

ФИЗИОЛОГИЯ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ СИСТЕМ

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ВАЗОДИЛАТАТОРОВ  
В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА АРТЕРИЙ У КРЫС

© Г. И. Лобов,<sup>1</sup> Е. Ю. Васина,<sup>2, 3</sup> З. Л. Малахова,<sup>2</sup> Т. Д. Власов<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: gilobov@yandex.ru

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский  
университет им. акад. И. П. Павлова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт экспериментальной медицины Северо-Западного федерального  
медицинского исследовательского центра им. акад. В. А. Алмазова

Исследовались механизмы эндотелий-зависимой дилатации крупных и средних артерий *ex vivo* и сосудов микроциркуляторного русла кожи крыс *in vivo*. Силу сокращений сегментов артерий регистрировали миографом с датчиком силы FORT-10. Ацетилхолин (АХ) ( $1 \times 10^{-9}$ — $1 \times 10^{-5}$  М) вызывал дозозависимую дилатацию сосудов. Продукцию эндотелием оксида азота (NO), простаглицлина (PGI<sub>2</sub>) и эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF) ингибировали L-NAME, диклофенаком и тетраэтиламмонием (ТЭА) соответственно. В аорте максимальное уменьшение АХ-индуцируемой дилатации наблюдалось при применении L-NAME, ТЭА оказывал меньший ингибирующий эффект, минимальное уменьшение амплитуды вазодилатации было зарегистрировано при применении диклофенака. В верхней брыжеечной артерии максимальное снижение АХ-индуцируемой дилатации происходило при применении ТЭА, L-NAME оказывал меньший ингибирующий эффект, диклофенак приводил к минимальному снижению дилатации. В коже к снижению АХ-индуцируемой гиперемии приводило применение ингибитора NO-синтазы L-NNA и ТЭА, диклофенак не оказывал влияния на величину АХ-индуцируемой гиперемии. Ингибирующий эффект L-NNA был максимален в течение первых 2 минут после ионофореза АХ, максимальный ингибирующий эффект ТЭА проявлялся на 4—6 минутах.

*Ключевые слова:* эндотелий, артерии, вазодилатация, оксид азота, простаглицлин, эндотелиальный гиперполяризующий фактор.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 3. С. 327—337. 2018

G. I. Lobov,<sup>1</sup> E. Yu. Vasina,<sup>2, 3</sup> Z. L. Malakhova,<sup>2</sup> T. D. Vlasov.<sup>2, 3</sup> THE ROLE OF VARIOUS ENDOTHELIAL VASODILATORS IN REGULATION OF ARTERY TONUS IN RATS.

<sup>1</sup> Pavlov Institute of Physiology of the RAS, St. Petersburg, Russia; e-mail: gilobov@yandex.ru; <sup>2</sup> Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup> Institute of Experimental Medicine of Almazov National Medical Research Centre.

We investigated the mechanisms of endothelium-dependent dilation of large and medium arteries *ex vivo* and microvasculature in rat skin *in vivo*. The force of the contractions of the artery segments was recorded with a myograph with the FORT-10 force sensor. Acetylcholine (АХ)

( $1 \times 10^{-9}$ — $1 \times 10^{-5}$  M/L) caused a dose-dependent dilation of the vessels. The production of endothelium of nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and endothelial hyperpolarizing factor (EDHF) was inhibited by L-NAME, diclofenac and tetraethylammonium (TEA), respectively. In the aorta, the maximum decrease in AX-induced dilation was observed with L-NAME, TEA had a lesser inhibitory effect, a minimal decrease in the amplitude of vasodilation was recorded with diclofenac. In the superior mesenteric artery, the maximum decrease in AX-induced dilation occurred with the use of TEA, L-NAME had a lesser inhibitory effect, diclofenac led to a minimal decrease in dilation. In the skin, the use of L-NNA and TEA led to a decrease in AX-induced hyperemia, diclofenac had no effect on the magnitude of AX-induced hyperemia. The inhibitory effect of L-NNA was maximal within the first two minutes after AX iontophoresis, the maximum inhibitory effect of TEA was manifested at 4-6 minutes.

*Key words:* endothelium, arteries, vasodilation, nitric oxide, prostacyclin, endothelial hyperpolarizing factor.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 3. P. 327—337. 2018

Долгое время было принято считать, что основным детерминантом вазомоторной функции является нервная система, а монослой эндотелиальных клеток является лишь физическим барьером между стенкой сосуда и кровью. Однако в начале 1980-х годов представления о функциях эндотелия коренным образом изменились. Было установлено, что сосудистый эндотелий играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса, артериального давления и кровотока посредством образования нескольких вазоконстрикторов и вазодилаторов. К числу последних относятся оксид азота (NO), простагландин (PGI<sub>2</sub>) и эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF) [14, 16, 31]. Эндотелиальные вазодилаторы выделяются под влиянием ряда стимулов, включая напряжение сдвига и эндотелиальные агонисты, такие как ацетилхолин и брадикинин, и приводят к расслаблению сосудистых гладких мышц [7, 8, 15]. Однако роль каждого из этих вазодилаторов в разных сосудистых регионах у разных видов животных отличается [6]. Эндотелиальные клетки, несмотря на общее происхождение, проявляют структурную и функциональную гетерогенность. Даже по длине одного и того же сосуда плотность рецепторов и ответы на вазомоторные факторы могут варьировать [22].

Практически во всех работах, посвященных исследованию механизмов эндотелий-зависимой вазодилатации, показана важная роль NO. Эндотелиальный NO является мощным сосудорасширяющим агентом, который, диффундируя в гладкомышечные клетки, активирует несколько сигнальных путей, важнейшим из которых является путь NO—растворимая гуанилатциклаза—цГМФ—АТФ-чувствительные K<sup>+</sup>-каналы [22, 34]. NO является основным вазодилатором, продуцируемым эндотелием в крупных артериях.

В других сосудистых сетях вазодилатация слабо чувствительна к ингибиторам NO-синтазы. В некоторых из них важную функцию выполняет продуцируемый эндотелием PGI<sub>2</sub>, синтезируемый из арахидоновой кислоты циклооксигеназой (COX) и простагландин-синтазой [10]. Он активирует IP-рецепторы на гладких мышцах сосудов и в большинстве нормальных артерий приводит к их релаксации. Хотя PGI<sub>2</sub> может быть мощным вазодилатором и быстро выделяется эндотелиальными клетками, его роль в качестве эндотелийпродуцируемого медиатора релаксации не полностью оценена, поскольку в некоторых сосудистых сетях вазодилаторный эффект производных COX наблюдается только при подавлении других сигнальных путей, приводящих к эндотелий-зависимой релаксации сосудистых гладкомышечных клеток [10, 19].

Имеется множество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что в мелких артериях вазодилатацию опосредует главным образом EDHF [16, 26]. Сосудорасширяющее действие EDHF опосредуется через активацию Ca<sup>2+</sup>-активируемых K<sup>+</sup>-каналов, имеющих в эндотелии, что приводит к гиперполяризации клеточных мембран и индуцирует релаксацию гладкомышечных клеток. Гиперполяризация, вызываемая EDHF, устойчива к ингибиторам NO-синтазы

(NOS) и циклооксигеназы и ингибируется в зависимости от ткани относительно небольшими концентрациями тетраэтиламмония (ТЕА), апаминном или комбинацией харибдотоксин + апамин [9, 16, 18].

Настоящее исследование было проведено с целью исследования механизмов эндотелий-зависимой дилатации в артериях разного диаметра у нормотензивных крыс и определения вклада в вазодилатацию эндотелий-зависимой гиперполяризации, опосредуемой  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемыми  $\text{K}^+$ -каналами большой проводимости.

## МЕТОДИКА

Исследование было проведено на крысах линии Вистар—Киото (самцы, 16 недель, масса 300—320 г, 14 животных). До исследования животные содержались в виварии в условиях, соответствующих требованиям Директивы 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях. 7 крыс под наркозом (хлоралгидрат — 480 мг/кг) декапитуировали и препарировали сосуды для исследования. После очистки от окружающей соединительной и жировой тканей вырезали сегменты сосудов длиной 2 мм (14 колец брюшной аорты ниже отхождения почечных артерий и 15 колец верхней брыжеечной артерии). Препарирование сосудистых сегментов проводилось очень осторожно с целью минимизирования повреждения эндотелия. Препараты размещали в термостатируемой камере для экспериментальных исследований с проточным физиологическим раствором (скорость протока — 1.5 мл/мин), который предварительно и в процессе эксперимента сатурировали газовой смесью 95 %  $\text{O}_2$  и 5 %  $\text{CO}_2$ . Физиологический раствор имел следующий состав (в мМ):  $\text{NaCl}$  — 120.4;  $\text{KCl}$  — 5.9;  $\text{CaCl}_2$  — 2.5;  $\text{MgCl}_2$  — 1.2;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  — 1.2;  $\text{NaHCO}_3$  — 15.5; глюкоза — 11.5. Температуру раствора в камере поддерживали на уровне  $37.0 \pm 0.1$  °C с помощью непрерывной циркуляции воды из внешнего контура термостата LOIP LT-105a. Исследуемые препараты подвергали натяжению, исходя из величины трансмурального давления 90 мм рт. ст.

Нижний конец препарата фиксировали к манипулятору с микрометром, а верхний присоединяли к изометрическому датчику силы FORT-10 (WPI, США). Сокращения регистрировали в изометрическом режиме. Сигнал от датчика силы поступал в блок Labmaster (усилитель + АЦП) (Институт физиологии им. И. П. Павлова), далее — в компьютер, данные обрабатывались программой Labmaster с использованием пакета прикладных программ MATLAB [1]. Регистрацию напряжения в стенке сосуда начинали через 30 мин с начала эксперимента после стабилизации состояния препаратов. Эффекты АХ оценивали через 15 мин после введения в раствор ингибиторов NO-синтазы и циклооксигеназы и блокаатора  $\text{K}^+$ -каналов — ТЕА.

В исследованиях на изолированных сосудах применяли следующие агонисты и антагонисты: норадреналин ( $\pm$ )-Norepinephrine (+)-bitartrate salt, Sigma-Aldrich,  $1 \times 10^{-5}$  М; ацетилхолин (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich)  $1 \times 10^{-10}$ — $1 \times 10^{-5}$  М; *N* $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester — L-NAME (ICN Biomedicals),  $1 \times 10^{-4}$  М; диклофенак (Dicloberl®, Берлин-Хеми АГ)  $1 \times 10^{-5}$  М; тетраэтиламмония хлорид (Tetraethylammonium chloride, Sigma-Aldrich)  $1 \times 10^{-3}$  М.

Вторая серия экспериментов была проведена на 7 наркотизированных животных. Животных наркотизировали комбинацией препаратов золетил+ксилазин и размещали на термостатируемом столике (Physitemp TCAT-2LV controller). Перфузию тканей измеряли с помощью прибора высокочастотной доплерографии «Минимакс-Допплер-К» (ООО «СП Минимакс», Санкт-Петербург, Россия). Датчик с частотой излучения 20 МГц позволял определять кровоток в ткани на глубине до 5 мм. На коже бедра у крыс удаляли шерстный покров. Исследования тканевой перфузии проводили на наружной поверхности кожи бедра в одной и той же точке в течение одного этапа исследования. Угол установки датчика к ис-

следуемой поверхности составлял  $60^\circ$ , что соответствовало наилучшему акустическому и визуальному доплеровскому сигналу. Датчик закрепляли на манипуляторе. Находили положение датчика, при котором появлялся сигнал, и далее плавно перемещали его к коже и от кожи для получения устойчивого максимального сигнала. Запись доплерограмм выполняли до проведения ионофореза и на протяжении 7 мин после ионофореза тестовых веществ. Эндотелий-зависимую вазодилатацию вызывали ионофорезом раствора ацетилхолина (0.3 мг/мл). Блокаду синтеза NO, PGI<sub>2</sub> и EDHF производили ионофорезом растворов нитро-L-аргинина (L-NNA), диклофенака натрия, тетраэтиламмония хлорида (ТЭА) соответственно. Ионофорез АХ и ингибиторов осуществляли с помощью прибора «Поток-1». Раствор наносили на фильтровальную бумагу, помещенную на кожу бедра крысы и проводили ионофорез в течение 1 мин (сила тока 1 мА). Всем животным проводили по 3 пробы: проба с АХ для определения величины эндотелий-зависимой гиперемии, а также проба с АХ после ионофореза 1 или 2 блокаторов [2].

Обработку полученных результатов проводили с помощью программы Stat-Soft STATISTICA 6.1.478. В связи с тем, что полученные результаты имели нормальное распределение, данные представлены в виде средних значений с их стандартным отклонением ( $M \pm SE$ ). Для установления достоверности различий использовали критерий *t*-Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании эффектов АХ на изолированные препараты аорты и верхней брыжеечной артерии в исходном состоянии было зарегистрировано незначительное снижение тонуса. В связи с этим во всех последующих экспериментах осуществлялось предварительное сокращение сосудов посредством добавления в раствор норадреналина ( $1 \times 10^{-5}$  М) [23]. Действие норадреналина приводило к быстрому сокращению аорты и верхней брыжеечной артерии. После достижения пика сокращения на протяжении 2—3 мин тонус препаратов несколько снижался и устанавливался на относительно постоянном уровне. Дальнейшие воздействия агонистов и антагонистов проводились на фоне действия норадреналина. Добавление в раствор АХ в концентрации  $1 \times 10^{-10}$  М не приводило к изменениям тонуса сосудов, АХ в концентрации  $1 \times 10^{-9}$  М вызывал слабое расслабление сосудистых препаратов. При действии АХ в концентрациях  $1 \times 10^{-8}$ — $1 \times 10^{-6}$  М наблюдалось выраженное расслабление, при этом АХ в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М приводил практически к максимальной релаксации сосудистых препаратов (рис. 1). Поэтому во всех последующих опытах применяли АХ в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М.

В следующей серии экспериментов в физиологический раствор предварительно вводили L-NAME, диклофенак или ТЭА. На первом этапе исследований ингибиторы вводили в раствор по одному. Через 15 мин с начала воздействия ингибиторов в раствор вводили АХ и оценивали амплитуду расслабления. В последующих экспериментах в раствор одновременно вводили по 2 ингибитора, затем через 15 мин с начала воздействия этих препаратов в раствор вводили АХ и определяли величину максимальной дилатации. В заключительной серии экспериментов на изолированных сосудах в раствор одновременно вводили L-NAME, диклофенак и ТЭА с последующим определением АХ-индуцируемой релаксации сосудов. Результаты этой серии экспериментов представлены на рис. 2.

Применяемые ингибиторы оказывали различный эффект на величину АХ-индуцируемого расслабления препаратов. Применение L-NAME приводило к значительному уменьшению амплитуды АХ-индуцируемого расслабления в препаратах аорты (в среднем — на  $53.7 \pm 4.6$  %), в верхней брыжеечной артерии уменьшение амплитуды было менее выраженным — на  $29.4 \pm 3.6$  %. Эффект

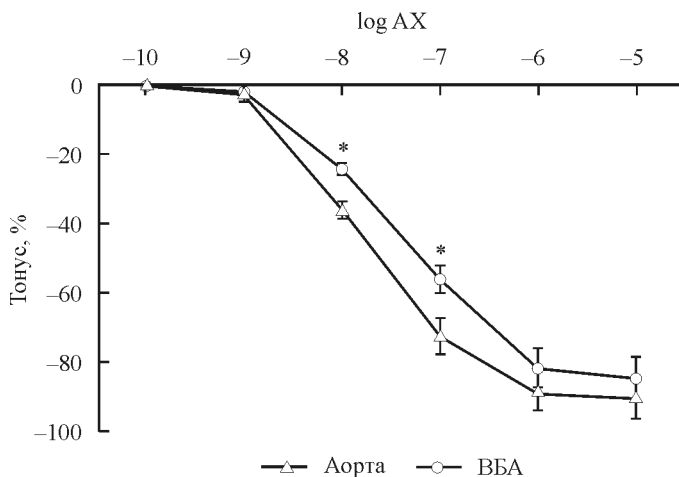


Рис. 1. Реакции аорты и верхней брыжеечной артерии (ВБА), предварительно сокращенных норадреналином, на АХ.

По оси абсцисс — логарифм концентрации АХ, по оси ординат — расслабление препаратов, в % от амплитуды сократительной реакции на норадреналин. \* различия в реакциях достоверны,  $p < 0.05$ .

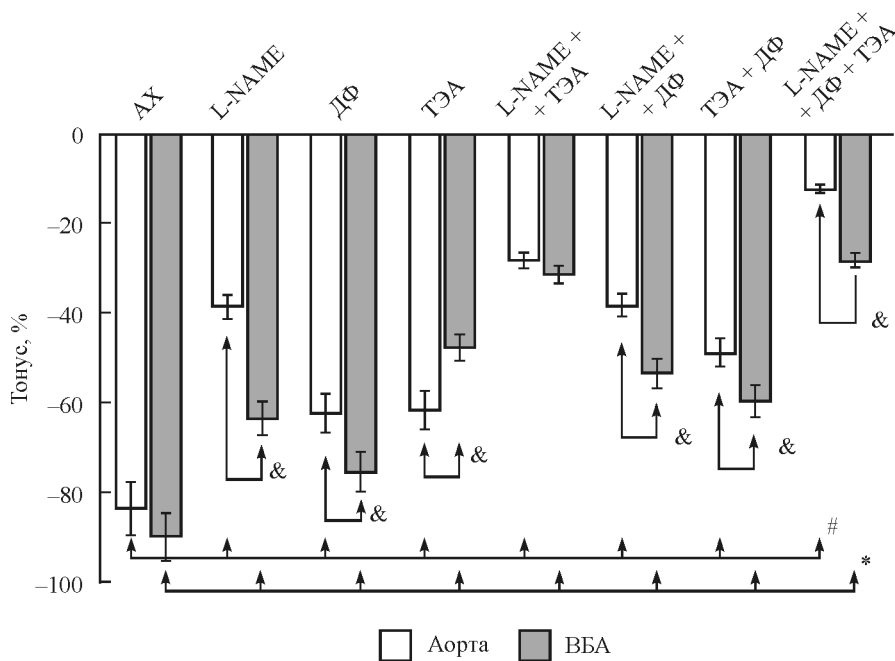


Рис. 2. Амплитуда расслабления сегментов аорты и верхней брыжеечной артерии (ВБА) на ацетилхолин (АХ) на фоне действия L-NAME, диклофенака (ДФ) и тетраэтиламмония (ТЭА).

По оси ординат — тонус препаратов, в % от сократительной реакции на норадреналин. # Амплитуда расслабления аорты на АХ при применении ингибиторов достоверно отличается от амплитуды расслабления аорты на АХ в физиологическом растворе,  $p < 0.05$ ; \* Амплитуда расслабления верхней брыжеечной артерии (ВБА) на АХ при применении ингибиторов достоверно отличается от амплитуды расслабления ВБА на АХ в физиологическом растворе,  $p < 0.05$ ; & Амплитуда расслабления аорты достоверно отличается от амплитуды расслабления ВБА,  $p < 0.05$ .

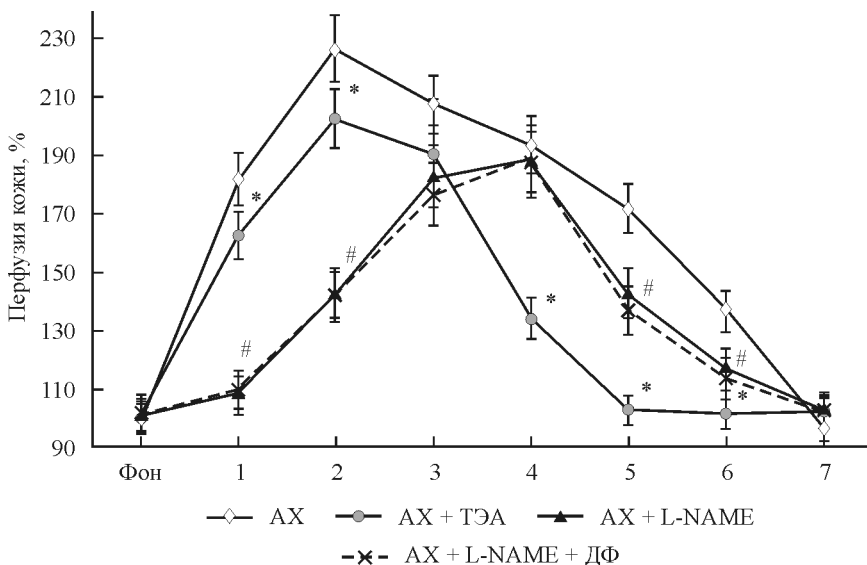


Рис. 3. Динамика перфузии кожи на протяжении 7 мин после ионофореза ацетилхолина (АХ) и АХ после предварительного ионофореза ТЭА (АХ+ТЭА), АХ после предварительного ионофореза L-NAME (АХ+L-NAME), АХ после предварительного ионофореза L-NAME+диклофенак (АХ+L-NAME+ДФ).

По оси абсцисс — время после ионофореза АХ, по оси ординат — перфузия кожи, в % от величины перфузии в покое. \* Перфузия на АХ на фоне ТЭА достоверно отличается от перфузии на АХ,  $p < 0.05$ ; # Перфузия на АХ на фоне L-NAME достоверно отличается от перфузии на АХ,  $p < 0.05$ .

ТЭА был противоположным — уменьшение амплитуды расслабления препаратов аорты на АХ на фоне ТЭА составило  $26.4 \pm 3.1\%$ , а препаратов верхней брыжеечной артерии —  $46.9 \pm 4.7\%$ . Применение диклофенака сопровождалось умеренным снижением АХ-опосредованного расслабления сосудистых сегментов: аорты — на  $18.3 \pm 2.9\%$ , верхней брыжеечной артерии — на  $16.2 \pm 2.0\%$ .

Применение комбинации ингибиторов ТЭА+L-NAME приводило к выраженному уменьшению релаксации препаратов аорты и верхней брыжеечной артерии на АХ на  $66.3 \pm 5.8\%$  и  $65.1 \pm 5.4\%$  соответственно. Эффекты комбинации ингибиторов L-NAME+диклофенак в обоих сосудах были более выраженными по сравнению с действием L-NAME. Ингибиторный эффект комбинации ТЭА + диклофенак также был более выраженным в обоих сосудах по сравнению с эффектом ТЭА. Одновременное применение 3 ингибиторов приводило к самому значительному снижению амплитуды АХ-индуцируемой релаксации в обоих препаратах.

В серии исследований перфузии кожи при действии АХ было зарегистрировано выраженное увеличение кожного кровотока после ионофореза АХ (на 2-й минуте — на  $127.3 \pm 11.4\%$  по сравнению с исходной перфузией). К 7-й минуте после ионофореза АХ кровоток восстанавливался до исходной величины. Предварительный ионофорез ТЭА или L-NNA приводил к уменьшению АХ-индуцированной гиперемии кожи. Ионофорез двух ингибиторов (L-NAME+диклофенак) оказывал на АХ-индуцируемое увеличение кровотока в коже такой же эффект, как и одного L-NAME (рис. 3). Таким образом, блокада синтеза NO и блокада синтеза EDHF сопровождалась снижением ацетилхолин-индуцированной вазодилатации, причем достоверной разницы в амплитуде снижения уровня кровотока в этих исследованиях не наблюдалось. В то же время, блокада синтеза

оксида азота сопровождалась «выключением» начальной стадии АХ-индуцированной гиперемии кожи, блокада EDHF — напротив — конечной части 7-минутной реакции на АХ (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эндотелий представляет собой слой плоских клеток, выстилающих все кровеносные сосуды и непосредственно контактирующих с сосудистыми гладкомышечными клетками. Эндотелиальные клетки играют критическую роль в поддержании функций сердечно-сосудистой системы, выделяя вазорелаксирующие и вазоконстрикторные факторы и регулируя таким образом артериальное давление и кровоток [25, 30]. К настоящему времени хорошо известно, что стимуляция эндотелиальных клеток нейротрансмиттерами, гормонами, веществами, полученными из тромбоцитов и напряжением сдвига вызывает высвобождение вазоконстрикторов и вазодилаторов в соответствии с конкретными условиями функционирования клеток. Установлено, что эндотелий продуцирует несколько типов вазодилаторов, включая NO, PGI<sub>2</sub> и EDHF [14, 16]. Каждый вазодилатор индуцирует расслабление сосудистых гладкомышечных клеток посредством активации собственного сигнального механизма [14, 15]. Анализ данных литературы показывает, что роль различных вазодилаторов (NO, PGI<sub>2</sub> и EDHF) в разных сосудистых регионах у разных видов животных довольно сильно отличается [5, 21].

Среди эндотелиальных факторов вазодилатации наиболее изучены NO и простаглицлин. Эндотелиальный NO диффундирует в сосудистые гладкомышечные клетки, где он активирует гуанилатциклазу и путь релаксации NO — цГМФ. Простаглицлин активирует аденилатциклазу и релаксационный путь PGI<sub>2</sub>-цАМФ [19, 29]. Классическая EDHF-опосредованная эндотелий-зависимая вазодилатация зависит от эндотелия и нечувствительна к комбинации ингибиторов NO-синтазы и циклооксигеназы [25]. Кандидатами в EDHF являются эпоксиэйкозатриеновая кислота (метаболит эпоксигеназы цитохрома P450), пероксид водорода, K<sup>+</sup>, вышедший из эндотелиальных клеток, натрийуретический пептид С-типа, СО и H<sub>2</sub>S, [7, 25]. Вне зависимости от химической природы EDHF, конечным результатом его действия является открывание Ca<sup>2+</sup>-активируемых K<sup>+</sup>-каналов и гиперполяризация мембраны сосудистых гладкомышечных клеток, что приводит к закрытию потенциалчувствительных Ca<sup>2+</sup>-каналов, расслаблению гладкомышечных клеток и вазодилатации.

В ряде работ показано, что в крупных артериях основным вазодилатором, продуцируемым эндотелием, является NO, в то время как в мелких вазодилатацию опосредует главным образом EDHF [14, 26]. В то же время при исследовании *ex vivo* эндотелийзависимой дилатации в мезентериальных артериях мышей было установлено, что роль NO и EDHF в релаксации сосудистых гладкомышечных клеток примерно одинакова [24]. В нашем исследовании при изучении *in vitro* эндотелийзависимой дилатации в аорте крыс было установлено, что на долю NO-сигнального пути приходится 53.7 ± 4.2 % от дилататорной реакции на АХ в физиологическом растворе, а EDHF-опосредуемый путь обеспечивал 26.4 ± ± 3.1 % АХ-индуцируемой вазодилатации. В верхней брыжеечной артерии, имеющей диаметр около 200 мкм (артерия среднего калибра), ответы на АХ на фоне ингибиторов существенно отличались от таковых в аорте. NO обеспечивал меньшую часть АХ-индуцируемой вазодилатации (29.4 ± 3.6 %), а на долю EDHF-сигнального пути приходилось 46.9 ± 4.1 %. Изучение *in vivo* изменений кровотока в коже крыс при ионофорезе АХ показало, что в АХ-индуцируемой вазодилатации кожных сосудов, которые можно отнести к сосудам микроциркуляторного русла, принимают участие как NO-, так и EDHF-опосредованные механизмы. Уменьшение АХ-стимулируемого прироста кровотока в коже на фоне действия L-NNA было максимальным на 1—2-й мин после ионофореза АХ, а ТЭА оказывал мак-

симальный ингибирующий эффект на 4—6-й мин. Ранее похожие результаты были получены нами при исследовании АХ-индуцируемой гиперемии в коже здоровых добровольцев [3].

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что NO принимает участие в АХ-индуцируемой дилатации как крупных (аорта — сосуд коллаторного типа) и средних (верхняя брыжеечная артерия — артерия мышечного типа среднего диаметра) артерий, так и в сосудах микроциркуляторного русла. Вклад NO в АХ-индуцируемую дилатацию этих сосудов различен: он максимален в крупных сосудах и уменьшается в сосудах среднего диаметра и сосудах микроциркуляторного русла кожи. EDHF-опосредованный механизм дилатации при действии АХ также принимает участие в реализации дилаторного ответа во всех типов сосудов. В аорте EDHF-опосредованный механизм обеспечивает небольшую долю АХ-индуцируемой вазодилатации, в артериях среднего калибра и сосудах микроциркуляторного русла на долю этого механизма приходится большая часть дилатации, вызванной АХ.

При анализе полученных данных нельзя оставить без внимания тот факт, что применение различных комбинаций ингибиторов приводило к получению данных, довольно сильно отличающихся от результатов, зарегистрированных при действии ингибиторов по отдельности. Так, в аорте ингибирование дилатации ТЭА (т. е. выключение EDHF-опосредованного сигнального пути) приводило к уменьшению дилаторного эффекта АХ на  $26.4 \pm 3.1$  %, а при применении комбинации ингибиторов L-NAME+диклофенак дилатация составила  $45.8 \pm 4.2$  % от величины АХ-индуцируемой дилатации в физиологическом растворе. Значительные различия были выявлены также при исследовании верхней брыжеечной артерии. Ингибирование EDHF-сигнального пути ТЭА (при применении только этого блокатора) уменьшало дилатацию в этом сосуде на  $46.9 \pm 4.1$  %. В то же время на фоне комбинации ингибиторов L-NAME+диклофенак величина дилатации, вызванной АХ (которая, исходя из теоретических представлений, могла быть опосредована только EDHF), составила  $59.4 \pm 4.8$  % от величины АХ-индуцируемой вазодилатации в физиологическом растворе.

Подобные различия эффектов ингибиторов вазорелаксации при применении их по одному или в комбинации по два-три, по нашему мнению, могут объясняться влиянием одних вазодилататоров на продукцию или эффект других. Так, ранее при исследовании коронарной микроциркуляции у собак было показано, что экзогенный NO ингибирует продукцию или действие EDHF [21]. Также было установлено, что у крыс линии Спрэг—Дуули как эндогенный, так и экзогенный NO значительно снижают величину EDHF-опосредованной депрессорной реакции [17]. Авторы этих работ полагают, что NO ослабляет EDHF-опосредованную релаксацию путем ингибирования активности эпоксигеназы цитохрома P450. Примерно такие же данные были получены при изучении эндотелий-зависимой вазодилатации в сонных артериях кролика и коронарных артериях морской свинки [4].

В то же время H. Shimokawa и S. Godo полагают, что в крупных сосудах NO выполняет функцию классического вазодилататора, реализующего свой эффект через активацию растворимой гуанилатциклазы, а в мелких резистивных сосудах eNOS является элементом супероксид-генераторной системы, которая вызывает опосредуемую EDH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> релаксацию [28]. Также было установлено, что NO оказывает прямое ингибирующее действие на активность цистатинин-γ-лиазы *in vitro* [20]. Учитывая, что цистатинин-γ-лиаза представляет собой биосинтетический фермент H<sub>2</sub>S, который предположительно является одним из EDH-факторов в мелких брыжеечных артериях [32], вполне возможно, что этот механизм также участвует в отрицательной обратной связи NO на EDHF-опосредованное расслабление сосудистых гладкомышечных клеток. В ряде публикаций высказывается мнение о том, что во многих типах сосудов EDH функционирует как компенсаторная сосудорасширяющая система. Ее роль существенно возрастает в



случаях угнетения синтеза NO или снижения его биодоступности [27]. С учетом этих данных можно объяснить расхождения, полученные нами при исследовании АХ-индуцируемой вазодилатации в аорте и верхней брыжеечной артерии при применении ингибиторов сигнальных путей по одному или в различных комбинациях. В частности, различия в амплитудах вазодилатации, полученные при применении ТЭА или при использовании комбинации ингибиторов: L-NAME+ +диклофенак, можно объяснить ингибирующим эффектом продуцируемого эндотелием NO на синтез EDHF.

Второе «несоответствие» полученных данных теоретически рассчитанным, выявленное при изучении АХ-индуцируемой дилатации в аорте и верхней брыжеечной артерии, заключается в том, что несмотря на применение комбинации ингибиторов: L-NAME + ТЭА +диклофенак, АХ все-таки приводил к дилатации этих сосудов. В аорте дилатация при применении АХ на фоне действия 3 ингибиторов составила  $14.6 \pm 2.1$  %, а в верхней брыжеечной артерии —  $31.3 \pm 2.9$  % от величины АХ-индуцируемой вазодилатации в физиологическом растворе. Мы полагаем, что вазодилатация, зарегистрированная в этих сосудах при действии АХ на фоне комбинации 3 ингибиторов, реализуется через продуцируемый эндотелием при действии АХ EDHF, который приводит к открыванию не только  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов большой проводимости, блокируемых ТЭА [18, 33], но и  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов средней и малой проводимости, которые ТЭА не блокируются [11, 16]. Роль последних в АХ-индуцируемой вазодилатации была убедительно продемонстрирована при исследовании артерий мозга [13] и брыжеечных артерий крыс [6], а также других артерий, как правило небольшого диаметра [12].

Таким образом, в процессе исследования АХ-индуцируемой вазодилатации у крыс линии Вистар—Киото установлено, что в крупных и средних артериях дилатация опосредована NO, EDHF и  $PGI_2$ . В крупных сосудах (аорте) преобладает NO-опосредуемый механизм дилатации, в артериях среднего калибра (верхней брыжеечной артерии) — EDHF-опосредованный механизм. В микроциркуляторном русле кожи АХ-индуцируемая вазодилатация опосредуется NO и EDHF, простагландин-опосредуемый путь дилатации не выявлен. Во всех исследованных сосудах в процесс дилатации, вызываемый АХ, вовлекаются  $Ca^{2+}$ -активируемые  $K^+$ -каналы большой проводимости.

Работа проведена на животных из биocolлекции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Лобов Г. И., Панькова М. Н. Транспорт лимфы по лимфатическим узлам: механизмы регуляции. Рос. физиол журн. им. И. М. Сеченова. 98(11) :1350—1361. 2012.
- [2] Малахова З. Л., Васина Е. Ю., Воробьев Е. А., Нестерович И. И., Власов Т. Д. Неинвазивный метод исследования эндотелиального гиперполяризующего фактора в клинике. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 48(4) : 70—75. 2013.
- [3] Малахова З. Л., Васина Е. Ю., Власов Т. Д. Эндотелий-зависимая вазодилатация сосудов кожи здорового человека: оксид азота или гиперполяризующий фактор? Рос. физиол. журн. И. М. Сеченова. 103(8) : 930—939. 2017.
- [4] Bauersachs J., Popp R., Hecker M., Sauer E., Fleming I., Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation*. 94(12) : 3341—3347. 1996.
- [5] Brandes R. P., Schmitz-Winnenthal F. H., Félétou M., Gödecke A., Huang P. L., Vanhoutte P. M., Fleming I., Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:9747—9752. 2000.

[6] *Dora K. A., Gallagher N. T., McNeish A., Garland C. J.* Modulation of endothelial cell KCa3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. *Circ. Res.* 102(10):1247—1255. 2008.

[7] *Edwards G., Dora K. A., Gardener M. J., Garland C. J., Weston A. H.* K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 396(6708) : 269—272. 1998.

[8] *Félétou M., Vanhoutte P. M.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26(6) : 1215—1225. 2006.

[9] *Félétou M., Vanhoutte P. M.* EDHF: an update. *Clin. Sci. (Lond).* 117 : 139—155. 2009.

[10] *Frandsen U., Bangsbo J., Langberg H., Saltin B., Hellsten Y.* Inhibition of nitric oxide synthesis by systemic NG-monomethyl- L-arginine administration in humans: effects on interstitial adenosine, prostacyclin and potassium concentrations in resting and contracting skeletal muscle. *J. Vasc. Res.* 37:297—302. 2000.

[11] *Garland C. J., Hiley C. R., Dora K. A.* EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br. J. Pharmacol.* 164(3):839—852. 2011.

[12] *Garland C. J., Dora K. A.* EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf).* 219(1):152—161. 2017.

[13] *Hannah R. M., Dunn K. M., Bonev A. D., Nelson M. T.* Endothelial SK(Ca) and IK(Ca) channels regulate brain parenchymal arteriolar diameter and cortical cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 31(5):1175—1186. 2011.

[14] *Harrison D. G., Cai H.* Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production. *Cardiol. Clin.* 21(3) : 289—302. 2003.

[15] *Hurjui L., Serban I. L., Oprisa C., Tucaliuc E. S., Hogaş M. M., Tucaliuc D., Hurjui I., Luca V., Serban D. N.* The importance of EDHF in endothelium-dependent relaxation increases distally in mesenteric arteries depending upon the contracting agent. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 115(1):168—170. 2011.

[16] *Kang K. T.* Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol. Res.* 30(3):141—148. 2014.

[17] *Kobuchi S., Miura K., Iwao H., Ayajiki K.* Nitric oxide modulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor in agonist-induced depressor responses in anesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 762 : 26—34. 2015.

[18] *Lorenzo S., Minson C. T.* Human cutaneous reactive hyperaemia: role of BKCa channels and sensory nerves. *J. Physiol.* 585: 295—303. 2007.

[19] *Mitchell J. A., Ali F., Bailey L., Moreno L., Harrington L. S.* Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp. Physiol.* 93(1) : 141—147. 2008.

[20] *Mustafa A. K., Sikka G., Gazi S. K., Steppan J., Jung S. M., Bhunia A. K., Barodka V. M., Gazi F. K., Barrow R. K., Wang R., Amzel L. M., Berkowitz D. E., Snyder S. H.* Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res.* 109:1259—1268. 2011.

[21] *Nishikawa Y., Stepp D. W., Chilian W. M.* Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279(2): H459—H465. 2000.

[22] *Penny W. F., Rockman H., Long J., Bhargava V., Carrigan K., Ibriham A., Shabetai R., Ross J. jr., Peterson K. L.* Heterogeneity of vasomotor response to acetylcholine along the human coronary artery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 25(5) : 1046—1055. 1995.

[23] *Plane E., Garland C. J.* Differential effects of acetylcholine, nitric oxide and levromakalim on smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit basilar artery. *Br. J. Pharmacol.* 110(2): 651—656. 1993.

[24] *Scotland R. S., Chauhan S., Vallance P. J., Ahluwalia A.* An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Hypertension.* 38(4):833—839. 2001.

[25] *Scotland R. S., Madhani M., Chauhan S., Moncada S., Andresen J., Nilsson H., Hobbs A. J., Ahluwalia A.* Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation.* 111(6):796—803. 2005.

[26] *Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K., Owada M. K., Nakaike R., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nagao T., Egashira K., Fujishima M., Takeshita A.* The importance of the hyperpolarizing

mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28 : 703—711. 1996.

[27] *Shimokawa H.* Williams Harvey Lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities—from bench to bedside. *Eur. Heart J.* 35(45): 3180—3193. 2014.

[28] *Shimokawa H., Godo S.* Diverse Functions of Endothelial NO Synthases System: NO and EDH. *Cardiovasc. Pharmacol.* 67(5) : 361—366. 2016.

[29] *Skogastierna C., Luksha L., Kublickiene K., Eliasson E., Rane A., Ekstrom L.* Beneficial vasoactive endothelial effects of fluvastatin: focus on prostacyclin and nitric oxide. *Heart Vessels.* 26(6):628—636. 2011.

[30] *Sun D., Huang A., Koller A., Kaley G.* Endothelial K(ca) channels mediate flow-dependent dilation of arterioles of skeletal muscle and mesentery. *Microvasc. Res.* 61(2):179—186. 2001.

[31] *Takaki A., Morikawa K., Tsutsui M., Murayama Y., Tekes E., Yamagishi H., Ohashi J., Yada T., Yanagihara N., Shimokawa H.* Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J. Exp. Med.* 205(9) : 2053—2063. 2008.

[32] *Tang G., Yang G., Jiang B., Ju Y., Wu L., Wang R.* H<sub>2</sub>S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Antioxid. Redox Signal.* 19 : 1634—1646. 2013.

[33] *Tseng H. H., Vong C. T., Leung G. P., Seto S. W., Kwan Y. W., Lee S. M., Hoi M. P.* Calycosin and Formononetin Induce Endothelium-Dependent Vasodilation by the Activation of Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels (BKCa). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2016:527—531. 2016.

[34] *Yashiro Y., Ohashi T.* Flow- and agonist-mediated nitric oxide- and prostaglandin-dependent dilation in spinal arteries. *Am. J. Physiol.* 273(5 Pt2): H2217—H2223. 1997.

Поступила 10 I 2018