

### Литература

1. Balkaya, M. Stress worsens endothelial function and ischemic stroke via glucocorticoids / Balkaya M. [et all.] // Stroke . – 2011. – № 42(11). – P. 3258–3264.
2. Rizzo, M.T. Brain endothelial cell death: modes, signaling pathways, and relevance to neural development, homeostasis, and disease / M.T. Rizzo, H.A. Leaver // Mol Neurobiol. – 2010. – № 42(1). – P. 52–63.
3. Custodis, F. Heart rate contributes to the vascular effects of chronic mental stress: effects on endothelial function and ischemic brain injury in mice / F. Custodis [et all.] // Stroke. – 2011. – № 42(6). – P. 1742–1749.
4. Ortiz, J. Effect of stress in the mesolimbic dopamine system / J. Ortiz [et all.] // Neuropsychopharmacology. – 1996. – Vol. 14 – № 6 – P. 443–452.
5. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2003. – 312 с.

## ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ И КИНИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КОРОНАРНОГО КРОВОТОКА У МЫШЕЙ С «НОКАУТИРОВАННЫМ» ГЕНОМ, ОТВЕТСТВЕННЫМ ЗА ЭНДОТЕЛИАЛЬНУЮ NO-СИНТАЗУ

*Козловский В.И., \* Зинчук В.В., \* Хлопицкий С. \*\**

*\*Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно*

*\*\*Ягеллонский университет, г. Краков, Польша*

**Введение.** Известно, что основным проявлением дисфункции эндотелия является дефицит эндотелиального монооксида азота (NO) вследствие снижения его продукции и/или повышенной инактивации активными формами кислорода [3]. В то же время имеются данные о том, что в условиях дефицита NO могут включаться компенсаторные механизмы, обеспечивающие сохранение эндотелий-зависимой регуляции перфузии тканей [4, 5]. Среди этих механизмов можно отметить, в частности, увеличение продукции NO другими изоформами NO-синтазы, а также повышение генерации простаглицина (PGI<sub>2</sub>). Целью настоящего исследования явилось сравнить эндотелий-зависимые коронарорасширяющие ответы на ацетилхолин и брадикинин в изолированных сердцах мышей с «нокаутированным» геном эндотелиальной NO-синтазы (eNOS<sup>-/-</sup> мыши) и контрольных мышей линии C57BL/6J (eNOS<sup>+/+</sup> мыши).

**Материалы и методы исследования.** eNOS<sup>-/-</sup> мыши были получены на основе чёрных мышей линии C57BL/6J в лаборатории Джексона (Бар-Харбор, США), они разводились и содержались в виварии медицинского центра Академии Наук Польши в Варшаве. Мыши линии C57BL/6J использовались в качестве контрольных животных (eNOS<sup>+/+</sup> мыши).

Исследования проводились на изолированном сердце мыши, перфузируемом ретроградно через аорту под постоянным перфузионным давлением 100 мм рт. ст. с использованием аппарата Лангендорфа (Hugo Sachs

Electronics). Детали метода описаны ранее [2]. В ходе эксперимента измерялся и мониторировался коронарный поток (КП) – объём жидкости, протекавшей в единицу времени. Коронарорасширяющие ответы измерялись по приросту КП. Оценивалась субмаксимальная коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином ( $3 \cdot 10^{-10}$  М, болюс) и брадикинином ( $10^{-9}$  М, болюс). Для анализа механизмов эндотелий-зависимой вазодилатации использовали неселективный ингибитор NO-синтазы L-N<sup>G</sup>-нитро-аргинина метиловый эфир (L-NAME) и ингибитор циклооксигеназы индометацин. В этих экспериментах коронарорасширяющие ответы получали дважды: до применения ингибитора и в его присутствии. Статистическая обработка данных проводилась с помощью компьютерной программы «Статистика 6». Статистически достоверным различие между группами считалось при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В изолированном сердце мыши коронарорасширяющий ответ на ацетилхолин состоит из двух фаз: ранней и поздней вазодилатации. Ранняя фаза коронарной вазодилатации, вызванной ацетилхолином, менее выражена у eNOS<sup>-/-</sup> мышей в сравнении с контрольными eNOS<sup>+/+</sup> мышами. В то же время поздняя фаза коронарорасширяющего ответа на ацетилхолин, а также коронарорасширяющий эффект брадикинина не отличаются существенно в вышеуказанных группах животных.

В сердце eNOS<sup>+/+</sup> мышей ранняя фаза коронарорасширяющего ответа на ацетилхолин, а также коронарная вазодилатация, вызванная брадикинином, уменьшались в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME, в то время как в сердце eNOS<sup>-/-</sup> мышей указанный ингибитор уменьшал только раннюю фазу вазодилатации, вызванной ацетилхолином, не изменяя коронарорасширяющий ответ на брадикинин (таблица 1). Поздняя фаза вазодилататорного ответа на ацетилхолин практически полностью устранялась в обеих группах животных индометацином (таблица 2).

Таблица 1 – Влияние L-NAME ( $5 \cdot 10^{-4}$  М) на коронарорасширяющие ответы в изолированных сердцах eNOS<sup>+/+</sup> и eNOS<sup>-/-</sup> мышей –  $M \pm S$  или Me (25%;75%)

Соединение, доза		Прирост коронарного потока (мл/мин)			
		eNOS <sup>+/+</sup> мыши		eNOS <sup>-/-</sup> мыши	
		без L-NAME	в присутствии L-NAME	без L-NAME	в присутствии L-NAME
ацетилхолин ( $3 \cdot 10^{-10}$ М)	ранняя фаза	0,73±0,21; n=9	0,32±0,15*; n=9	0,60±0,23; n=12	0,40±0,24*; n=12
	поздняя фаза	0,59 (0,52;0,80), n=9	0,37 (0,35;0,42); n=9	0,64 (0,49;0,99); n=12	0,66 (0,30;1,20); n=12
брадикинин ( $10^{-9}$ М)		2,20 (1,50;2,80); n=9	0,80 (0,40;1,10)*; n=9	2,40 (1,70;2,90); n=9	2,30 (1,90;2,80); n=9

Примечание: \* – статистически достоверное различие в сравнении с ответом без ингибитора по критерию Вилкоксона ( $p < 0,05$ ).

Результаты экспериментов показывают, что коронарорасширяющий эффект ацетилхолина как у контрольных, так и у eNOS<sup>-/-</sup> мышей реализуется с участием как NO (ранняя фаза), так и PGI<sub>2</sub> (поздняя фаза), причём

ранняя NO-зависимая фаза коронарной вазодилатации, вызванной ацетилхолином, менее выражена в группе eNOS<sup>-/-</sup> мышей. Коронаросширяющий эффект брадикинина опосредован NO в сердце eNOS<sup>+/+</sup> мышей, в то же время у животных eNOS<sup>-/-</sup> линии этот эффект реализуется с участием NO- и простаглицлин-независимого пути. Известно, что эндотелиальные NO- и простаглицлин-независимые механизмы обусловлены так называемым гиперполяризующим фактором эндотелиального происхождения (EDHF) [1].

Таблица 2 – Влияние индометацина ( $5 \cdot 10^{-6}$  М) на коронаросширяющие ответы в изолированных сердцах eNOS<sup>+/+</sup> и eNOS<sup>-/-</sup> мышей – М±S или Me (25%;75%)

Соединение, доза		Прирост коронарного потока (мл/мин)			
		eNOS <sup>+/+</sup> мыши		eNOS <sup>-/-</sup> мыши	
		без индо-метацина	в присутствии индометацина	без индо-метацина	в присутствии индометацина
ацетилхолин ( $3 \cdot 10^{-10}$ М)	ранняя фаза	0,59±0,32; n=10	0,55±0,31; n=10	0,33±0,18; n=8	0,29±0,21; n=8
	поздняя фаза	0,47 (0,42;0,71); n=10	0,07 (0;0,11)*; n=10	0,37 (0,26;0,45); n=8	0,04 (0;0,14)*; n=8
брадикинин ( $10^{-9}$ М)		1,95 (1,40;2,26); n=10	1,67 (1,35;2,25); n=10	2,07 (1,51;2,50); n=11	1,98 (1,44;2,35); n=11

Примечание: \* – статистически достоверное различие в сравнении с ответом без ингибитора по критерию Вилкоксона ( $p < 0,05$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при дефиците эндотелиального NO в коронарном русле включаются компенсаторные механизмы, обеспечивающие сохранение эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока. Особую роль в этих механизмах играет NO- и простаглицлин-независимый путь, благодаря которому полностью сохраняется эндотелий-зависимый коронаросширяющий эффект брадикинина. В то же время коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином (ранняя фаза), частично обеспечивается за счёт других изоформ NO-синтазы.

#### Литература

1. Félétou, M. EDHF: new therapeutic target? / M. Feletou, P.M. Vanhoutte // *Pharmacol. Res.* – 2004. – Vol. 49. – P. 565–580.
2. Kozlovski, V.I. Effects of two beta-3 agonists, CGP 12177A and BRL 37344, on coronary flow and contractility in isolated guinea pig heart / Kozlovski V.I., Chlopicki S., Gryglewski R.J. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 41, № 5. – P. 706–713.
3. Li, H. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease / Li H., Förstermann U. // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 13, № 2. – P. 161–167.
4. Meng, W. NOS-cGMP-dependent ACh-induced relaxation in pial arterioles of endothelial NOS knockout mice / W. Meng [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274. – P. 411–415.
5. Sun, D. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced dilation in eNOS knockout mice / Sun D. [et al.] // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85, № 3. – P. 288–293.