны была у 26 пациентов (72,2%), а признаки легочной гипертензии



наблюдались у 14 (53,8%) пациентов с односторонним поражением. Гемодинамически значимые атеромы с обеих сторон наблюдались у 10 пациентов (27,8%), при этом признаки ЛГ были выявлены у 5 пациентов (50,0%). Статистических различий частотных характеристик встречаемости признаков ЛГ между пациентами со значимым односторонним и двусторонним стенозом отмечено не было.

Среди пациентов из второй группы лишь 16,7% пациентов (4 из 24) имеют признаки легочной гипертензии. Разница по частоте встречаемости ЛГ между двумя выделенными группами (с гемодинамически значимой бляшкой и без) оказалась статистически значимой  $p = 0,005$  (тест  $\chi^2$ ) (рис. 25).



**Рис. 25.** Частота встречаемости признаков легочной гипертензии у пациентов с гемодинамически значимой бляшкой (слева) и без таковой (справа).

По числу эритроцитов (сравнение проводилось для исключения состояния хронической гипоксии) у сравниваемых групп статистических различий найдено не было.

По числу тромбоцитов (сравнение проводилось для исключения состояния повышенного риска тромбообразования вследствие тромбоцитоза) у сравниваемых групп различий также найдено не было.

По скорости оседания эритроцитов никаких статистических различий также обнаружено не было. Все значения с указанием значимости получившихся различий указаны в таблице 3:

**Табл. 3.** Некоторые показатели общего анализа крови у исследуемых пациентов.

<b>Показатель</b>	<b>Группа 1</b>	<b>Группа 2</b>	<b>Уровень значимости (p), t-тест</b>
<b>Эритроциты, 10<sup>12</sup>/л</b>	4,6 ± 0,6	4,8 ± 0,4	p = 0,052
<b>Тромбоциты, 10<sup>9</sup>/л</b>	233,4 ± 69,9	239,8 ± 87,0	p = 0,364
<b>Скорость оседания эритроцитов, мм/ч</b>	15,83 ± 12,36	12,75 ± 10,06	p = 0,20

По результатам исследования липидного спектра и уровня глюкозы (сравнения проводились для оценки атерогенного статуса организма) значимых различий между двумя группами обнаружено не было.

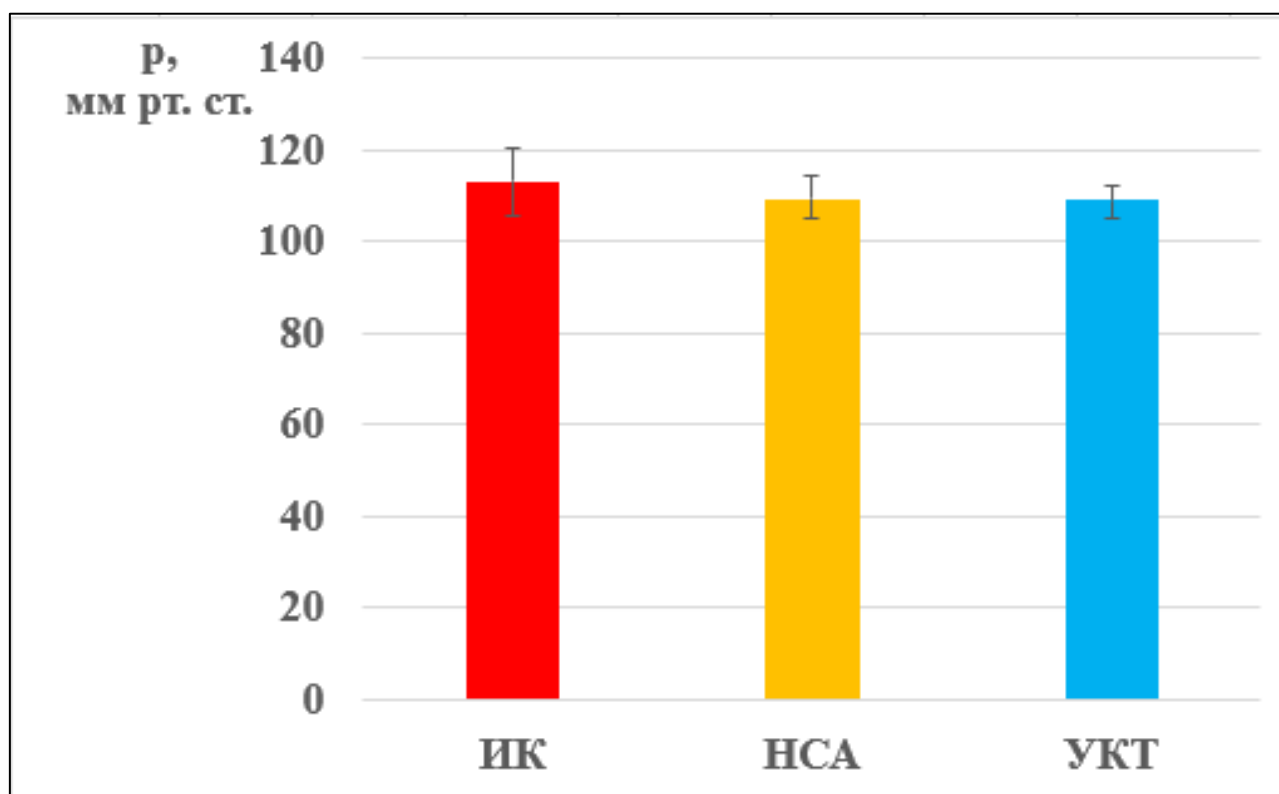
Среди пациентов с гемодинамически значимой бляшкой сахарный диабет встречался в 25% случаев, у пациентов с гемодинамически незначимой бляшкой – в 21% случаев. После исключения данных пациентов из выборки не было выявлено значимых различий в уровне глюкозы. Все значения с указанием значимости получившихся различий указаны в таблице 4:

**Табл. 4.** Некоторые показатели биохимического анализа крови у исследуемых пациентов.

<b>Показатель</b>	<b>Группа 1</b>	<b>Группа 2</b>	<b>Уровень значимости (p)</b>
<b>Общий холестерин (ммоль/л)</b>	4,3 ± 0,9	4,9 ± 1,1	p = 0,075 (t-тест)
<b>Липопротеиды низкой плотности (ммоль/л)</b>	2,8 ± 1,0	3,1 ± 1,2	p = 0,270 (t-тест)
<b>Липопротеиды высокой плотности (ммоль/л)</b>	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,4	p = 0,329 (t-тест)
<b>Глюкоза (ммоль/л)</b>	5,5 (5,2; 5,9)	5,2 (5,0; 6,3)	p = 0,368 (M-U тест)

### 3.5. Результаты измерений гемодинамических параметров

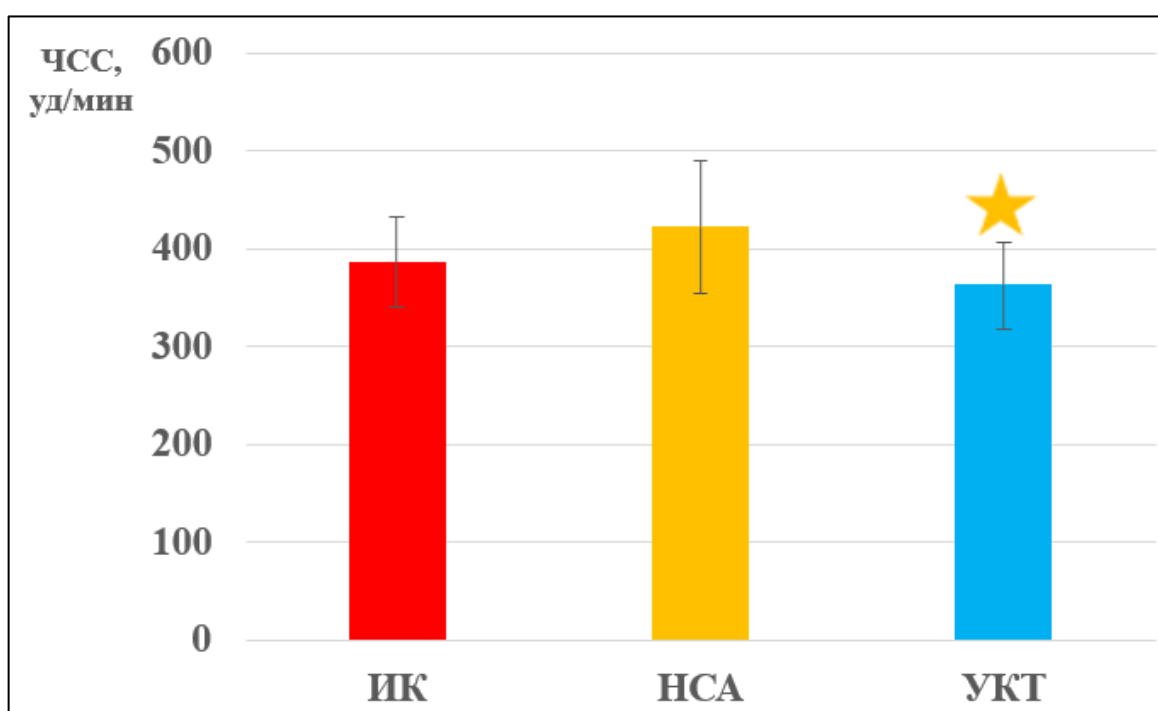
Для оценки системных проявлений односторонней ишемизации и одностороннего удаления каротидных телец были проведены измерения среднего артериального давления, ЧСС и показателей барорефлекса. Медиана среднего артериального давления ( $СрАД = (2*ДАД + САД)/3$ ) у интактных крыс составила 113,2 мм рт. ст. (нижний квартиль – 105,6 мм рт. ст., верхний квартиль – 120,2 мм рт. ст.), у оперированных с перевязанной наружной сонной артерией – 109,4 мм рт. ст. (нижний квартиль – 105,1 мм рт. ст., верхний квартиль – 114,4 мм рт. ст.), у крыс с удаленными каротидными тельцами – 109,1 мм рт. ст. (нижний квартиль – 104,9 мм рт. ст., верхний квартиль – 112,2 мм рт. ст.). Значимых отличий между данными группами обнаружено не было, хотя имеется некоторая тенденция к снижению СрАД у обеих групп оперированных крыс (рис. 26).



**Рис. 26.** Исходное среднее артериальное давление у интактных крыс (ИК), крыс с перевязкой наружной сонной артерии (НСА) и крыс с удаленными каротидными тельцами (УКТ).

Величина ЧСС, согласно анализу Колмогорова-Смирнова, оказалась нормально распределенной ( $p > 0,75$  для всех групп). Среднее значение ЧСС у

интактных крыс составило  $386,1/\text{мин} \pm 45,7/\text{мин}$ , у крыс с перевязкой наружной сонной артерии –  $421,0/\text{мин} \pm 67,6/\text{мин}$ , в группе с удаленными каротидными тельцами –  $361,9/\text{мин} \pm 44,2/\text{мин}$ . Значимых отличий по ЧСС между интактным контролем и оперированными группами также обнаружено не было, хотя имеется некоторая тенденция к повышению ЧСС в группе с перевязкой наружной сонной артерии и тенденция к понижению ЧСС в группе с удаленными каротидными тельцами. Кроме того, имеет место статистически значимая разница между группой с перевязкой наружной сонной артерии и группой с удалением каротидных телец (рис. 27).

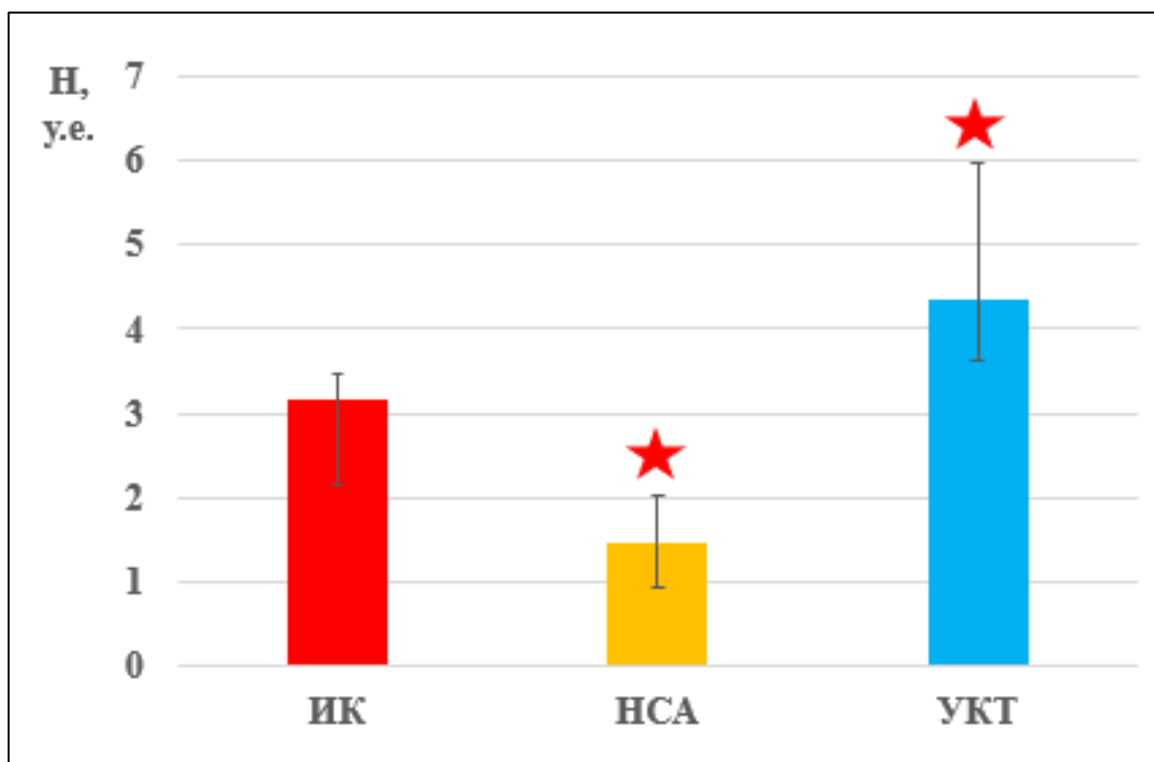


**Рис. 27.** Исходная частота сердечных сокращений у интактных крыс (ИК), крыс с перевязкой наружной сонной артерии (НСА) и крыс с удаленными каротидными тельцами (УКТ).

Отсутствие существенных отличий в СрАД и ЧСС говорит о том, что гемодинамические параметры большого круга кровообращения у оперированных крыс практически не изменяются по сравнению с контролем.

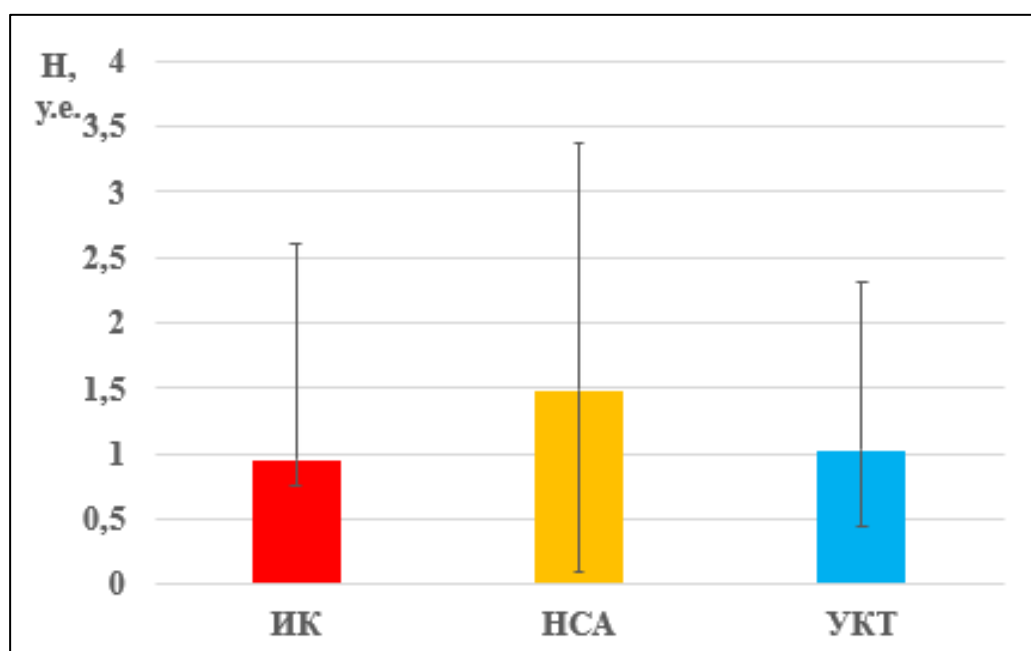
После введения донора оксида азота нитропрусида натрия среднее артериальное давление в группе интактных крыс упало в среднем на 13,45%, а ЧСС возросла на 12,4%. Медиана чувствительности барорефлекса Н по SNP в

этой группе составила 3,16 (нижний квартиль – 2,15, верхний квартиль – 3,47). В группе с перевязкой наружной сонной артерии давление упало в среднем на 21,45%, а ЧСС возросла на 9,61%. Медиана чувствительности барорефлекса Н по SNP в этом случае составила 1,45 (нижний квартиль – 0,94, верхний квартиль – 2,03). Разница в чувствительности барорефлекса по SNP в этих двух группах оказалась значимой ( $p < 0,05$ ), то есть ответ в виде изменения ЧСС в результате падения давления в интактной группе был более выражен, чем в группе с перевязкой наружной сонной артерии. В группе с удалением каротидных телец среднее артериальное давление упало в среднем на 14,14%, а ЧСС выросло в среднем на 19,20%. Медиана чувствительности барорефлекса Н по SNP в этом случае составила 1,03 (нижний квартиль – 0,44, верхний квартиль – 2,32). Разница в чувствительности барорефлекса между этой группой и группой интактного контроля оказалась значимой ( $p < 0,05$ ), то есть ответ в виде изменения ЧСС в результате падения давления в интактной группе был менее выражен, чем в группе с удалением каротидных телец (рис. 28).



**Рис. 28.** Чувствительность барорефлекса на нитропруссид натрия у интактных крыс, крыс с перевязкой наружной сонной артерии (НСА) и крыс с удалением каротидных телец (УКТ).

После введения  $\alpha_1$ -адреномиметика фенилэфрина среднее артериальное давление в группе интактных крыс возросло в среднем на 19,41%, а ЧСС упала на 7,20%. Медиана чувствительности барорефлекса Н по фенилэфрину в этой группе составила 0,95 (нижний квартиль – 0,75, верхний квартиль – 2,60). В группе с перевязкой наружной сонной артерии давление возросло в среднем на 13,36%, а ЧСС упала на 4,77%. Медиана чувствительности барорефлекса Н по фенилэфрину в данной группе составила 1,48 (нижний квартиль – 0,1, верхний квартиль – 3,38). Разница в чувствительности барорефлекса по фенилэфрину в представленных группах оказалась незначимой, то есть ответ в виде изменения ЧСС в результате роста давления одинаков в интактной и оперированной группах. В группе с удалением каротидных телец среднее артериальное давление после введения фенилэфрина в среднем возросло на 32,85%, а ЧСС упала на 13,07%. Медиана чувствительности барорефлекса по фенилэфрину в данной группе составила 1,03 (нижний квартиль – 0,44, верхний квартиль – 2,32. Разница в чувствительности барорефлекса по фенилэфрину между группой с удалением каротидных телец и контрольной группой оказалась незначимой, то есть ответ в виде изменения ЧСС в результате роста давления одинаков в интактной и оперированной группах (рис. 29).

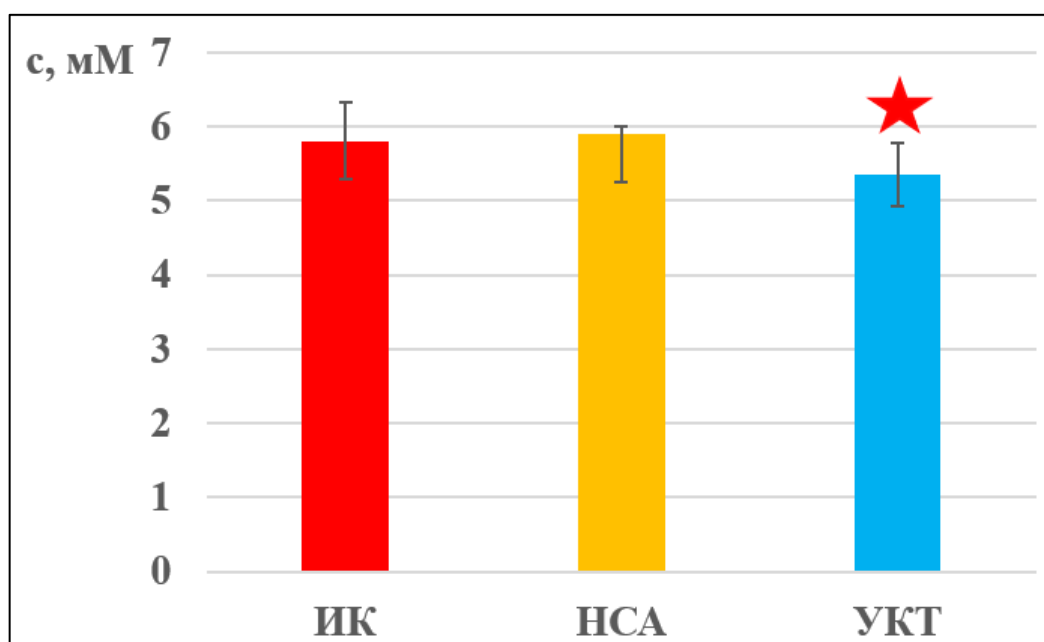


**Рис. 29.** Чувствительность барорефлекса на фенилэфрин у интактных крыс, крыс с перевязкой наружной сонной артерии (НСА) и крыс с удаленными каротидными тельцами (УКТ).

Таким образом, изменения чувствительности хронотропного барорефлекса были обнаружены только при увеличении ЧСС в ответ на навязанное снижение артериального давления.

### 3.6. Результаты измерений уровня глюкозы в плазме крови крыс

Еще один системный эффект, сопряженный с односторонним изменением активности каротидных телец, был связан с уровнем глюкозы. Медиана уровня глюкозы плазмы крови натощак у интактных крыс составила 5,8 ммоль/л (нижний квартиль – 5,3 ммоль/л, верхний квартиль – 6,3 ммоль/л), у крыс с перевязанной наружной сонной артерией – 5,9 ммоль/л (нижний квартиль – 5,3 ммоль/л, верхний квартиль – 6,0 ммоль/л), у крыс с удаленными каротидными тельцами – 5,4 ммоль/л (нижний квартиль – 4,9 ммоль/л, верхний квартиль – 5,8 ммоль/л). Между группой интактного контроля и группой с перевязкой наружной сонной артерии не обнаружено никаких статистических различий, однако обнаружены статистические различия между группой интактного контроля и группой с удаленными каротидными тельцами. То есть уровень глюкозы в группе с удаленными каротидными тельцами значимо ниже, чем в группе интактного контроля (см. рис. 30).



**Рис. 30.** Уровень глюкозы натощак в плазме крови интактных крыс (ИК), крыс с перевязкой наружной сонной артерии (НСА) и крыс с удаленными каротидными тельцами (УКТ).

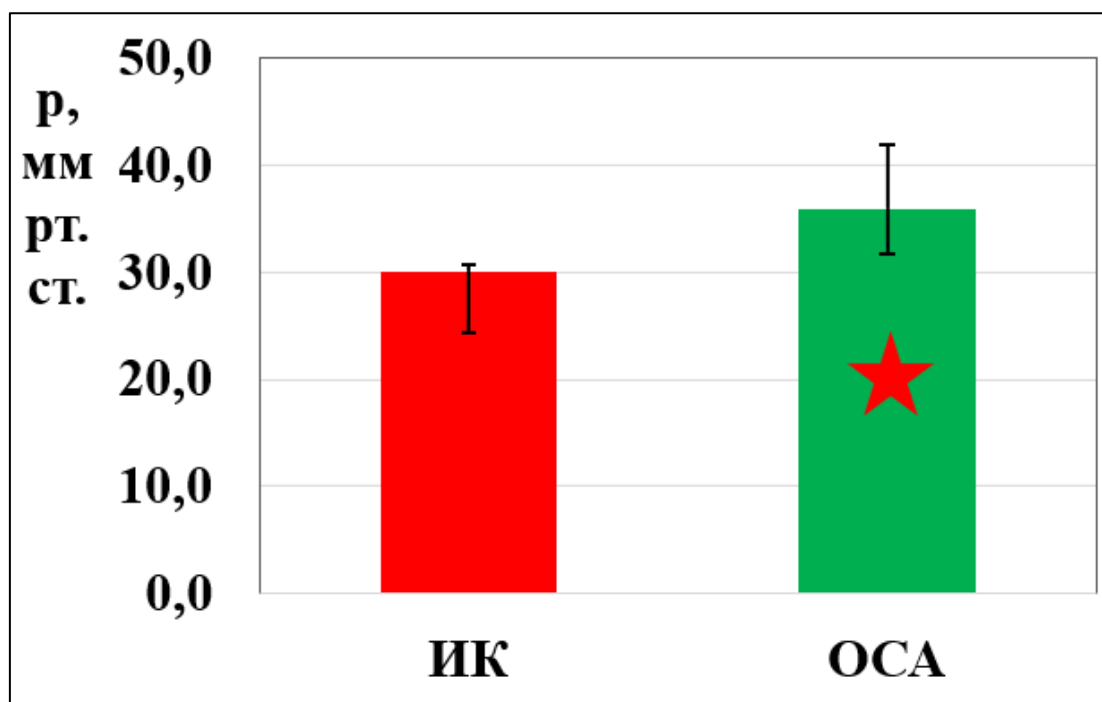
## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1. Обоснование выбранной модели ишемии каротидных тел

Для исследования такого инвалидизирующего заболевания, как легочная гипертензия, существует множество моделей. Во-первых, активно применяется монокроталиновая модель легочной гипертензии, основанная на том, что метаболит монокроталина, образующийся в печени, повреждает эндотелий сосудов (Van Albada et al., 2005). Введение больших доз монокроталина приводит к генерализованному воспалению во всех тканях организма, что быстро приводит к смерти. Однако в малых дозах введение монокроталина не вызывает существенного повреждения в большом круге кровообращения, но очень существенно влияет на малый круг. Генерализованное воспаление в легких приводит к склерозированию легочных артерий, что, в свою очередь, опосредует развитие легочной гипертензии. Второй, также часто используемой моделью, является гипоксическая модель легочной гипертензии (Давыдова, 2001; MacLean et al., 1998, Li et al., 1994, Tyler et al., 1999, Rui et al., 1991). Для этого крыс держат в условиях гипобарической гипоксии, что вызывает развитие легочной гипертензии по HIF-опосредованному механизму.

На кафедре физиологии и общей патологии ФФМ МГУ проводились исследования гиперкинетической модели легочной гипертензии на фоне врожденного порока сердца бледного типа (Davydova, 2020). Для этого делали операцию шунтирования между общей сонной артерией и наружной яремной веной. Ложной операцией к данной группе была группа с необратимой перевязкой наружной яремной вены и общей сонной артерии. По предположению данная группа не должна была никак отличаться от интактного контроля. Однако при изучении физиологии легочных артерий были выявлены существенные отличия от интактного контроля, при этом также было зафиксировано существенное повышение систолического артериального давления в правом желудочке (рис. 31), что заставляет обратить на группу с односторонней перевязкой сосудов шеи особое внимание.





**Рис. 31.** Сравнение систолического правожелудочкового давления между группой интактного контроля (ИК) и группой с перевязкой общей сонной артерии (ОСА).

При односторонней перевязке общей сонной артерии у крыс возможна ишемия нескольких зон.

Во-первых, в связи с тем, что бассейн общей сонной артерии отвечает за кровоснабжение практически всего переднего мозга, происходит снижение кровотока в головном мозге, что, однако, при односторонней перевязке не сильно выражено, поскольку у крыс хорошо развит Виллизиев круг. Особенно большое значение это играет в нашей модели, поскольку за месяц после операции происходит, очевидно, существенное перераспределение кровотока в пользу контрлатеральной общей сонной артерии и позвоночных артерий. Действительно, все крысы после перевязки общей сонной артерии не имели симптомов ни острого нарушения мозгового кровообращения, ни каких-либо симптомов недостаточности мозгового кровообращения в дальнейшем. Кроме того, вегетативные центры, расположенные в продолговатом мозгу, кровоснабжаются за счет бассейна позвоночной артерии, которая остается интактной.

Во-вторых, при перевязке общей сонной артерии страдают клетки каротидного синуса, который кровоснабжается преимущественно из бассейна внутренней сонной артерии.

В-третьих, возможным триггером изменений в легочных артериях может служить ишемия каротидных телец. Преимущественно клетки каротидных телец кровоснабжаются из бассейна наружной сонной артерии, поэтому существует возможность также достичь ишемии каротидных телец, перевязав наружную сонную артерию. Жизнеспособность каротидных телец при этом может поддерживаться анастомозами между внутренней и наружной сонной артерией.

Каротидные тельца содержат в себе рецепторы, реагирующие на парциальное давление кислорода в центральном кровотоке. При снижении парциального давления кислорода каротидные тельца активируются и по языкоглоточному нерву передают информацию в продолговатый мозг. При этом активируется симпатическая нервная система, возрастает частота сердечных сокращений и частота дыхания. Очевидно, что при хронической ишемии каротидных телец также происходят определенные изменения, связанные с изменением активности симпатической нервной системы. Нами показано, что достаточным является даже односторонняя ишемия каротидных телец.

Гистологические признаки легочной гипертензии (утолщение меди легочных артерий и увеличение числа слоёв гладких мышц) были найдены как в группе с перевязкой общей сонной артерии, так и в группе с перевязкой наружной сонной артерии. Таким образом, в обеих группах наблюдалась гипертрофия легочных артерий. При этом наблюдалось также увеличение количества слоев гладкомышечных клеток легочных артерий в обеих группах, что свидетельствует о гиперплазии гладкомышечных клеток.

В наших экспериментах мы показали, что именно ишемия каротидных телец, а не ишемия каротидного синуса и головного мозга влияет на развитие изменений в легочных артериях, поскольку при перевязке наружной сонной артерии в области расположения каротидных телец эффекты, полученные при

перевязке общей сонной артерии, которые наблюдались в гистологическом исследовании, сохранялись.

Все вышесказанное свидетельствует о нескольких важных выводах:

1) именно ишемия каротидных телец отвечает за развитие легочной гипертензии;

2) более «прицельная» операция (группа НСА) приводит к более выраженной легочной гипертензии (имеет место более значимое утолщение меди легочных артерий), что, вероятно, связано с местом перевязки (выше и ниже каротидных телец по ходу наружной сонной артерии). В случае перевязки только общей сонной артерии каротидные тельца все еще получают неполное, но достаточное кровоснабжение ввиду обширных анастомозов между наружной и внутренней сонной артериями (левыми и правыми). В случае же перевязки наружной сонной артерии кровоток к каротидным тельцам практически полностью прекращается;

3) в случае более «прицельной» операции не развивается нежелательных явлений, таких как ишемия головного мозга и ишемия каротидного синуса.

Стоит, однако, отметить, что несмотря на то, что более «прицельная» операция имеет неоспоримые преимущества, она имеет ряд недостатков:

1) перевязка наружной сонной артерии – технически гораздо более сложная процедура, поскольку зона бифуркации общей сонной артерии расположена недалеко от сонного канала, что затрудняет ее поиски. Кроме того, эта операция требует наложения как минимум трех лигатур (на месте отхождения наружной сонной артерии в зоне бифуркации, выше зоны каротидных телец, а также лигатуры на затылочную артерию, которая отходит от наружной сонной совсем недалеко от бифуркации);

2) перевязка наружной сонной артерии – гораздо более травмоопасная процедура, нежели перевязка общей сонной артерии, что связано с близким расположением большого количества других сосудов (в основном, вен), нервов, различных внутренних органов (барабанный пузырь, околоушная слюнная железа), мышц (грудинно-ключично-сосцевидная). Кроме того, велика

вероятность вызвать тромбообразование в бассейне общей сонной артерии, что дает серьезный риск тромбоэмболических осложнений в течение первых суток после операции, что наблюдалось у некоторых крыс (симптомы острого нарушения мозгового кровообращения). Поэтому во время операции обязательно производился контроль пульсации общей сонной артерии. В случае наличия большого тромба и при отсутствии пульсации общей сонной артерии крыса не включалась ни в одну из групп.

Таким образом, нельзя однозначно сказать, какая из представленных моделей лучше всего подходит для ишемизации каротидных телец. В случае уверенной работы оператора, вероятно, более предпочтительной является модель с перевязкой наружной сонной артерии. При желании избежать рисков следует прибегать к модели с перевязкой общей сонной артерии.

#### **4.2. Обоснование выбранной модели удаления каротидных телец**

Так как ишемия каротидных телец, очевидно, приводит к определенным последствиям, опосредованным симпатической нервной системой, интересным представлялось изучить последствия полного удаления каротидных телец в области одной из сонных артерий. С одной стороны, эта операция представляет собой в некотором роде контроль к перевязке общей или наружной сонной артерии (предполагается, что вместо активации симпатической нервной системы происходит полная инактивация этого рефлекторного поля, поскольку никаких сигналов с каротидных телец больше не поступает). С другой стороны, эта модель является обособленной интересной группой, требующей особого изучения.

К сожалению, в отличие от модели ишемии каротидных телец, невозможно разработать альтернативную операцию по «выключению» каротидных телец. Единственной возможной альтернативой представляется операция по денервации каротидных телец, однако в этом случае велика вероятность ошибочного пересечения нерва. Кроме того, в случае пересечения правильного нерва невозможно исключить того, что частично каротидные тельца могут

иннервироваться и другими нервами, что зависит от индивидуальных особенностей крысы. Вдобавок ко всему, весьма трудно оценить регенеративный потенциал нерва в данном случае.

Таким образом, единственно возможной (хотя весьма трудоемкой и травматичной) представляется именно такая операция, связанная с полным удалением каротидных телец.

### **4.3. Два пути NO-индуцированного расслабления легочных артерий**

Обычно рассматривается только один путь расслабления гладкомышечных клеток с помощью оксида азота. Связан он с действием оксида азота на растворимую гуанилатциклазу (Lucas et al., 2000). Похожим действием обладают натрийуретические пептиды, действующие на мембранную гуанилатциклазу. Активированная гуанилатциклаза переводит ГТФ в циклическую форму ГМФ (цГМФ), что вызывает активацию протеинкиназы G, что опосредует ряд клеточных процессов, среди которых инактивация инозитолтрифосфат (IP<sub>3</sub>) – зависимых каналов, которая приводит к снижению уровня кальция внутри клетки, а также активация натрий-кальциевого обменника и кальциевой АТФ-азы эндоплазматического ретикулума (SERCA), обеспечивающая выкачку ионов кальция из цитоплазмы клетки. Кроме того, под влиянием PKG обеспечивается активация фосфатазы легких цепей миозина и инактивация киназы легких цепей миозина. Быстрый ответ связан также и с активацией калиевых каналов, которые, пропуская калий, снижают мембранный потенциал клетки, из-за чего снижается ее возбудимость. Все вышеперечисленное является важными факторами релаксации гладких мышц сосудов. Стоит отметить, что данный путь сопряжен с существенной амплификацией сигнала. Однако есть работы, показывающие, что существует еще один путь расслабления гладких мышц сосудов. Этот путь связан с непосредственной активацией оксидом азота калиевых каналов (Bolotina et al., 1994; Yuan et al., 1996). При этом при исследовании большого круга, артерии которого чаще всего являются толстостенными (с большим количеством слоев

гладких мышц), значимость этого пути невелика (Davydova, 2020). В то же время результаты настоящей работы показывают, что в малом круге кровообращения, все артерии которого в норме являются тонкостенными, роль этого пути велика по сравнению с классическим. Сделать данный вывод можно на том основании, что блокатор растворимой гуанилатциклазы ODQ практически не подавляет NO-зависимое расслабление при малых концентрациях оксида азота. При повышении концентрации оксида азота роль данного пути возрастает. То есть роль рГЦ-зависимого пути возрастает при больших (нефизиологических) концентрациях оксида азота. Можно предположить, что для NO-индуцированного расслабления тонкой легочной артерии не нужна такая амплификация сигнала, как для большого круга, а достаточно простой диффузии оксида азота с действием непосредственно на калиевые каналы. Тот факт, что NO-зависимое расслабление, реализуемое через рГЦ, происходит преимущественно в большом круге кровообращения, а реализуемое непосредственно через калиевые каналы – в малом, заставляет задуматься о том, что в случае гипертрофии гладких мышц легочных артерий в NO-опосредованном расслаблении может возрасти роль рГЦ.

#### **4.4. Ишемия каротидных телец приводит к легочной гипертензии**

Как было сказано выше, обе модели ишемии каротидных телец на гистологическом уровне приводят к легочной гипертензии. При этом с учетом того, что у оперированных крыс не наблюдалось гипертрофии правого желудочка, речь идет об умеренной легочной гипертензии. На физиологическом уровне также видны изменения структуры NO-зависимого расслабления гладких мышц меди легочных артерий.

У интактных крыс блокатор растворимой гуанилатциклазы ODQ почти не подавляет NO-опосредованное расслабление гладких мышц при малых ( $10^{-11}$  –  $10^{-9}$  M) концентрациях SNP, таким образом, роль классического пути (через растворимую гуанилатциклазу) на малых концентрациях донора оксида азота невелика. При этом роль рГЦ-зависимого пути возрастает при больших ( $10^{-8}$  –

$10^{-7}$  М) концентрациях SNP. В опытах с неселективным блокатором потенциалзависимых калиевых каналов ТЭА, который в низких концентрациях блокирует в основном кальций-зависимые калиевые каналы, было показано, что при концентрации донора оксида азота  $10^{-9}$  М в интактном контроле наблюдается подавление NO-зависимого расслабления (при этом при введении ODQ – нет), что говорит о том, что при данной концентрации калиевые каналы регулируются непосредственно NO. В группе с перевязкой общей сонной артерии подавление NO-зависимого расслабления при перфузии  $10^{-9}$  SNP происходит как при введении ODQ, так и при введении ТЭА, что говорит о том, что в этой группе калиевые каналы регулируются опосредованно, через протеинкиназу G. При перфузии еще более низкой концентрации SNP ( $10^{-10}$  М) использование ODQ или ТЭА не приводит к подавлению NO-зависимого расслабления в группе интактного контроля, однако их эффект проявляется в группе с перевязкой общей сонной артерии. Это также свидетельствует о возрастании роли растворимой гуанилатциклазы в оперированной группе.

Калиевые кальций-зависимые каналы были оценены в физиологическом эксперименте, который показал снижение их прямой активации оксидом азота. Кроме того, ранее было показано, что малые концентрации SNP реализуют свое вазодилататорное действие через  $K_{ATP}$ -зависимые каналы (Davydova, 2020). В данной работе для оценки калиевых АТФ-чувствительных каналов, были проведены молекулярно-биологические эксперименты. Для этого была сделана ОТ-ПЦР на  $K_{ir6.1}$  и SUR2B-субъединицы АТФ-чувствительных калиевых каналов. По предварительным физиологическим экспериментам, проведенным на кафедре (не опубликовано), теряется роль блокатора АТФ-чувствительных калиевых каналов для вызванного SNP расслабления после ишемии каротидных телец, из чего можно было бы предположить снижение их экспрессии или изменение конформации. По результатам данного исследования было получено, что значимого снижения экспрессии  $K_{ir}$  и SUR не выявляется, однако имеется некоторая тенденция к снижению. Скорее всего, уменьшение функциональной активности калиевых каналов связано как с тем, что калиевых каналов

действительно становится меньше, чем в контрольной группе, так и с тем, что меняется их конформация под влиянием неких факторов, активирующихся с помощью симпатической нервной системы (например, при помощи фосфорилирования протеинкиназами, активирующимися при действии на гладкомышечную клетку симпатической нервной системы).

Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что в группе с односторонней ишемией каротидных телец развивается легочная гипертензия. Серьезных изменений в малом круге кровообращения в данной модели не происходит, что подтверждается отсутствием гипертрофии правого желудочка; клинически выраженная легочная гипертензия не развивается, как, например, в монокроталиновой модели. Однако имеет место умеренная легочная гипертензия, сопровождающаяся подъемом систолического правожелудочкового давления, утолщением меди легочных артерий и изменением структуры NO-опосредованного расслабления.

Интересные результаты получены в сравнении группы интактного контроля и группы с удалением каротидных телец. Во-первых, в группе с удалением каротидных телец наблюдается значительно меньшее расслабление по сравнению с группой интактного контроля. Во-вторых, гладкомышечные сосуды в группе с удалением каротидных телец теряют свою зависимость от растворимой гуанилатциклазы, что подтверждается опытами с ODQ (нет статистически значимых отличий между группой УКТ с введением ODQ и без введения на всех концентрациях SNP). Это может свидетельствовать о том, что в случае снижения активности симпатической нервной системы легочные артерии теряют свой базальный тонус, в связи с чем достаточно слабо расслабляются. В то же время, интересным представляется оценка влияния симпатической нервной системы на экспрессию рГЦ в гладкомышечных клетках легочных артерий, что на данный момент не изучено. Лишь в одной статье авторы указывают на то, что активация симпатической нервной системы сопряжена со снижением экспрессии растворимой гуанилатциклазы в клетках кавернозного тела. Однако, являются ли данные процессы физиологически



зависимыми, не указывается (Silva et al., 2014). Возможно, при удалении каротидных телец спустя месяц симпатическая нервная система все же активируется, что приводит к снижению роли растворимой гуанилатциклазы. Факт усиления активности симпатической нервной системы подтверждается результатами по барорефлексу в группе с удалением каротидных телец. Остается большим вопросом динамика активности симпатической нервной системы в период первого месяца после операции у крыс как с ишемией каротидных телец, так и с их удалением, что требует дальнейшего исследования.

Важно отметить, что наличие дублирующих структур для оценки уровня кислорода в артериальной крови – каротидные тельца правой наружной сонной артерии, аортальные тельца не способны отменить действие сигнала от ишемизированных каротидных телец одной сонной артерии. В качестве причин изменения функционального и морфологического состояния легочных артерий стоит отметить три возможных фактора, которые могут реализовываться при односторонней перевязке общей сонной артерии. Во-первых, при такой перевязке нарушается кровоснабжение головного мозга. При этом у крыс очень хорошо развит Виллизиев круг (анастомозы между системами общих сонных артерий и позвоночных артерий), поэтому недостаточность кровоснабжения по одной общей сонной артерии полностью компенсируется другой общей сонной, а также позвоночными артериями, которые преимущественно кровоснабжают вегетативные центры головного мозга. Во-вторых, при односторонней перевязке общей сонной артерии страдают клетки каротидного синуса, который кровоснабжается преимущественно из бассейна внутренней сонной артерии. В-третьих, возможным триггером изменений в легочных артериях может служить ишемия каротидных телец. Преимущественно клетки каротидных телец при этом кровоснабжаются из бассейна наружной сонной артерии, поэтому существует возможность также достичь ишемии каротидных телец, перевязав наружную сонную артерию. Жизнеспособность каротидных телец при этом поддерживается анастомозами между внутренней и наружной сонной артерией.

В наших экспериментах мы показали, что именно ишемия каротидных телец, а не ишемия каротидного синуса и головного мозга влияет на развитие изменений в легочных артериях, поскольку при перевязке наружной сонной артерии эффекты, полученные при перевязке общей сонной артерии, которые наблюдались в гистологическом исследовании, сохранялись.

С учетом того, что иннервация легочного русла у крыс и у человека различается (в частности, легочные артерии второго порядка у крыс непосредственно практически не иннервируются), можно предположить опосредованные местные влияния (как норадреналина, так и его комедиаторов) на состояние легочных артерий при выделении их из тех симпатических варикозов, которые иннервируют бронхиальные артерии, бронхи или *vasa vasorum*. С другой стороны, по данным Zussman иннервация легочных артерий у маленьких (неполовозрелых) крыс доходит до периферических артерий меньшего диаметра. В нашей модели операция проводилась также на неполовозрелых крысах 120-150 г. В связи с этим мы предполагаем, что эффекты, связанные с нашей операцией, опосредованы симпатической нервной системой на периферические внутрилегочные артерии. Даже если при взрослении происходит дегенерация периферических волокон СНС, мы предполагаем замыкание положительной обратной связи на уровне гладких мышц легочных артерий. Возможные пути замыкания положительной обратной связи, вовлекающие ННФ и кальцинейрин, изложены ниже.

С каротидных телец при их гипоксии запускаются реакции, связанные с активацией симпатической нервной системы. Эти реакции связаны с необходимостью для организма адаптироваться к состоянию общей гипоксии. При этом не имеет значения причина возникновения гипоксии. По данным литературы активность симпатической нервной системы при легочной гипертензии возрастает как у модельных животных, так и у людей. При этом показано, что вдыхание 100% кислорода у пациентов с легочной гипертензией снижает активность симпатической нервной системы, что может говорить о влиянии на данное состояние каротидных телец (Velez-Roa et al.). В связи с этим

возникает вопрос о хронических изменениях в работе симпатической нервной системы при перевязке одной наружной сонной артерии. Эти изменения могли иметь и системные проявления.

Действительно, физиологические опыты, связанные с оценкой барорефлекса, показали, что в ответ на введение SNP симпатическая система активируется значительно менее выражено, чем в контроле, что говорит о меньшей чувствительности барорефлекса у оперированных крыс, его симпатического компонента. При этом парасимпатический компонент остается интактным, поскольку изменений в ответе ЧСС на повышение артериального давления фенилэфрином выявлено не было. Возможно, наблюдаемые системные эффекты связаны с вторичными изменениями из-за хронической активации симпатической нервной системы, которые отражаются, в основном, на большом круге кровообращения. Возможно, что в целом происходит активация торможения эффектов симпатической нервной системы – например, за счет пресинаптических  $\alpha_2$ -адренорецепторов. Иными словами, в хроническом эксперименте наблюдается подавление симпатической нервной системы в большом круге кровообращения. При этом для малого круга может быть уже неважно, активна или нет симпатическая нервная система, поскольку в легочных артериях уже замкнулся механизм положительной обратной связи, который приводит к развитию легочной гипертензии.

Наши результаты по изменению чувствительности барорефлекса согласуются с данными полученными del Rio et al. Этой группой авторов было показано, что частые эпизоды гипоксии в течение месяца при моделировании сонного апноэ приводят к уменьшению чувствительности хронотропного барорефлекса в ответ на введение SNP. При этом последующая абляция каротидных телец восстанавливала чувствительность барорефлекса. Очень важно, что, как и в наших экспериментах, речь идет о хронической активации каротидных телец. Однако, в указанных опытах подвергались влиянию каротидные тельца в области бифуркации обеих сонных артерий (и гипоксии, и абляции). В нашем же исследовании речь идет об одностороннем влиянии на

каротидные тельца. Опираясь на данные del Rio et al. мы предполагаем, что и в нашем случае – при односторонней ишемизации каротидных телец – системные гемодинамические эффекты (изменения чувствительности барорефлекса) являются результатом именно активации каротидных телец на фоне выраженной гипоксии, которая является прямым следствием перевязки наружной сонной артерии, а не их возможной последующей инактивации из-за крайнего ограничения их кровоснабжения (Марков М.А., Давыдова М.П.).

Отсроченные эффекты, возможно, связаны с тем, что при активации симпатической нервной системы активируется HIF. При этом речь идет о негипоксическом пути активации данного фактора. Одним из веществ, способных вызвать активацию HIF, является цАМФ, важнейший эффектор пути от  $\beta$ -адренорецепторов. цАМФ приводит к активации протеинкиназы А, которая в свою очередь способна фосфорилировать HIF и приводить к его активации (Bullen et al., 2016; Simko et al., 2017). Другими важнейшими регуляторами HIF являются различные факторы роста (инсулин и инсулиноподобные факторы роста) (Bilton et al., 2003), а также его активность зависит от доступности некоторых биохимических субстратов (глюкозы и глутамина) (Zhdanov et al., 2015). Активация HIF при этом способна приводить к увеличению экспрессии HIF-зависимых белков, к которым относятся некоторые изоформы аденилатциклаз, что приводит к замыканию петли положительной обратной связи (Simonneau et al., 2004). При этом активация HIF снижает экспрессию потенциалзависимых калиевых каналов в мембране гладкомышечных клеток, увеличивает уровень факторов, способствующих пролиферативным изменениям в легочном русле (VEGF) (Compernelle et al., 2002). Также важно помнить об еще одном пути, который опосредуется активацией рецепторов, связанных с G-белками (в частности, с  $G_q$ -белком – связан с  $\alpha_1$ -адренорецепторами). Активация  $G_q$ -белка приводит к увеличению уровня внутриклеточного кальция, что в свою очередь приводит к активации кальцинейрина, который запускает кальцинейриновый путь (Bonnet et al., 2007). Данный путь также связан с формированием легочной гипертензии. В некоторых работах с

монокроталиновой моделью легочной гипертензии предлагается возможность блокировать этот путь через циклоспорин (ингибитор кальцинеина) с целью уменьшения гипертрофии меди легочных артерий. Вклад различных путей в развитие легочной гипертензии в модели с односторонней ишемией каротидных телец требует дальнейших исследований.

В группе же с удалением каротидных телец наблюдается противоположный эффект. Чувствительность парасимпатического компонента барорефлекса вновь остается неизменной по сравнению с интактным контролем, однако чувствительность симпатического компонента барорефлекса оказывается значительно выше, чем в группе интактного контроля и гораздо выше, чем в группе с перевязкой наружной сонной артерии, что говорит о том, что в хроническом эксперименте наблюдается большая, чем в норме чувствительность симпатической нервной системы к изменению давления в большом круге кровообращения.

Системные сдвиги активности симпатической нервной системы заметны и при оценке уровня глюкозы. Стоит отметить, что даже этот крайне зависимый от различных параметров показатель оказался существенно снижен в группе с удалением каротидных телец. В целом оцениваемые нами системные эффекты нервного и гуморального характера (частота сердечных сокращений, уровень глюкозы в плазме крови) говорят об уменьшении активности симпатической нервной системы при одностороннем удалении каротидных телец (хотя при этом увеличивается чувствительность эффекторного звена – сердца – к действию медиаторов симпатических нервных окончаний). С другой стороны, мы наблюдали некоторую тенденцию к увеличению уровня глюкозы в группе с ишемизацией каротидных телец, и это совпадает с нашим изначальным предположением об увеличении активности симпатической нервной системы в данной группе на основании результатов изменений гемодинамических параметров. На увеличение активности симпатической нервной системы в группе с ишемизацией каротидных телец указывает также и более высокий базовый уровень ЧСС (по сравнению с группой с удалением каротидных телец).

#### **4.5. Наличие бляшки в области бифуркации общей сонной артерии у пациентов может быть фактором риска развития легочной гипертензии**

Для того, чтобы оценить клиническую значимость полученных результатов, было проведено ретроспективное исследование историй болезни. В качестве клинического состояния, сходного с исследуемыми моделями, были выбраны пациенты с атеросклеротической бляшкой в области бифуркации общей сонной артерии. У таких пациентов нарушается кровоток в том числе и по наружной сонной артерии, что приводит к ишемии и гипоксии каротидных телец. Конечно, достичь отсутствия ишемии головного мозга, а также нормализовать метаболические параметры у таких пациентов практически невозможно, но проследить некоторые тенденции можно. По данным, полученным в ходе исследования, было выяснено, что пациенты, имеющие гемодинамически значимую бляшку в области бифуркации общей сонной артерии, чаще имеют признаки легочной гипертензии (например, увеличение среднего давления в легочной артерии - СДЛА), чем те, у которых в области бифуркации находится гемодинамически незначимая атеросклеротическая бляшка. Практически ни у кого из пациентов не было большого повышения СДЛА, что говорит о формировании у них умеренной легочной гипертензии, как и у крыс с перевязкой наружной сонной артерии (Марков и др., 2020).

Стоит отметить, что в нашей работе мы не нашли никаких различий в метаболическом статусе пациентов. Частота встречаемости сахарного диабета у пациентов с гемодинамически значимой бляшкой и без нее одинаковая. Уровень холестерина и холестерина ЛПНП, а также уровень глюкозы плазмы крови находятся в среднем в пределах референсных значений. Вероятно, на метаболический статус влияет множество других факторов, и факт наличия гемодинамически значимой бляшки в области бифуркации общей сонной артерии не является значимым.

В литературе на данный момент нет данных, раскрывающих механизмы формирования легочной гипертензии при активации симпатической нервной

системы, однако приведено достаточно данных о ее значимости при развитии данного заболевания. Кроме того, есть данные о краткосрочном влиянии каротидных телец на состояние легочных артерий. У крыс при введении цианида калия в каротидные тельца с одной стороны (то есть при краткосрочной односторонней тканевой гипоксии) транзиторно увеличивается легочное сосудистое сопротивление. Данный эффект снимается денервацией каротидных телец. Важно, что и в этой работе, и в настоящей имело дело не истинная гипоксия организма, а гипоксия только одной зоны, которую организм воспринимает как сенсор кислорода в крови (Sugito et al., 1998).

Можно предположить, что основной механизм реализации влияния каротидных телец на функциональные свойства легочных артерий – рефлекторный. По волокнам языкоглоточного (IX пара) нерва импульсы от ишемизированных каротидных телец поступают в продолговатый мозг, откуда посылаются импульсы по симпатическим нервам. Эти импульсы способны вызвать как краткосрочные, так и долговременные эффекты активации симпатической нервной системы. К краткосрочным можно отнести увеличение ЧСС, повышение АД и вазоспазм, которые могут наблюдаться также и в малом круге кровообращения. Вазоспазм способен вызвать повышение давления в легочной артерии, что наблюдалось в экспериментах с цианидом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было показано, что односторонняя ишемия каротидных телец приводит к развитию умеренной легочной гипертензии, что выражается в гипертрофии и гиперплазии клеток меди внутрилегочных артерий второго порядка. Кроме того, у данных крыс меняется профиль NO-зависимого расслабления, имеется тенденция к снижению экспрессии калиевых каналов. Тенденция к увеличению ЧСС и снижение активности симпатического компонента барорефлекса может говорить об усилении активности симпатической нервной системы, что может приводить к легочной гипертензии. У крыс с удаленными каротидными тельцами наблюдается противоположная картина.

Среди пациентов с гемодинамически значимой атеросклеротической бляшкой в области бифуркации общей сонной артерии чаще встречаются признаки легочной гипертензии, чем у пациентов без бляшки.



## ВЫВОДЫ

1. При долговременной ишемии области каротидных телец одной сонной артерии происходит увеличение толщины внутрилегочных артерий малого диаметра и увеличение числа слоев гладкомышечных клеток, что указывает на начальную стадию формирования легочной гипертензии.

2. При ишемии рецепторов области бифуркации общей сонной артерии наблюдается смещение путей NO-индуцированного расслабления легочных артерий от независимых от растворимой гуанилатциклазы к опосредуемым рГЦ.

3. У крыс с удалением каротидных телец наблюдается снижение эффективности NO-зависимого расслабления. При этом профиль NO-зависимого расслабления в противоположность группе с ишемией перестает зависеть от растворимой гуанилатциклазы.

4. У крыс с односторонней ишемией зоны каротидных телец наблюдается тенденция к снижению экспрессии субъединиц АТФ-чувствительных калиевых каналов.

5. У крыс с односторонней ишемией зоны каротидных телец снижается чувствительность хронотропного барорефлекса при введении донора оксида азота. У крыс с удалением каротидных телец увеличивается чувствительность хронотропного барорефлекса при введении донора оксида азота.

6. У пациентов с гемодинамически значимой атеросклеротической бляшкой в области бифуркации общей сонной артерии признаки легочной гипертензии встречаются чаще, чем у пациентов с гемодинамически незначимой бляшкой.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД – артериальное давление;
- АПФ – ангиотензин-превращающий фермент;
- АРЭ – антагонисты рецепторов к эндотелину;
- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота;
- БКК – блокаторы кальциевых каналов;
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
- ВОЗ – всероссийская организация здравоохранения;
- ГТФ – гуанозинтрифосфат;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
- ИФДЭ-5 – ингибитор фосфодиэстеразы V типа;
- кДНК – комплементарная ДНК
- ЛАГ – легочная артериальная гипертензия;
- ЛГ – легочная гипертензия;
- ЛПВП – липопротеины высокой плотности;
- ЛПНП – липопротеины низкой плотности;
- мРНК – матричная РНК;
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
- ОЦК – объем циркулирующей крови;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- рГЦ – растворимая гуанилатциклаза;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- СДЛА – среднее давление легочной артерии;
- СОЭ – скорость оседания эритроцитов;
- ТЭА – тетраэтиламмоний;
- УЗДГ – ультразвуковая доплерография;
- ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких;
- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат;
- цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат;

ЦНС – центральная нервная система;  
ЧСС – частота сердечных сокращений;  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;  
Эхо-КГ – эхокардиография;  
BMP – костный морфогенетический белок;  
BMP2 – рецептор 2 типа к костному морфогенетическому белку;  
DAG – диацилглицерол;  
DEPC – диэтилпирикарбонат;  
ET-1 – эндотелин-1;  
HIF – гипоксия-индуцированный фактор;  
5-HT – серотонин;  
5-HTT – переносчик серотонина;  
iNOS – индуцибельная NO-синтаза;  
IP<sub>3</sub> – инозитолтрифосфат;  
NADPH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат;  
NFAT – нуклеарный фактор активированных T-лимфоцитов;  
NO – оксид азота (II);  
NPY – нейропептид Y;  
NYHA – нью-йоркская ассоциация кардиологов;  
ODQ - 1H-[1,2,4]оксадиазоло[4,3-а]хиноксалин-1-он, блокатор рГЦ;  
PIP<sub>2</sub> – фосфатидилинозитол;  
PKG - протеинкиназа G;  
SERCA – кальциевая АТФ-аза саркоплазматического ретикулума;  
SNP – нитропруссид натрия;  
SUR – рецептор сульфонилмочевины;  
TASK – двупоровые калиевые каналы;  
TGFβ - трансформирующий фактор роста β;  
VEGF - фактор роста эндотелия сосудов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давыдова М.П., Постников А.Б., Дьяконов К.Б., и др. Участие тетрагидробиоптерина в локальном изменении эндотелийзависимого расслабления сосудов при легочной гипертензии. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89, №12. С.1516-1522.
2. Давыдова М.П. Сравнительное исследование реактивности сосудов малого и большого кругов кровообращения у крыс с легочной гипертензией. Дисс. ...кандидата биол. наук. / Москва, 2001. 110 с.
3. Марков М. А., Давыдова М. П. Односторонняя хроническая ишемия области каротидных телец изменяет активность симпатической нервной системы // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2022. Т. 108, № 1. С. 13–23.
4. Марков М.А., Давыдова М.П., Усачев Д.Ю., и др. Легочная гипертензия у больных с гемодинамически значимым атеросклеротическим поражением сонной артерии: новые патофизиологические механизмы заболевания. // Системные гипертензии. 2020. Т. 17, № 2. С. 61–64.
5. Клинические рекомендации по диагностике и лечению легочной гипертензии. Разработаны Министерством здравоохранения РФ. 2013.
6. Рекомендации ESC/ERS по диагностике и лечению легочной гипертензии 2015. // Российский кардиологический журнал. 2015. №5. С.5-64.
7. Синельников Р.Д., Синельников Я.Р. Атлас анатомии человека: Учеб. пособие. – 2 изд., стереотипное. В 4 томах. Т. 3. М.: Медицина. 1996. 232 с.: ил. (Учеб. лит. Для студ. мед. вузов). ISBN 5-225-02722-9.
8. Тарасова О.С. Пуринергический компонент симпатической регуляции системного артериального давления. Дисс. ...доктора биол. наук. / Москва, 2005. 225 с.
9. Чинкин А.С. Альфа-адренергические рецепторы сердца. // Эл.ж. КГИФК. 2006. N. 1. 30 с.

10. Abe K., Tilan J.U., Zukowska Z. NPY and NPY receptors in vascular remodeling. // *Curr Top Med Chem*. 2007. Vol. 7. P. 1704–1709.
11. Adnot S., Houssaini A., Abid S. et al. Serotonin transporter and serotonin receptors. // *Handb Exp Pharmacol*. 2013. Vol. 218. P. 365-380.
12. Akinaga J., García-Sáinz J.A., S. Pupo A. Updates in the function and regulation of  $\alpha_1$  -adrenoceptors. // *Br J Pharmacol*. 2019. Vol. 176. N. 14. P. 2343-2357.
13. Alphonse R.S., Vadivel A., Coltan L. Activation of Akt protects alveoli from neonatal oxygen-induced lung injury. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2011. Vol. 44, N 2. P.146-154.
14. Ball M.K., Waypa G.B., Mungai P. et al. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2014. Vol. 189, N 3. P.314-324.
15. Barton M., Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. // *Can J Physiol Pharmacol*. 2008. Vol. 86. N. 485–498.
16. Barton M., Yanagisawa M. Endothelin: 30 years from discovery to therapy. // *Hypertension*. 2019. Vol. 74. N. 6. P. 1232-1265.
17. Bilton R.L., Booker G.W. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF $\alpha$ ) regulation. // *Eur. J. Biochem*. 2003. Vol. 270, N 5. P.791-798.
18. Bleeke T., Zhang H., Madamanchi N. et al. Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. // *Circ Res*. 2004. Vol. 94. P. 37–45.
19. Bolotina V.M., Najibi, S., Palacino J.J., et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. // *Nature* 1994. N 368. P.850-853.
20. Bonnet S., Michelakis E.D., Porter C.J. et al. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1  $\alpha$ -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. // *Circulation*. 2006. Vol. 113, N 22. P.2630-2641.

21. Bonnet S., Rochefort G., Sutendra G. et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. // Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Vol. 104, N 27. P.11418-11423.
22. Bullen J.W., Tchernyshyov I., Holewinski R.J. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. // Sci. Signal. 2016. Vol. 9, N 430. P.45-69.
23. Chen S.L., Zhang F.F., Xu J. et al. Pulmonary artery denervation to treat pulmonary arterial hypertension: the single-center, prospective, first-in-man PADN-1 study (first-in-man pulmonary artery denervation for treatment of pulmonary artery hypertension). // J. Am. Coll. Cardiol. 2013. Vol. 62, N 12. P.1092-1100.
24. Chen S.L., Zhang H., Xie D.J. et al. Hemodynamic, functional, and clinical responses to pulmonary artery denervation in patients with pulmonary arterial hypertension of different causes: phase II results from the Pulmonary Artery Denervation-1 study. // Circ. Cardiovasc. Interv. 2015. Vol 8, N 11. P.28-37.
25. Chen S.L., Zhang H., Xie D.J. et al. Response to letter regarding article, "hemodynamic, functional, and clinical responses to pulmonary artery denervation in patients with pulmonary arterial hypertension of different causes: phase II results from the pulmonary artery denervation-1 study". // Circ. Cardiovasc. Interv. 2016. Vol. 9, N 1. P.34-63.
26. Chen S.L., Zhang Y.J., Zhou L. et al. Percutaneous pulmonary artery denervation completely abolishes experimental pulmonary arterial hypertension in vivo. // EuroIntervention. 2013. Vol. 9, N 2. P.269-276.
27. Cho S., Namgoong H., Kim H.J. et al. Downregulation of soluble guanylate cyclase and protein kinase G with upregulated ROCK2 in the pulmonary artery leads to thromboxane A2 sensitization in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. // Front Physiol. 2021. Vol. 12. A. 624967.
28. Crnkovic S., Egemnazarov B, Jain P. et al. NPY/Y<sub>1</sub> receptor-mediated vasoconstrictory and proliferative effects in pulmonary hypertension. // Br J Pharmacol. 2014. Vol. 171, N 16. P. 3895-3907.

29. Ciarka A., Doan V., Velez-Roa S. et al. Prognostic significance of sympathetic nervous system activation in pulmonary arterial hypertension. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010. Vol. 181, N 11. P.1269-1275.
30. Clapp L.H., Gurung R. The mechanistic basis of prostacyclin and its stable analogues in pulmonary arterial hypertension: Role of membrane versus nuclear receptors. // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015. Vol.120. P.56-71.
31. Compennolle V., Brusselmans K., Acker T. et al. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice // *Nat Med.* 2002. Vol. 8, N 7. P.702-710.
32. Dai H.L., Guo Y., Guang X.F. et al. The changes of serum angiotensin-converting enzyme 2 in patients with pulmonary arterial hypertension due to congenital heart disease. // *Cardiology.* 2013. Vol. 124 N. 4. P. 208–212.
33. Davydova M.P. Modeling of hypervolemia in pulmonary circulation in rats changes the structure of NO-mediated relaxation of pulmonary arteries. // *Bull Exp Biol Med.* 2020. Vol. 169. N. 3. P. 314-317.
34. de Campos F.P.F., Benvenuti L.A. Eisenmenger syndrome. // *Autops. Case Rep.* 2017. Vol. 7, N 1. P.5-7.
35. Dewachter L., Dewachter C., Naeije R. New therapies for pulmonary arterial hypertension: an update on current bench to bedside translation. // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2010. Vol. 19, N 4. P.469-488.
36. Dumitrascu R., Kulcke C., Konigshoff M. et al. Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. // *Eur Respir J.* 2011. Vol. 37. P. 1104-1118.
37. Eddahibi S., Adnot S. Anorexigen-induced pulmonary hypertension and the serotonin (5-HT) hypothesis: lessons for the future in pathogenesis. // *Respir Res.* 2002. Vol. 3. N. 1. P. 9-12.
38. Evans A.M., Osipenko O.N., Haworth S.G., Gurney A.M. Resting potentials and potassium currents during development of pulmonary artery smooth muscle cells // *Am. J. Physiol.* 1998. T. 275, № 9. C. H887-H899.

39. Evlakhov V. I., Poyasov I. Z. Adrenergic mechanisms of regulation of pulmonary microvessels tonicity and endothelial permeability. // *Angiol Sosud Khir.* 2019. Vol. 25. N. 3. P. 11-16.
40. Francois H., Athirakul K., Mao L. et al. Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. // *Hypertension.* 2004. Vol. 43. P. 364–369.
41. Frey R., Becker C., Saleh S. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Riociguat. // *Clin. Pharmacokinet.* 2017. Vol. 5, N 3. P.1242-1253.
42. Gabbay E., Yeow W., Playford D. Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an uncommon cause of pulmonary hypertension (PH) in an unselected population: the Armadale echocardiography study. // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2007. A713. P.12-25.
43. Galie` N., Manes A., Branzi A. Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. // *Am. J. Respir. Med.* 2003. Vol. 35, N 2. P.123-137.
44. Galiè N., Manes A. New treatment strategies for pulmonary arterial hypertension: hopes or hypes? // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013. Vol. 62, N 12. P.1101-1102.
45. Galiè N., Olschewski H., Oudiz R.J. et al. Ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy studies (ARIES) group. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebocontrolled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. // *Circulation.* 2008. Vol. 117. P. 3010–3019.
46. Galiè N., Rubin Lj., Hoeper M. et al. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. // *Lancet.* 2008. Vol. 371. P. 2093–2100
47. Galinier M., Rougé P., Fourcade J. et al. Lack of haemodynamic effects of nitric oxide on post-capillary pulmonary hypertension induced by acute sino-aortic denervation. // *Br. J. Pharmacol.* 1997. Vol. 120, N 1. P.7-12.



48. Gessler T. Inhalation of repurposed drugs to treat pulmonary hypertension. // *Adv Drug Deliv Rev.* 2018. Vol. 133. P. 34-44.
49. Guignabert C., Raffestin B., Benferhat R. et al. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. // *Circulation.* 2005. Vol. 111. P. 2812–2819.
50. Guilluy C., Eddahibi S., Agard C. et al. RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling. // *Am J Respir Crit Care Med.* 2009. Vol. 179. P. 1151–1158.
51. Gu Z.C., Zhang Y.J., Pan M.M. The safety of endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension: Protocol for a systemic review and network meta-analysis. // *Medicine (Baltimore).* 2018 Vol. 97, N 11. P.122-129.
52. Hoeper M.M., Galiè N. Letter by Hoeper and Galiè regarding article, "Hemodynamic, functional, and clinical responses to pulmonary artery denervation in patients with pulmonary arterial hypertension of different causes: phase II results from the Pulmonary Artery Denervation-1 Study". // *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2016. Vol. 9, N 1. P.24-32.
53. Hohler B., Holzapfel B., Kummer W. NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. // *Histochem Cell Biol.* 2000. Vol. 114. P. 29–37.
54. Honorato Pérez J. Selexipag, a selective prostacyclin receptor agonist in pulmonary arterial hypertension: a pharmacology review. // *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2017. Vol. 10. N. 7. P. 753-762.
55. Hynynen M.M., Khalil R.A. The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. // *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2006. Vol. 1. N. 1. P. 95-108.
56. Jähnichen S., Glusa E., Pertz H.H. Evidence for 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs. // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005. Vol. 371. N. 1. P. 89-98.

57. Jantschak F., Pertz H.H. Alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries. // *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2012. Vol. 385. N. 6. P. 595-603.
58. Jones D.A., Benjamin C.W., Linseman D.A. Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. // *Mol. Pharmacol.* 1995. Vol. 48. P.890-896.
59. Kadowitz P.J., Knight D.S., Hibbs R.G. et al. Influence of 5- and 6-hydroxydopamine on adrenergic transmission and nerve terminal morphology in the canine pulmonary vascular bed. // *Circ. Res.* 1976. Vol. 39, N 2. P.191-199.
60. Kedzierski R.M., Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001. Vol. 41. P.851–876.
61. Keegan A., Morecroft I., Smillie D. et al. Contribution of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension. // *Circ Res.* 2001. Vol. 89. P. 1231–1239.
62. Kelly L.E., Ohlsson A., Shah P.S. Sildenafil for pulmonary hypertension in neonates. // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017. N 8. CD005494.
63. Kumar P., Prabhakar N.R. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. // *Compr. Physiol.* 2012. Vol. 2, N 1. P.141-219.
64. Kummer W. Pulmonary vascular innervation and its role in responses to hypoxia: size matters! // *Proc Am Thorac Soc.* 2011. Vol. 8. N. 6. P. 471-476.
65. Langer S.Z., Shepperson N.B. Postjunctional alpha 1-adrenoceptors: preferential innervation of alpha 1-adrenoceptors and the role of neuronal uptake. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1982. Vol. 63, N. 4 Suppl. 1. P. 8-13.
66. Li H., Chen S.I., Chen Y.F. et al., Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. // *J Appl Physiol.*, 1994. Vol. 77. N. 3. P. 1451-1459.
67. Liu C., Jiang X.M., Zhang J. et al. Pulmonary artery denervation improves pulmonary arterial hypertension induced right ventricular dysfunction by modulating

the local renin-angiotensin-aldosterone system. // *BMC Cardiovasc. Disord.* 2016. Vol. 16, N 1. P.192.

68. Liu S.F., Barnes P.J. Neural control of pulmonary vascular tone. In: Crystal R.G., West J.B., Weibel E.R., Barnes P.J., editors. *The lung: scientific foundations*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers; 1997; 1457–1472.

69. Lucas K.A., Pitari G.M., Kazerounian S. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. // *Pharmacol. Rev.* 2000. Vol. 52, N 3. P.375-414.

70. Luo Q., Wang X., Liu R. et al. alpha1A-adrenoceptor is involved in norepinephrine-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells via CaMKII signaling. // *J Cell Biochem.* 2019. Vol. 120. N. 6. P. 9345-9355.

71. Maclean M.R., Dempsie Y. The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited. // *Adv Exp Med Biol.* 2010. Vol. 661. P. 309-322.

72. MacLean M.R., McCulloch K.M. Influence of applied tension and nitric oxide on responses to endothelins in rat pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia. // *Br. J. Pharmacol.* 1998. Vol.123, N 5. P.991-999.

73. Manuel D.A., Ghosh G.C., Alex A.G. Atrial septal defect with right-to-left shunt in the absence of pulmonary hypertension. // *Cardiol. Young.* 2017. Vol. 27, N 3. P.575-576.

74. Martins J., Elvas F., Brudzewsky D. et al. Activation of neuropeptide Y receptors modulates retinal ganglion cell physiology and exerts neuroprotective actions in vitro. // *ASN Neuro.* 2015. Vol. 7, N 4. P. 1-21.

75. McKenzie J.C., Klein R.M. The effect of neonatal guanethidine administration on hemodynamic and physical alterations in the adult rat pulmonary artery during the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. // *J Auton Nerv Syst.* 1984. N. 10. P. 199–203.

76. McLaren G.J., Kennedy C., Sneddon P. The effects of suramin on purinergic and noradrenergic neurotransmission in the rat isolated tail artery. // *Eur J Pharmacol.* 1995. Vol. 277. N.1 P. 57-61.

77. Mittal M., Roth M., Konig P. et al. Hypoxiaindependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. // *Circ Res*. 2007. Vol. 101. P. 258–267.
78. Mizuno K., Ueno Y. Autonomic nervous system and the liver. // *Hepatol Res*. 2017. Vol. 47. N. 2. P. 160-165.
79. Movafagh S., Hobson J.P., Spiegel S. et al. Neuropeptide Y induces migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells bimodally via Y1, Y2, and Y5 receptors. // *FASEB J*. 2006. Vol. 20. P. 1924–1926.
80. Mulryan K., Gitterman D.P., Lewis C.J. et al. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. // *Nature*. 2000. Vol. 403. N. 6765. P. 86-89.
81. Mulvaney E.P., Reid H.M., Bialesova L. et al. NTP42, a novel antagonist of the thromboxane receptor, attenuates experimentally induced pulmonary arterial hypertension. // *BMC Pulm Med*. 2020. Vol. 20. N. 1. A. 85.
82. Munglani R., Hudspith M.J., Hunt S.P. The therapeutic potential of neuropeptide Y. Analgesic, anxiolytic and antihypertensive. // *Drugs*. 1996. Vol. 52, N 3. P. 371-389.
83. Na S., Kim O.S., Ryoo S. et al. Cervical ganglion block attenuates the progression of pulmonary hypertension via nitric oxide and arginase pathways. // *Hypertension*. 2014. Vol. 63, N 2. P.309-315.
84. Oudiz R.J., Galiè N., Olschewski H. et al. ARIES Study Group. Long-term ambrisentan therapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension. // *J Am Coll Cardiol*. 2009. Vol. 54. P. 1971–1981.
85. Patel A.J., Honoré E. Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. // *Eur Respir J*. 2001. Vol. 18, N 1. P.221-227.
86. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. // *J. Clin. Invest*. 2012. Vol. 122, N 12. P.4306-4313.
87. Rabinovitch M. Rescuing the BMPR2 Pathway: How and Where Can We Intervene? // *Pulmonary Hypertension Association*. 2015. Vol. 18, N 7. P.124-127.

88. Rai N., Veeroju S., Schymura Y. Effect of Riociguat and Sildenafil on Right Heart Remodeling and Function in Pressure Overload Induced Model of Pulmonary Arterial Banding. // *Biomed. Res. Int.* 2018. Vol. 35, N 6. P.32-44.
89. Reesink H.J., Meijer R.C., Lutter R. et al. Hemodynamic and clinical correlates of endothelin-1 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. // *Circ. J.* 2006. Vol. 70, N 8. P.1058-1063.
90. Reichmann F., Holzer P. Neuropeptide Y: A stressful review. // *Neuropeptides.* 2016. Vol. 55. P. 99-109.
91. Respiratory-circulatory interactions in health and disease. Eds.: Scharf S.M., Pinsky M.R., Magder S. Marcel Dekker, Inc. 2001. 962 p.
92. Rodman D.M., Voelkel N.F. Regulation of vascular tone. In: Crystal R.G., West J.B., Weibel E.R., Barnes P.J., editors. *The lung: scientific foundations*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers; 1997; 1473–1492.
93. Rong W., Gourine A.V., Cockayne D.A. et al. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. // *J Neurosci.* 2003. Vol. 23 N. 36. P. 11315-11321.
94. Rothman A.M., Arnold N.D., Chang W. et al. Pulmonary artery denervation reduces pulmonary artery pressure and induces histological changes in an acute porcine model of pulmonary hypertension. // *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2015. Vol. 8, N 11. P.25-39.
95. Rui L., Cai Y. Effect of chronic hypoxia on endothelium-dependent relaxation and cGMP content in rat pulmonary artery. // *Chin Med Sci J.* 1991. Vol. 6. N. 3. P. 145-147.
96. Sampaio W.O., Souza dos Santos R.A., Faria-Silva R. et al. Angiotensin-(1-7) through receptor mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. // *Hypertension.* 2007. Vol. 49. N. 1. P.185–192.
97. Sandoval J. Interventional therapies in pulmonary hypertension. // *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2018. Vol. 12, N 3. P.36-37.

98. Savi P., Herbert J.M. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y<sub>12</sub> adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. // *Semin Thromb Hemost.* 2005. Vol. 31 N. 2. P. 174-183.
99. Schmelck P.H., Hanoune J. The hepatic adrenergic receptors. // *Mol Cell Biochem.* 1980. Vol. 33. N. 1. P. 35-48.
100. Shende P., Desai D. Physiological and therapeutic roles of neuropeptide Y on biological functions. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020. Vol. 12. P.37-47.
101. Silva A.P., Cavadas C., Grouzmann E. Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. // *Clin Chim Acta.* 2002. Vol. 326, N 1-2. P. 3-25.
102. Silva F.H., Lanaro C., Leiria L.O. Oxidative stress associated with middle aging leads to sympathetic hyperactivity and downregulation of soluble guanylyl cyclase in corpus cavernosum. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014. Vol. 307. N. 10. P. H1393-400.
103. Simko V., Iuliano F., Sevcikova A. et al. Hypoxia induces cancer-associated cAMP/PKA signalling through HIF-mediated transcriptional control of adenylyl cyclases VI and VII. // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, N 1. P.101-121.
104. Simonneau G., Galie` N., Rubin L.J. et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004. Vol.43, N 12 Suppl S. P.5S-12S.
105. Simonneau G., Torbicki A., Dorfmüller P., Kim N. The pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. // *Eur. Respir. Rev.* 2017. Vol. 26, N 143. P.30-37.
106. Sitbon O., Vonk Noordegraaf A. Epoprostenol and pulmonary arterial hypertension: 20 years of clinical experience. // *Eur Respir Rev.* 2017. Vol. 26 N. 143. A.160055.
107. Spyer K.M. To breathe or not to breathe? That is the question. // *Exp Physiol.* 2009. Vol. 94, N 1. P.1-10.

108. Sugito K., Tatsumi K., Igari H. et al. Role of carotid body in pressure response of pulmonary circulation in rats. // *Respir. Physiol.* 1998. Vol.111, N 3. P.283-293.
109. Sun X.Z., Li S.Y., Tian X.Y., Hong Z., Li J.X. Effect of Rho kinase inhibitor fasudil on the expression ET-1 and NO in rats with hypoxic pulmonary hypertension. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2018. Vol. 12, N 4. P.123-134.
110. Szidon J.P., Flint J.F. Significance of sympathetic innervation of pulmonary vessels in response to acute hypoxia. // *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1977. Vol. 43 N. 1. P. 65-71.
111. Tan C.M.J., Green P., Tapoulal N. et al. The role of neuropeptide Y in cardiovascular health and disease. // *Front Physiol.* 2018. Vol. 19, N 9. A. 1281. P. 1-13.
112. Thenappan T., Ormiston M.L., Ryan J.J. et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. // *BMJ.* 2018. Vol. 360. P. 5492.
113. Todorov L.D., Mihaylova-Todorova S.T., Bjur R.A., Westfall D.P. Differential cotransmission in sympathetic nerves: role of frequency of stimulation and prejunctional autoreceptors. // *J Pharmacol Exp Ther.* 1999. Vol. 290 N 1. P. 241-246.
114. Tyler R.C., Muramatsu M., Abman S.H., et al. Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension. // *Am J Physiol.* 1999. Vol. 276. N 2. P. L297-L303.
115. Vaillancourt M., Chia P., Sarji S. et al. Autonomic nervous system involvement in pulmonary arterial hypertension. // *Respir. Res.* 2017. Vol. 18, N 1. P.201-205.
116. Van Albada M.E., Schoemaker R.G., Kemna M.S. et al. The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension. // *Eur. Respir. J.* 2005. Vol. 26, N 3. P.487-493.
117. Velez-Roa S., Ciarka A., Najem B. et al. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. // *Circulation.* 2004. Vol. 110, N 10. P.1308-1312.

118. Verity M.A., Bevan J.A. Fine structural study of the terminal effector plexus, neuromuscular and intermuscular relationships in the pulmonary artery. // *J. Anat.* 1968. Vol. 103, N 6. P.49-63.
119. von Kügelgen I., Starke K. Noradrenaline-ATP co-transmission in the sympathetic nervous system. // *Trends Pharmacol Sci.* 1991. Vol. 12. N.9. P. 319-324.
120. Wang D., Youngson C., Wong V. et al. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K<sup>+</sup> channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93, N 23. P.13182-13187.
121. Wang J., Juhaszova M., Rubin L.J., Yuan X.J. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 100, N 9. P.2347-2353.
122. Weir E.K., Reeve H.L., Johnson G. et al. A role for potassium channels in smooth muscle cells and platelets in the etiology of primary pulmonary hypertension. // *Chest.* 1998. Vol. 114, N 3. P.200S-204S.
123. Wenger R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. // *FASEB J.* 2002. Vol. 16, N 10. P.1151-1162.
124. Wenzel D.G., Su J.L. Interactions of nicotine and tyramine with adrenergic blocking agents on ventricle strips. // *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1966. Vol. 162. N. 1. P. 180-185.
125. Wood P. Pulmonary hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor. // *Br. Heart. J.* 1958. Vol. 20, N 4. P.557-570.
126. Yamamura A. Molecular Mechanism of Dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> Channel Blockers in Pulmonary Hypertension. // *Yakugaku Zasshi.* 2016. Vol. 136, N 10. P.1373-1377.
127. Yokoshiki H., Masanori S., Takashi S., Sperelakis N. ATP-sensitive K<sub>1</sub>-channels in pancreatic, cardiac and vascular smooth muscle cells. // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 274, N 43. P.25-37.



128. Yuan X-J., Tod M.L., Rubin L.J., Blaustein M.P. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by activating voltage-gated  $\text{K}^+$  channels. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. N 93. P.10489-10494.
129. Zhdanov A.V., Waters A.H., Golubeva A.V., Papkovsky D.B. Differential contribution of key metabolic substrates and cellular oxygen in HIF signalling. // Exp. Cell Res. 2015. Vol. 330, N 1. P.13-28.
130. Zhang F., Chen A., Pan Y. et al. Research Progress on Pulmonary Arterial Hypertension and the Role of the Angiotensin Converting Enzyme 2-Angiotensin-(1-7)-Mas Axis in Pulmonary Arterial Hypertension. // Cardiovasc Drugs Ther. 2021. Vol. 4. P. 1-8.
131. Zhang F., Tang H., Sun S. et al. Angiotensin-(1-7) induced vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. // Nitric Oxide. 2019. Vol. 88 P. 1–9.
132. Zhang H., Chalothorn D., Jackson L.F. et al. Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle. // Circ Res. 2004. Vol. 95. P. 989–997.
133. Zhou L., Zhang J., Jiang X.M. et al. Pulmonary artery denervation attenuates pulmonary arterial remodeling in dogs with pulmonary arterial hypertension induced by dehydrogenized monocrotaline. // JACC Cardiovasc Interv. 2015. Vol. 8, N 15. P. 2013-2023.
134. Zussman W. Fluorescent localization of catecholamine stores in the rat lung. // Anat Rec. 1966. Vol. 156. N. 3. P. 19-29.

**Приложение 1. Состав растворов для проводки образцов легкого**

<b>№ р-ра</b>	<b>Характеристики раствора</b>	<b>Время экспозиции</b>
1	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 70%, 25°C	1 ч
2	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 96%, 25°C	1 ч
3	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 100%, 25°C	1 ч
4	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 100%, 25°C	1 ч
5	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)/Хлороформ (CHCl <sub>3</sub> ) = 1:1, 25°C	1 ч
6	Хлороформ (CHCl <sub>3</sub> ), 25°C	1 ч
7	Хлороформ (CHCl <sub>3</sub> )/парафин = 1:1, 60°C	3 ч
8	Парафин, 60°C	12 ч

**Приложение 2. Состав растворов для депарафинизации и обратной  
проводки образцов**

<b>№ р-ра</b>	<b>Характеристики раствора</b>	<b>Время экспозиции</b>
1	О-ксилол, 25°C	3 мин
2	О-ксилол, 25°C	1 мин
3	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 100%, 25°C	1 мин
4	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 96%, 25°C	1 мин
5	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 96%, 25°C	1 мин
6	Этанол (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 50%, 25°C	1 мин
7	Дистиллированная вода, 25°C	1 мин

**Приложение 3. Состав растворов для регистрации давления  
изолированных сосудов**

<b>№</b>	<b>Без блокаторов</b>	<b>Опыт с ODQ</b>	<b>Опыт с ТЭА</b>
1	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М 10 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М 10 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М, 10 мин
2	-----	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ODQ, 1 мкМ 10 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ТЭА, 5 мМ 10 мин
3	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М SNP, $10^{-11}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ODQ, 1 мкМ SNP, $10^{-11}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ТЭА, 5 мМ SNP, $10^{-11}$ М 4 мин
4	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М SNP, $10^{-10}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ODQ, 1 мкМ SNP, $10^{-10}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ТЭА, 5 мМ SNP, $10^{-10}$ М 4 мин
5	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М SNP, $10^{-9}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ODQ, 1 мкМ SNP, $10^{-9}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ТЭА, 5 мМ SNP, $10^{-9}$ М 4 мин
6	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М SNP, $10^{-8}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ODQ, 1 мкМ SNP, $10^{-8}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ТЭА, 5 мМ SNP, $10^{-8}$ М 4 мин
7	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М SNP, $10^{-7}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ODQ, 1 мкМ SNP, $10^{-7}$ М 4 мин	5-НТ, $5 \cdot 10^{-6}$ М ТЭА, 5 мМ SNP, $10^{-7}$ М 4 мин

#### Приложение 4. Результаты физиологического эксперимента

Интактный контроль:

[SNP], М	Без блокатора			ODQ		
	Медиана	Нижн. кв.	Верх. кв.	Медиана	Нижн. кв.	Верх. кв.
10 <sup>-11</sup>	7,00	2,40	12,39	2,55	0,00	6,38
10 <sup>-10</sup>	17,70	12,80	22,77	15,07	5,40	22,73
10 <sup>-9</sup>	39,75	30,05	46,58	22,40	13,50	44,50
10 <sup>-8</sup>	57,20	49,20	69,8	38,05	28,20	59,27
10 <sup>-7</sup>	75,10	62,70	79,1	59,12	42,70	65,50

[SNP], М	ТЭА		
	Медиана	Нижн. кв.	Верх. кв.
10 <sup>-11</sup>	4,80	0,00	8,20
10 <sup>-10</sup>	10,80	0,00	14,90
10 <sup>-9</sup>	18,50	1,80	29,00
10 <sup>-8</sup>	26,50	16,65	39,90
10 <sup>-7</sup>	40,05	31,65	52,08

Перевязка левой общей сонной артерии:

[SNP], М	Без блокатора			ODQ		
	Медиана	Нижн. кв.	Верх. кв.	Медиана	Нижн. кв.	Верх. кв.
10 <sup>-11</sup>	4,20	1,40	15,20	0,00	0,00	0,60
10 <sup>-10</sup>	21,55	10,10	26,88	2,65	0,00	6,69
10 <sup>-9</sup>	37,10	14,80	45,70	7,60	1,25	14,85
10 <sup>-8</sup>	45,80	28,55	55,55	17,30	13,08	21,90
10 <sup>-7</sup>	65,85	51,20	84,85	32,38	25,73	45,98

[SNP], М	ТЭА		
	Медиана	Нижн. кв.	Верх. кв.
10 <sup>-11</sup>	0,93	0,00	2,10
10 <sup>-10</sup>	1,99	0,00	11,20
10 <sup>-9</sup>	4,75	0,00	15,90
10 <sup>-8</sup>	25,00	8,40	30,59
10 <sup>-7</sup>	32,93	27,70	49,40

Удаление каротидных телец:

[SNP], М	Без блокатора			ODQ		
	Медиана	Нижн. кв.	Верх. кв.	Медиана	Нижн. кв.	Верх. кв.
10 <sup>-11</sup>	0,00	0,00	5,09	0,00	0,00	0,00
10 <sup>-10</sup>	3,64	0,37	7,15	0,00	0,00	0,00
10 <sup>-9</sup>	8,78	3,24	15,35	3,80	2,53	3,80
10 <sup>-8</sup>	20,37	11,70	29,24	17,80	9,60	18,40
10 <sup>-7</sup>	20,55	12,92	32,94	29,97	27,60	55,20

## Приложение 5. Последовательности праймеров для проведения ОТ-ПЦР.

$\beta$ -актин (U): 5'-tgacgttgacatccgtaaagacctc-3';

$\beta$ -актин (L): 5'-gtaaaacgcagctcagtaacagtccg-3';

SUR2B (U): 5'-ggatcgcacgggtgtaacatagc-3';

SUR2B (L): 5'-gacggtaggcacgcagacacaggt-3';

K<sub>ir</sub> 6.1 (U): 5'-tatcatgtggtggctggtggc-3';

K<sub>ir</sub> 6.1 (L): 5'-agcgtctctgcccttctgtgg-3'