

Н.М. ЯЦКОВСКАЯ, А.А. ЧИРКИН

## СОСТОЯНИЕ ВАЗОКОНСТРИКЦИИ И ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЙ ДИЛАТАЦИИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ВВЕДЕНИЕМ ПАРАКВАТА

Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

При развитии атеросклероза, диабета, артериальной гипертензии возможно избыточное накопление активных метаболитов кислорода, которые приводят к патологическим изменениям в клетках по типу «окислительного взрыва» в фагоцитах. В нефагоцитирующих клетках эндотелия сосудов активные метаболиты кислорода и азота чаще выполняют функции внутриклеточных и межклеточных посредников, обеспечивающих регуляцию тонуса сосудов. Целью работы было исследование зависимой от эндотелия констрикции и дилатации кольца аорты при моделировании окислительного стресса у крыс посредством введения инициатора окислительного стресса параквата. Вазоконстрикцию изучали путем введения в перфузионный раствор возрастающих концентраций  $\alpha 1$  - адреностимулятора фенилэфрина (от  $10^{-15}$  до  $10^{-3}$  М), который связывается с  $\alpha 1$ -рецептором семейства GPCR в артериолах. Эндотелий зависимое расслабление изолированного кольца аорты крыс оценивали классическим способом: предсокращали гладкомышечные клетки кольца аорты фенилэфрином ( $10^{-6}$  М) с последующим кумулятивным добавлением в перфузионный раствор ацетилхолина от  $1 \times 10^{-10}$  до  $3 \times 10^{-5}$  М. Получены данные, которые демонстрируют возможность изучения тонуса аорты крыс: 1) при прямом окислительном повреждении структурно-ферментативных ансамблей клеток эндотелия за счет циклических окислительно-восстановительных реакций введенного *in vivo* параквата; 2) за счет отвлечения НАДФН из реакций, катализируемых эндотелиальным изоферментом NO-синтазы и 1, 2, 4 и 5 изоферментами НАДФ-оксидазы, что приводит к нарушению сигнальных путей, регулирующих сократительные функции гладких мышечных клеток. Полученные результаты позволяют расширить представления о «метаболической памяти» и гомеостатической функции эндотелия в поддержании тонуса сосудов.

Ключевые слова: паракват, тонус сосудов, вазоконстрикция, вазодилатация, окислительный стресс.

**Введение.** Развитие эндотелиопатий вследствие уменьшения образования, высвобождения или повышенной инактивации эндотелиальных вазодилататоров (монооксид азота, простагландин, простациклин, А1, А2, Е1, брадикинин, гистамин, ацетилхолин и др.), а также взаимодействия монооксида азота с ангиотензином-2, активными формами кислорода и окисленными липопротеинами рассматривается в качестве важного фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний. Центральным механизмом образования монооксида азота в NO-синтазной реакции является окисление гуанидинового азота L-аргинина при участии супероксидных анион-радикалов, образующихся на домене Р-450 NO-синтазы. Образованный монооксид азота в присутствии кислорода и его активных форм превращается в ионы  $\text{NO}_2$  и  $\text{NO}_3$ , а также в пероксинитрит [1].

Ранее было показано, что 60-минутный иммобилизационный стресс, характеризующийся увеличением относительной массы надпочечников на 19,5%, концентрации глюкокортикоидов в 2 раза, стабильных продуктов распада монооксида азота ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) на 35%, тиреотропного гормона на 45%, интерлейкина-1 $\beta$  (в 2 раза), появлением в сыворотке крови фактора некроза опухоли- $\alpha$ , и снижением уровня тироксина на 16% и триодтиронина на 10%, сопровождался двумя типами реакции изолированного кольца аорты на ацетилхолин и фенилэфрин. Первый выражался в усилении индуцируемой ацетилхолином дилатации изолированного кольца аорты и уменьшением ее ответа на  $\alpha_1$ -адренергический стимулятор фенилэфрин. Второй проявлялся уменьшением ответа изолированного кольца аорты на ацетилхолин и усилением реакции на фенилэфрин. Оба типа реакции устранялись применением высокоселективного ингибитора индуцируемой NO-синтазы S-метилизотиомочевины, однако при разном типе реакции он действовал разнонаправленно [2, 3]. Таким образом, при кратковременном стрессе в клетках аорты крыс выявляется присутствие индуцибельной NO-синтазы,

которая может быть в одном случае источником большого количества NO (сопряженное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы), а в другом – способствовать снижению его биодоступности (разобщенное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы) [4]. Такие изменения сопровождались увеличением содержания в миокарде крыс диеновых конъюгатов и ТБК-положительных веществ при остром стрессе в 2,25 и 7,6 раза, а при хроническом стрессе в 1,5 и 1,7 раза, соответственно.

Однократная и десятикратная иммобилизации крыс позволили выявить некоторые фенотипические биохимические показатели обмена веществ в сыворотке крови при развитии острого и хронического стресса. При остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивалась концентрация глюкозы в 1,29 раза и уменьшалась концентрация триглицеридов в 2,05 раза. Такие изменения обеспечивали статистически достоверное увеличение коэффициента глюкоза/триглицериды в 2,65 раза. Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменялось при обоих вариантах стрессового воздействия, но содержание мочевины увеличивалось при остром стрессе. Острый стресс приводил к достоверному уменьшению уровня общего белка в сыворотке крови при одновременном увеличении содержания холестерина липопротеинов низкой плотности и величины отношения ХС ЛПНП/ХС ЛПВП (индекс атерогенности). Выявлено статистически достоверное увеличение активности АлАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу [5]. При обоих вариантах иммобилизации крыс не обнаружено изменений в показателях перекисного окисления липидов сыворотки крови, но величина антиоксидантной активности оказалась сниженной на 16,4% при остром стрессе. Содержание суммы нитратов и нитритов в сыворотке крови стрессированных животных увеличивалась в 1,35 раза при остром стрессе и 1,68 раза – при хроническом стрессе. Следовательно, можно предполагать, что нарушения сердечно-сосудистой системы при остром стрессе могут быть связаны с влиянием активных форм кислорода на NO-синтазные реакции и судьбу монооксида азота в тканях, а также на изменения тонуса сосудов в условиях нарушения транспорта липидов по атерогенному типу [6].

Для иллюстрации этого положения целесообразно исследовать влияние окислительного стресса на тонус сосудов. В качестве индуктора окислительного стресса был избран паракват: N,N'-диметил-4,4'-дипиридил дихлорид, относящийся к производным виологена с общей формулой  $(C_5H_4NR)_2^{2+}$  (рис. 1).

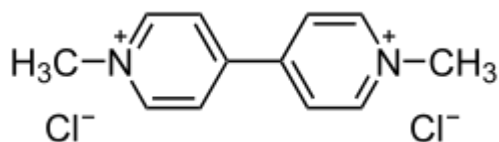


Рис. 1. Паракват

В форме четвертичной аммонийной соли паракват широко используется как сильный гербицид неспецифического действия (высокоэффективный для удаления сорняков и травы). Токсичен для человека и животных. Существует три редокс состояния дипиридила: дикатион ( $bipm^{2+}$ ), радикал-катион ( $bipm^{\cdot+}$ ), и дивосстановленное нейтральное соединение ( $bipm^0$ ). Дикатионная соль наиболее стабильна из всех трех соединений, и это соединение нашло применение при моделировании окислительного стресса. Метод основан на циклических окислительно-восстановительных реакциях в клетке. Паракват получает электрон из цепей переноса электронов и превращается в радикал-катион, который при наличии кислорода быстро его восстанавливает, образуя супероксидный анион-радикал. Затем в реакции, катализируемой супероксиддисмутазой,  $O_2^{\cdot-}$  превращается в перекись водорода, а последняя в реакции с клеточным железом образует гидроксильный радикал. Образованные свободные радикалы кислорода могут инициировать изменения в геноме и его эпигеномной регуляции, истощать резервы НАДФН (нарушение биосинтезов и обезвреживания ксенобиотиков), уменьшать количество монооксида азота, подавляя вазодилатацию [6–9].

Целью работы было исследование зависимой от эндотелия констрикции и дилатации кольца аорты при моделировании окислительного стресса у крыс посредством введения параквата.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты были выполнены на 28 беспородных крысах-самках одной возрастной группы массой 180-210 г. Крыс содержали в стандартных клетках (по 7 особей), без ограничения подвижности, при искусственном освещении, комнатной температуре

20-24°C и свободном доступе к воде и пище (питание натуральным кормом в количестве соответствующем суточным нормам). За 24 часа до эксперимента животным прекращали подачу пищи при неограниченном доступе к воде. Опыты на животных проводили в соответствии с протоколом по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденным Комиссией УО «ВГМУ». Все животные при проведении экспериментов находились в одинаковых условиях. Для устранения влияния сезонной и циркадной зависимости на изучаемые показатели эксперименты с животными проводились в осенне-зимний период в первой половине дня. Содержание крыс, эксперименты и выведение животных из опыта проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями, отраженными в Женевской конвенции International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990) и требованиями Всемирного Общества защиты животных (WSPA).

Животные были разделены на две группы: контрольная и подопытная. В контрольную группу входили интактные особи (n=14). Животным подопытной группы (n=14) однократно интраперитонеально вводили паракват в дозе 20 мг/кг веса животного.

Через 24 часа после введения параквата под уретановым наркозом (1г/100г веса тела животного) вскрывали грудную клетку, удаляли сердце, легкие, извлекали грудной сегмент аорты, и помещали его в охлажденный до 4 °С раствор Кребса-Хензеляйта. В охлажденном растворе фрагмент аорты тщательно очищали от жировой и соединительной ткани и лезвием вырезали из средней трети грудной аорты кольцевой фрагмент шириной 3 мм. Приготовленный таким образом кольцевой сегмент аорты помещали в термостатируемую ванночку, заполненную раствором Кребса-Хензеляйта следующего состава (мМ/л): NaCl – 118; KCl – 4,8; MgSO<sub>4</sub> 1,18; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; NaHCO<sub>3</sub> – 25,0; глюкоза - 11; pH 7,4 при температуре 37 °С. Раствор насыщали карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>). В течение периода стабилизации, который составлял 2 часа, каждые 15 минут обновляли, омывающий препарат аорты, раствор Кребса-Хензеляйта.

В группе животных, у которых изолированные сосуды были обработаны *in vitro*, паракват (5 мМ) добавляли непосредственно в органную ванночку и инкубировали изолированный сегмент аорты с паракватом в течение 20 минут. Контрольная группа – интактные животные.

Эксперименты проводили на установке TISSUEBATH 4CHANSYS, (Biopacsystems, США), 10 мл с использованием датчиков силы TSD125, соединенных с системой накопления данных MP150 (программа AcqKnowledge 4.1, Biopacsystems, США). Препарат функционировал в изометрическом режиме. Данные заносили в компьютер, где обрабатывались при помощи программы AcqKnowledge 4.1 Biopacsystems, (США).

Вазоконстрикцию изучали путем введения в перфузионный раствор возрастающих концентраций  $\alpha_1$ -адреностимулятора фенилэфрина (от 10<sup>-15</sup> до 10<sup>-3</sup> М), который связывается с  $\alpha_1$ -рецептором семейства GPCR в артериолах.

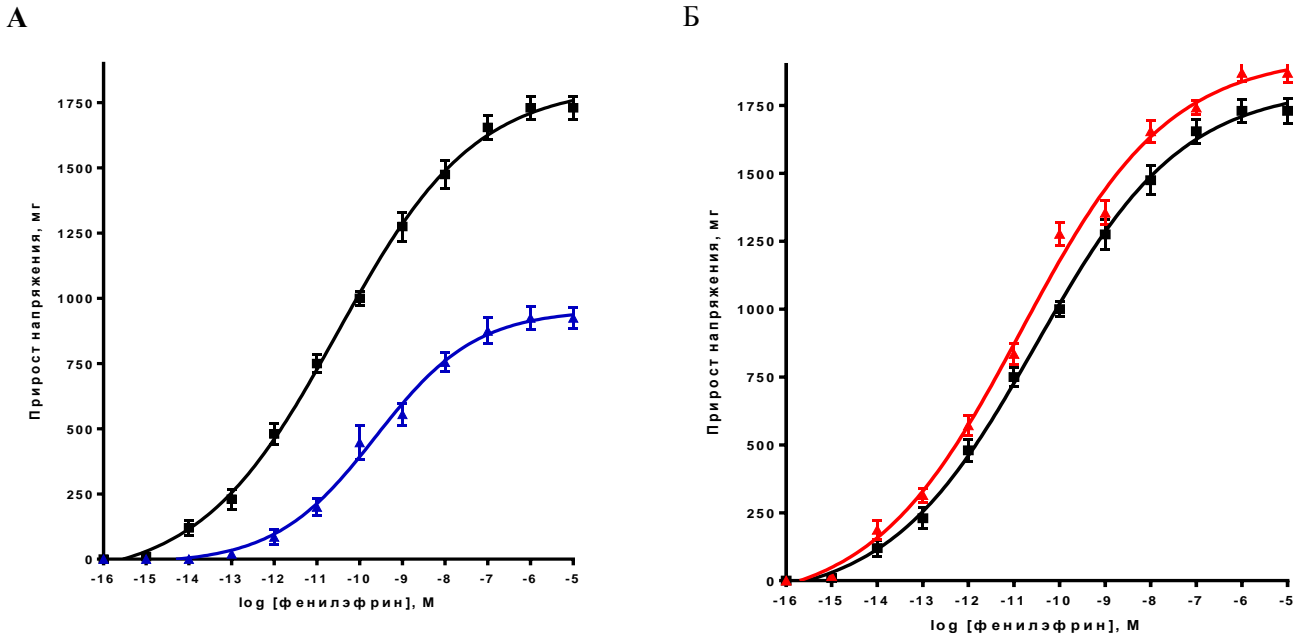
Эндотелийзависимое расслабление изолированного кольца аорты крыс оценивали классическим способом: предсокращали гладкомышечные клетки кольца аорты фенилэфрином (10<sup>-6</sup>М) с последующим кумулятивным добавлением в перфузионный раствор ацетилхолина от 1×10<sup>-10</sup> до 3×10<sup>-5</sup> М.

Обработку данных проводили с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STSTISTICA 6.0 и при помощи программы GraphPadPrism 4.0. Для сравнения двух количественных признаков применяли t-критерий Стьюдента. Различия принимали достоверными при значении  $p < 0,05$ .

**Полученные результаты и обсуждение.** В настоящем исследовании, как и в предшествующих публикациях [2–5], для оценки тонуса сосудов используются данные эндотелиальных адренергической констрикции и ацетилхолиновой дилатации кольца аорты.

**Адренергическая констрикция кольца аорты.** Исходное напряжение кольца аорты во всех исследуемых группах животных не различалось и составляло в контрольной группе животных 1831±19 мг, а в группе подопытных животных после внутрибрюшинного введения параквата 1824±22 мг. Следовательно, введение фенилэфрина в перфузионный раствор происходило на фоне нормального напряжения кольца аорты. Увеличение концентрации  $\alpha_1$ -адреностимулятора фенилэфрина в органной ванночке от 10<sup>-15</sup> до 10<sup>-3</sup> М приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крысы (рис. 1). В контроле увеличение напряжения изолированного кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина 10<sup>-11</sup> М (прирост 41% от исходного напряжения), а при концентрации 10<sup>-6</sup> М ответная реакция возросла на 95% и достигала максимального значения.

У животных подопытной группы, перенесших интоксикацию паракватом *in vivo*, и после обработки фрагментов аорты *in vitro* наблюдались отличия в сократительных реакциях аорты на введение  $\alpha_1$ -адреностимулятора. Предварительное внутрибрюшинное введение параквата приводило к снижению ответа на кумулятивное добавление фенилэфрина (рисунок 1А). В данной группе животных сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 11% от исходного напряжения) и достигало максимума при концентрации фенилэфрина  $10^{-6}$  М – прирост 51%. Поэтому можно сделать заключение, что в этой группе животных реакция кольца аорты на действие  $\alpha_1$ -адреностимулятора была менее выражена по сравнению с контролем.



**Рис. 1.** (А) Влияние параквата *in vivo* и (Б) действие параквата *in vitro* на вазоконстрикторный ответ изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор фенилэфрина. *Примечание:* по оси абсцисс – log концентрации фенилэфрина (М); по оси ординат – дельта сокращения в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор фенилэфрина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «паракват «*in vivo*» и «*in vitro*»».

Предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* обеспечила более сильную реакцию на фенилэфрин: сократительный ответ аорты начинался при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост напряжения на 46%, а в контроле на 41%); максимум прироста напряжения достигался при концентрации фенилэфрина  $10^{-6}$  М (прирост на 101,6%, а в контроле на 95%) (рис. 1Б).

Анализ цифрового материала, приведенного в таблице 1 показал, что внутрибрюшинное введение параквата животным, вероятно, снижало чувствительность аорты к действию  $\alpha_1$ -адреностимулятора, а предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* повышала ее чувствительность к фенилэфрину (табл. 1).

**Табл. 1.** Изменения эндотелийзависимого сокращения аорты при интоксикации паракватом *in vivo* и после обработки фрагмента аорты *in vitro*

Группа	EC <sub>50</sub> , М	CI 95% EC <sub>50</sub> , М
Контроль (n=14)	$3,04 \times 10^{-11}$	$1,76 - 5,26 \times 10^{-11}$
Паракват <i>in vivo</i> (n=14)	$2,34 \times 10^{-10}$	$1,16 - 4,72 \times 10^{-10}$
Паракват <i>in vitro</i> (n=14)	$1,42 \times 10^{-11}$	$8,82 \times 10^{-12} - 2,29 \times 10^{-11}$

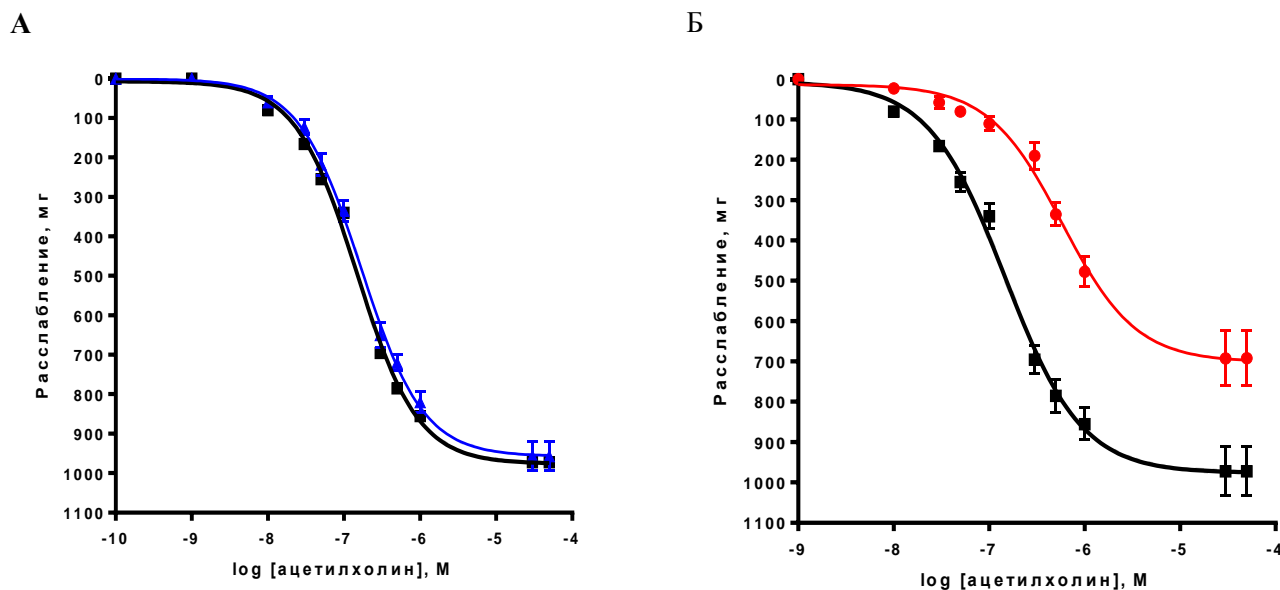
*Примечание:* EC<sub>50</sub>, М – молярная концентрация фенилэфрина, вызывающая 50% ответную реакцию изолированных аортальных колец. CI 95% EC<sub>50</sub>, М – 95% доверительный интервал концентрации фенилэфрина.

Известно, что при отсутствии предварительного спазма супероксидный анион-радикал и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оказывают вазоконстрикторное действие на аорту крыс. В условиях предварительного сужения агонистами GPCR (рецепторы связанные G-белками) супероксидный анион-радикал и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывают смешанные, зависящие от концентрации, эффекты в системе ответов сокращение ↔ релаксация, причем доминирующим эффектом H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является релаксация [10, 11]. Кроме того, на наш взгляд, уменьшение выраженности вазоконстрикции аорты в условиях окислительного стресса, вызванного предварительным введением параквата, можно объяснить также тем, что активные метаболиты

кислорода и азота оказывают обратимое повреждающее действие на мембранные рецепторные G-белки, ненасыщенные жирнокислотные компоненты фосфолипидов и ассоциированные с мембранами ферменты [12, 13]. Супероксидный анион-радикал и  $H_2O_2$  в водных или гидрофобных средах способны изменять функцию белка посредством прямого окисления SH-групп остатков цистеина и создания новых дисульфидных связей, приводя к конформационным изменениям молекул. В дополнение к прямому окислению с помощью активных метаболитов кислорода, остатки цистеина могут быть косвенно окислены пероксиредоксином или нитрозилированы монооксидом азота ( $NO\cdot$ ). Тиоредоксин также может катализировать транс-нитрозилирование цистеина нитрозоглутатионом, или цистеин может быть напрямую глутатионилирован окисленным глутатионом. Недавние работы показали, что окисление метионина может влиять на тонус сосудов. Остатки цистеина, лизина и гистидина также могут быть модифицированы посредством образования аддуктов Михаэля с пероксидами липидов, такими как 4-гидроксиноненал, образующимися при окислении полиненасыщенных жирных кислот. Такая форма модификации в липидной фазе может иметь особое значение для окислительной модификации мембранно-связанных белков гладких мышц сосудов, обеспечивших снижение чувствительности аорты подопытных крыс к действию  $\alpha_1$ -адреностимулятора [10, 14].

Повышение чувствительности аорты крыс, предварительно обработанной паракватом *in vitro*, вероятно, связано со снижением биодоступности NO из-за его взаимодействия с кратковременно образующимися активными формами кислорода. Это вызывает сдвиг влево в системе ответов сокращение↔релаксация, т.е. регистрируется усиление вазоконстрикторного действия фенилэфрина.

**Эндотелийзависимая дилатация кольца аорты.** Известно, что ацетилхолин вызывает эндотелийзависимую вазодилатацию. На рис. 2 представлены данные о влиянии предварительной обработки паракватом животных *in vivo* и фрагментов аорты крыс *in vitro* на расслабление изолированного кольца аорты крыс кумулятивным введением ацетилхолина.



**Рис. 2 (А)** Влияние параквата (*in vivo*) и **(Б)** действие параквата (*in vitro*) на дилатационный ответ изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном добавлением в перфузионный раствор ацетилхолина. *Примечание:* по оси абсцисс – log концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина. ■ – группа «контроль»; ▲ – «паракват *in vivo*»; ● «паракват *in vitro*».

При кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина дилатация кольца аорты контрольных крыс начиналась при концентрации  $10^{-7}$  М и составляла 22,68% (рис.2). При этом максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 63,63%.

Введение параквата *in vivo* (внутрибрюшинно) не приводило к изменению эндотелий зависимой вазодилатации, так как реакция изолированного кольца аорты крыс на кумулятивное добавление в перфузионный раствор ацетилхолина практически не отличалось у животных этой

группы по сравнению с контролем (рисунок 2, А). В данной группе животных дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $10^{-7}$  М и составляла 21,2%, максимальная эндотелий зависимая дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 63,1%.

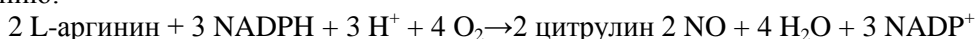
Чувствительность гладкомышечных клеток аорты животных при введении параквата *in vivo* практически не отличалась от контрольных значений  $1,67 \times 10^{-7}$ , (контроль –  $1,47 \times 10^{-7}$ , табл.2).

**Табл. 2.** Влияние параквата на чувствительность к ацетилхолину изолированного кольца аорты крыс

Группа	EC <sub>50</sub> , М	CI 95% EC <sub>50</sub> , М
Контроль (n=14)	$1,47 \times 10^{-7}$	$1,20-1,80 \times 10^{-7}$
Паракватin vivo (n=14)	$1,67 \times 10^{-7}$	$1,44-1,94 \times 10^{-7}$
Паракватin vitro (n=14)	$5,67 \times 10^{-7}$	$4,45-7,61 \times 10^{-7}$

В группе животных, у которых изолированный фрагмент аорты был обработан паракватом *in vitro* (добавляли параквата в органную ванночку и инкубировали в течение 20 минут) введение параквата не изменяло базальное напряжение сосудов ( $3346 \pm 73$  мг), но значительно снижало вазодилаторный ответ изолированного кольца аорты при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина по сравнению с контрольной группой животных (рис. 2,Б). В группе животных, у которых фрагмент аорты обрабатывался паракватом *in vitro*, дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $3 \times 10^{-7}$  М и составляла 12,6%, максимальная эндотелий зависимая дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 43,8%. При этом у животных данной группы, наблюдалось уменьшение чувствительности гладкомышечных клеток изолированного кольца аорты к ацетилхолину. EC<sub>50</sub> составила при введении параквата *in vitro*  $5,67 \times 10^{-7}$ , тогда как в контроле –  $1,47 \times 10^{-7}$  (табл. 2).

Для объяснения полученных результатов следует учитывать, что монооксид азота образуется эндотелиальным изоферментом NO-синтазы (eNOS), связанным с "кавеолами", компонентами плазматических мембран клеток эндотелия, и мембранами аппарата Гольджи внутри клеток, согласно уравнению:



Непродолжительная инкубация фрагментов аорты крысы будет сопровождаться отвлечением НАДФН из реакции подобно тому, как это происходит при подавлении фотосинтеза в растениях. В этих условиях eNOS будет продуцировать в большем объеме вторичные по отношению к основной функции фермента молекулы активных метаболитов кислорода. В тоже время ассоциированные с мембранами ферменты НАДФН-оксидазы (NOX), единственная функция которых производство супероксидного анион-радикала и/или  $\text{H}_2\text{O}_2$ , будут продолжать использование НАДФН. Из семи известных изоформ NOX четыре экспрессируются в эндотелии, а именно NOX1, 2, 4 и 5 [10]. В результате следует ожидать уменьшения образования монооксида азота за счет снижения биосинтеза и возможного связывания с активными метаболитами кислорода, что приведет к ослаблению NO-зависимой вазодилатации через цАМФ-зависимый каскад реакций в гладкомышечных клетках аорты крыс.

**Заключение.** Известно, что при развитии атеросклероза, диабета, артериальной гипертензии возможно избыточное накопление активных метаболитов кислорода, которые приводят к патологическим изменениям в клетках по типу «окислительного взрыва» в фагоцитах. В нефагоцитирующих клетках эндотелия сосудов активные метаболиты кислорода и азота чаще выполняют функции внутриклеточных и межклеточных посредников, обеспечивающих регуляцию тонуса сосудов [10, 15–17]. В статье приведены экспериментальные данные, которые демонстрируют возможность изучения тонуса аорты крыс: 1) при прямом окислительном повреждении структурно-ферментативных ансамблей клеток эндотелия за счет циклических окислительно-восстановительных реакций введенного *in vivo* параквата; 2) за счет отвлечения НАДФН из реакций, катализируемых эндотелиальным изоферментом NO-синтазы и 1, 2, 4 и 5 изоферментами НАДФ-оксидазы, что приводит к нарушению сигнальных путей, регулирующих контрактильные функции гладких мышечных клеток. Полученные результаты позволяют расширить представления о «метаболической памяти» и гомеостатической функции эндотелия в поддержании тонуса сосудов. В последние годы появились фундаментальные исследования эпигенетических и генетических процессов в клетках с помощью индуктора свободно-радикальных процессов параквата [9, 18]. Перспективным является эффект окислительного повреждения ДНК паракватом *in vivo* с образованием 8-оксогуанина (8OG), мутагенного основания, которое при репликации вызывает мутации трансверсии G в T. С помощью технологии CRISPR-Cas9 был осуществлен нокаут 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (OGG1) и

MUTYH-гликозилазы, двух ключевых ферментов, участвующих в эксцизионной репарации 8OG. Были созданы клетки AS52 с двойным нокаутом (DKO), более чувствительные к токсичности параквата, чем родительская (WT) линия клеток AS52 [18]. Это открывает определенные возможности для дальнейших исследований прооксидантных свойств параквата и испытания антиоксидантных субстанций на клеточном уровне.

### Литература

- [1]. Bauer V., Sotnikova R. Nitric oxide – the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions // *Gen. Physiol. Biophys.* 2010. Vol. 29. P. 319–340.
- [2]. Солодков А.П., Яцковская Н.М. Изменения эндотелийзависимой дилатации и  $\alpha$ 1-адренореактивности аорты крыс, вызванные ингибированием индуцируемой NO-синтазы после ограничения двигательной активности // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова.* 2013. Т. 99, № 7. С. 859–868.
- [3]. Солодков А.П., Яцковская Н.М., Крайнова Н.А., Нечаев И.Н., Князев Е.Н., Максименко Д.Г. Провоспалительные цитокины и эндотелийзависимая дилатация при остром стрессе // «Фундаментальные и прикладные проблемы стресса: материалы 3-й Международной научно-практической конференции, Витебск, 16-17 апреля 2013 г. Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2013. С. 83–87.
- [4]. Яцковская Н.М. К вопросу об образовании индуцибельной NO-синтазы в аорте стрессированных крыс. / Свободные радикалы в химии и жизни. Тез.докл. 3-й Междунар. конф., Минск, 10-11 октября 2019 г., отв. ред. О.И. Шадыро. Минск: БГУ, 2019. – С. 87.
- [5]. Лазуко С.С. NO-зависимые механизмы регуляции адренореактивности артериальных сосудов после иммобилизационного стресса // *Вестник ВДУ.* 2019. № 2(103). С. 59–65.
- [6]. Гурская А.И., Отвалко Е.А., Яцковская Н.М., Чиркин А.А. Биохимические критерии острого и хронического стресса при иммобилизации крыс // *Вестник ВДУ.* 2017. № 1(98). С. 61–65.
- [7]. Яцковская Н.М. Некоторые параметры свободно-радикальных процессов в миокарде и сыворотке крови крыс при моделировании острого и хронического стресса / Свободные радикалы в химии и жизни. Тез.докл. 3-й Междунар. конф., Минск, 10-11 октября 2019 г., отв. ред. О.И. Шадыро. Минск: БГУ, 2019. С. 88
- [8]. Яцковская Н.М., Чиркин А.А. Связь вазоконстрикторного эффекта с введением крысам 1,1'-диметил-4,4'-дипиридиinium дихлорида (паракуват) // Свободные радикалы в химии и жизни. Тез.докл. 3-й Междунар. конф., Минск, 10-11 октября 2019 г., отв. ред. О.И. Шадыро. Минск: БГУ, 2019. С. 86.
- [9]. Doran M.L., Kneel J.M., Wang N., Rzezniczak T.Z. et al. Metabolomic analysis of oxidative stress: Superoxide dismutase mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster* // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Vol. 113. P. 323–334.
- [10]. Knock G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signaling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. Vol. 145. P. 385–427.
- [11]. Ding Y., Winters A., Ding M., Graham S., Akopova I. et al. Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. P. 31799–31809.
- [12]. Tejero J., Shiva S., Gladwin M.T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation // *Physiol. Rev.* 2019. Vol. 99. 311–379.
- [13]. Moller M.N., Rios N., Trujillo M., Radi R., A. Denicola et al. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294. P. 14776–14802.
- [14]. Trevisani M., Siemens J., Materazzi S., Bautista D.M., Nassini R. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104. P. 13519–13524.
- [15]. Liao Y., Gou L., Chen L., Zhong X. et al. NADPH oxidase 4 and endothelial nitric oxide synthase contribute to endothelial dysfunction mediated by histone methylations in metabolic memory // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. Vol. 115. P. 383–394.
- [16]. Yang M., Silverstein R. L. CD36 signaling in vascular redox stress // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. Vol. 136. P. 159–171.
- [17]. Cholan P. M., Cartland S.P., Dang L., Rayner B.S. et al. TRAIL protects against endothelial dysfunction in vivo and inhibits angiotensin-II-induced oxidative stress in vascular endothelial cells in vitro // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. Vol. 126. P. 341–349.
- [18]. Tajai P., Fedeles B.I., Suriyo T., Navasumrit P. et al. An engineered cell line lacking OGG1 and MUTYH glycosylases implicates the accumulation of genomic 8-oxoguanine as the basis for paraquat mutagenicity // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. Vol. 116. P. 64–72

Поступила в редакцию: 02.04.2020 г.

**CONDITION OF VASOKONSTRICION AND DEPENDENT DILATION ENDOTHELIUM IN MODELING OF OXIDATIVE STRESS BY INTRODUCING PARACQUATE**

*Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Belarus*

**Summary**

With the development of atherosclerosis, diabetes, arterial hypertension, excessive accumulation of active oxygen metabolites is possible, that lead to pathological changes in the cells as an “oxidative explosion” in phagocytes. In non-phagocytic vascular endothelial cells, active metabolites of oxygen and nitrogen more often perform the functions of intracellular and intercellular mediators, providing regulation of vascular tone. The aim of the work was to study endothelial-dependent constriction and aortic ring dilatation in modeling oxidative stress in rats by introducing a paraquat oxidative stress initiator. Vasoconstriction was studied by introducing increasing concentrations of  $\alpha 1$  - phenylephrine adrenostimulator (from  $10^{-15}$  to  $10^{-3}$  M) into the perfusion solution, which binds to  $\alpha 1$  - GPCR family receptor in arterioles. Endothelium dependent relaxation of an isolated rat aortic ring was evaluated in the classical way (they reduced the smooth muscle cells of the aortic ring with phenylephrine ( $10^{-6}$  M), followed by cumulative addition of acetylcholine from  $1 \times 10^{-10}$  to  $3 \times 10^{-5}$  M in a perfusion solution). Study of rat aortic tone: 1) with direct oxidative damage to structurally-enzymatic ensembles of endothelial cells due to cyclic redox reactions of in vivo paraquat introduced; 2) due to the distraction of NADPH from reactions catalyzed by the endothelial isoenzyme of NO-synthase and 1, 2, 4, and 5 isozymes of NADP-oxidase, which leads to disruption of the signaling pathways that regulate the contractile functions of smooth muscle cells. The obtained results allow us to expand our understanding of the “metabolic memory” and the homeostatic function of the endothelium in maintaining vascular tone.

*Key words:* paraquat, vascular tone, vasoconstriction, vasodilation, oxidative stress.