

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 612.172.1:611.018.74:546.172.6

**КОЗЛОВСКИЙ**  
**Валерий Иванович**

**ГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭНДОТЕЛИЙ-ЗАВИСИМОЙ  
РЕГУЛЯЦИИ КРОНАРНОГО КРОВОТОКА**

**Автореферат**  
диссертации на соискание учёной степени  
доктора биологических наук

по специальности 03.03.01 – физиология

Минск, 2015

Работа выполнена в УО «Гродненский государственный медицинский университет» и в Ягеллонском университете г. Кракова (Польша).

Научный консультант:	<b>Зинчук Виктор Владимирович</b> доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет»
Официальные оппоненты:	<b>Лобанок Леонид Михайлович</b> доктор медицинских наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор кафедры нормальной физиологии УО «Белорусский государственный медицинский университет»
	<b>Сидоров Александр Викторович</b> доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных УО «Белорусский государственный университет»
	<b>Мойсеёнок Андрей Георгиевич</b> доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор, главный научный сотрудник ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси»
Оппонирующая организация:	УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 24 апреля 2015 года в 11<sup>00</sup> на заседании совета по защите диссертаций Д 01.36.01 при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, тел. +375 17 284-18-47, факс +375 17 284-16-30, E-mail: rubakhova@mail.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Автореферат разослан 24 марта 2015 года.

Учёный секретарь  
совета по защите диссертаций,  
кандидат биологических наук, доцент



В. М. Рубахова

Известно, что эндотелий наряду с выполнением барьерной функции играет важнейшую роль в регуляции гомеостаза. Эндотелиальные клетки регулируют сосудистый тонус, гемостаз, ангиогенез, иммунный ответ, миграцию клеток крови в сосудистую стенку, синтез факторов воспаления и их ингибиторов [Triggle C.R., 2012]. Стратегическое местоположение эндотелия предопределяет его сенсорные функции, выражающиеся в восприятии изменений параметров гемодинамики, с другой же стороны, он является клеточным эффектором, реакция которого на действие различных факторов проявляется секрецией целого ряда вазоактивных веществ [Лобанок Л.М., Лукша Л.С., 1999]. Среди продуцируемых эндотелиальными клетками вазоактивных соединений особую роль в регуляции перфузии тканей играют эндотелиальные сосудорасширяющие факторы: монооксид азота (NO), простациклин, а также эндотелиальный гиперполяризирующий фактор /endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)/.

Несмотря на достаточно большое количество сведений литературы, посвящённой регуляторной роли эндотелиальных сосудорасширяющих факторов в коронарном русле, имеющиеся данные о механизмах эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока неполны и противоречивы [Komaru T. et al., 2000; Gryglewski R.J., 2005; Зинчук В.В. и др., 2006; Dobarro D. et al., 2009; Beyer A.M., 2012]. Так, не установлено соотношение вклада NO и простациклина в механизмы эндотелий-зависимых коронарорасширяющих эффектов ацетилхолина и брадикинина. Остаётся открытым вопрос о том, какой тип холинорецепторов отвечает за коронарную вазодилатацию, вызванную ацетилхолином. Данные литературы свидетельствуют о наличии в коронарных сосудах  $M_2$  и  $M_3$  холинорецепторов [Niihashi M. et al., 2000], тем не менее требуется определить значение этих подтипов рецепторов для механизма коронарорасширяющего эффекта ацетилхолина. Полностью не изучены пути инактивации брадикинина в коронарном русле [Dendorfer A. et al., 1999; Skidgel R.A. et al., 2003]. Существенную роль в деградации брадикинина играет ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), однако вклад нейтральной эндопептидазы (НЭП) в инактивацию этого пептида в коронарном русле не исследован. Сравнительная оценка участия АПФ и НЭП в метаболизме брадикинина в эндотелии коронарных сосудов необходима для оценки перспективности применения двойных ингибиторов указанных энзимов (омапатрилат) при нарушении функции коронарного эндотелия.

Эндотелий (в частности, синтезируемый им NO) может участвовать в адренергической регуляции кровоснабжения тканей. Показана возможная

роль NO в механизмах эффектов, опосредованных альфа-2, бета-2 и бета-3 адренорецепторами в некоторых областях сосудистого русла [Chang H.Y., 1997; Trochu J.N. et al., 1999; Figueroa X.F. et al., 2001, 2009]. Тем не менее, не исследован вклад эндотелиального NO в механизмы эффектов, реализуемых через активацию адренорецепторов в коронарных сосудах. В последнее время появились сведения о возможной роли бета-3 [Gosgnach W. et al., 2001] и бета-2 адренорецепторов [Georgesku A. et al., 2005, 2008] в механизме активации эндотелиальной L-аргинин-NO системы бета-адренергическим антагонистом небивололом, но вклад этих подтипов адренорецепторов в коронарорасширяющий эффект небиволола также не изучен.

Регуляторная роль пуринов (аденозина, АДФ, АТФ) в системе кровообращения может реализовываться с участием эндотелиальных сосудорасширяющих факторов, прежде всего NO [You J. et al., 1997; Lynch F.M. et al., 2006; da Silva C.G. et al., 2009; Kedzior K. et al., 2009]. Поэтому возникает необходимость исследовать вклад эндотелиального NO в механизмы действия пуринов в коронарном русле. Кроме того, неясен механизм влияния АТФ на коронарный кровоток. Известно, что эффекты этого соединения могут реализовываться как путём непосредственной активации пуриновых P<sub>2</sub> рецепторов [Corr L. & Burnstock J., 1994; Mercier N. et al., 2012], так и посредством генерации аденозина из АТФ и активации пуриновых P<sub>1</sub> (аденозиновых) рецепторов [Korchazhkina O. et al., 1999].

Учитывая важнейшую роль эндотелия в регуляции коронарного кровотока, его дисфункция является одним из ключевых факторов в развитии патологии коронарных сосудов. Эндотелиальная дисфункция проявляется прежде всего нарушением функционирования эндотелиальной L-аргинин-NO системы [Li H. & Förstermann U., 2013]. Отмечено, что в этих условиях эндотелий-зависимые сосудорасширяющие реакции могут быть сохранены за счёт активации механизмов, опосредованных простагландином [Sun D. et al., 1999; Kamata K. et al., 2006] или EDHF [Ding H. et al., 2000; Goto K. et al., 2012]. Тем не менее, степень и механизм компенсации указанных выше реакций при дефиците эндотелиального NO в коронарном русле не установлены.

Таким образом, механизмы регуляции коронарного кровообращения с участием эндотелиальных сосудорасширяющих факторов исследованы недостаточно. Знание этих механизмов необходимо для понимания физиологических процессов, обеспечивающих адекватную метаболическим потребностям перфузию миокарда. В то же время, учитывая ключевую роль дисфункции эндотелия в развитии патологии коронарных сосудов, изучение механизмов, реализующих участие эндотелиальных сосудорасширяющих

факторов в регуляции коронарного кровотока, позволит разработать новые направления лечения этой патологии. Поэтому изучение роли эндотелий-зависимых механизмов в гуморальной регуляции коронарного кровотока является актуальным, имеет несомненное практическое значение.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с крупными научными программами, темами**

Материалы диссертации получены в рамках совместного проекта Гродненского государственного медицинского университета и Ягеллонского университета г. Кракова (Польша) «In search for pharmacological measures to prevent toxic/pathological alterations in oxidant/antioxidant balance in cardiovascular system», выполненного при поддержке гранта НАТО № 980826, и совместного проекта Гродненского государственного медицинского университета, НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси» и Ягеллонского университета «Выяснение роли системы перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты сердца и функции эндотелия коронарных сосудов в механизмах развития сердечной недостаточности у мышей Tgaq44», выполненного при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б05 МС-073 (№ госрегистрации 20052191 от 01.04.2005, сроки выполнения с 01.04.2005 г. по 31.03.2007).

### **Цель и задачи исследования**

**Целью** исследования явилось установление роли эндотелиальных сосудорасширяющих факторов в гуморальных механизмах регуляции коронарного кровотока, осуществляемых посредством активации холинергических, адренергических, кининергических и пуринергических рецепторов, и выявление особенностей эндотелий-зависимых регуляторных механизмов в коронарном русле в условиях окислительного стресса и дефицита эндотелиального NO.

Для достижения поставленной цели определены следующие **задачи**:

1. Установить роль эндотелиальных сосудорасширяющих факторов в механизмах регуляции коронарного потока изолированного сердца морской свинки и мыши, реализуемых путём активации холинергических рецепторов, определить тип рецепторов, ответственных за данные механизмы.

2. Выяснить участие эндотелиального NO в механизмах регуляции коронарного потока, обусловленных активацией различных подтипов адренергических рецепторов, в изолированном сердце морской свинки и мыши, а также механизмы влияния бета-адренергических антагонистов на коронарный поток.

3. Определить роль эндотелиальных сосудорасширяющих факторов в механизмах регуляции коронарного потока, реализуемых через калликреин-кининовую систему с участием брадикинина и ангиотензина-(1-7), сравнить вклад ангиотензин-превращающего фермента и нейтральной эндопептидазы в инактивацию брадикинина в коронарном русле.

4. Установить вклад сосудорасширяющих факторов эндотелиального происхождения в механизмы влияния пуринов (аденозина и АТФ) на коронарный поток, а также оценить участие пуриновых  $P_1$  и  $P_2$  рецепторов в коронарорасширяющем эффекте АТФ в изолированном сердце морской свинки и мыши.

5. Обосновать роль эндотелиальных сосудорасширяющих факторов в гуморальной регуляции коронарного кровотока при дефиците эндотелиального NO у мышей с «нокаутированным» геном эндотелиальной NO-синтазы.

6. Изучить влияние острого и хронического окислительного стресса на гуморальную регуляцию коронарного кровотока, реализуемую через сосудорасширяющие факторы эндотелиального происхождения.

**Объект исследования:** изолированные сердца и кольца аорты белых морских свинок, белых мышей линии FVB и трансгенных Tgaq\*44, чёрных мышей линии C57BL/6J и с «нокаутированным» геном эндотелиальной NO-синтазы (eNOS-/- мыши). Выбор изолированного сердца морской свинки и мыши в качестве объекта исследования обусловлен тем, что при перфузии сердца в условиях постоянного давления коронарный поток изолированного сердца определяется тонусом коронарных сосудов, поэтому на вышеуказанных моделях можно изучать механизмы регуляции коронарного кровотока, существующие непосредственно в сердце. Исследования на изолированных кольцах аорты проводили для того, чтобы определить, являются ли выявленные эндотелий-зависимые регуляторные механизмы универсальными либо они специфичны для коронарных сосудов.

**Предмет исследования:** механизмы эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока; холинергическая, кининергическая, адренергическая, пуринергическая регуляция коронарного кровотока. Эндотелий-зависимая регуляция коронарного кровотока выбрана в качестве предмета исследования с учётом ключевой роли эндотелия в регуляции кровоснабжения сердца, а также значения эндотелиальной дисфункции для развития патологии коронарного кровообращения. Выбор адренергических и холинергических механизмов в качестве предмета исследования обусловлен тем, что через них осуществляется регуляторное влияние вегетативной нервной системы на коронарный кровоток. Кининергические и пуринергические механизмы

изучены исходя из их ключевой роли в гуморальной регуляции кровоснабжения сердца.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Холинергическая регуляция коронарного кровотока реализуется через  $M_3$  холинорецепторы с вовлечением монооксида азота (в экспериментах на сердце морской свинки) и простаглицина (в экспериментах на сердце мыши). Коронарорасширяющий ответ на ацетилхолин в изолированном сердце мыши включает две фазы: раннюю NO-зависимую и позднюю простаглицлин-зависимую, в которой отмечается увеличение генерации простаглицина. Наряду с ацетилхолином холинергическая регуляция коронарного кровотока осуществляется также метиловым эфиром гамма-бутиробетаина.

2. В адренергической регуляции коронарного кровотока ведущее значение имеют независимые от монооксида азота механизмы. Активация альфа-2 адренорецепторов обуславливает коронарную вазоконстрикцию. Коронарная вазодилатация, опосредованная бета-1/бета-2 адренорецепторами, осуществляется с частичным вовлечением монооксида азота (сердце морской свинки) либо без его участия (сердце мыши). Бета-3 адренорецепторы не играют роли в адренергической регуляции коронарного кровотока. Бета-адренергические антагонисты небиволол и карведилол вызывают NO-зависимую коронарную вазодилатацию, которая реализуется без участия адренергических механизмов.

3. Коронарная вазодилатация, вызванная брадикинином, в изолированном сердце реализуется через NO без вовлечения простаглицина и опосредована кининовыми  $B_2$  рецепторами. Брадикинин обладает менее выраженным в сравнении с ацетилхолином стимулирующим влиянием на генерацию простаглицина. Инактивация брадикинина в коронарном русле осуществляется ангиотензин-превращающим ферментом без участия нейтральной эндопептидазы. В кининергической регуляции коронарного кровотока также играет роль ангиотензин-(1-7), который вызывает NO- и кинин-зависимую коронарную вазодилатацию.

4. Эндотелиальный NO участвует в механизмах сосудорасширяющего действия пуринов (аденозина и АТФ) в коронарном русле изолированного сердца морской свинки и мыши. Коронарорасширяющее действие АТФ в сердце вышеуказанных видов животных реализуется через пуриновые  $P_1$  (аденозиновые) рецепторы, в сердце мыши в этот эффект вовлечены также пуриновые  $P_2$  рецепторы.

5. Механизмы эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока функционируют и в условиях дефицита эндотелиального NO у мышцей с «нокаутированным» геном эндотелиальной NO-синтазы. Основную

роль в этих механизмах, в особенности в кининергической регуляции коронарного кровотока, играет NO- и простаглицлин-независимый путь. Холинергическая и пуринергическая регуляция коронарного кровообращения при дефиците эндотелиального NO осуществляется с вовлечением NO неэндотелиального происхождения. Простаглицлин в этих условиях не участвует в механизмах компенсации регуляторной роли эндотелиального NO в коронарном русле.

6. Ксантиноксидазный окислительный стресс в изолированном сердце морской свинки потенцирует коронарорасширяющий эффект брадикинина, увеличивая при этом вклад NO- и простаглицлин-независимого пути в указанный эффект. Хронический окислительный стресс у трансгенных мышцей линии Tgαq\*44 с повышенной экспрессией в сердце α-субъединицы белка Gq способствует увеличению роли аденозиновых рецепторов в коронарорасширяющем эффекте АДФ вследствие активации дефосфорилирования последнего до аденозина, а в период развития декомпенсированной сердечной недостаточности – также усилению коронарорасширяющего эффекта аденозина.

#### **Личный вклад соискателя**

Работа выполнена в УО «Гродненский государственный медицинский университет» и медицинского отделения Ягеллонского университета (г. Краков, Польша).

Постановка цели и задач исследования, выбор методов исследования, анализ полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций осуществлены совместно с научным консультантом (вклад соискателя – 85%). Соискателем выполнен анализ данных литературы по изучаемой проблеме, проведён информационно-патентный поиск. Все исследования на изолированном сердце и изолированных кольцах аорты морской свинки и мышцей выполнены лично автором (вклад соискателя – 100%). Автором совместно с сотрудниками Ягеллонского университета проведено измерение выделения 6-кето-простаглицлина F1α в изолированном сердце мышцей (вклад соискателя – 80%). Автором совместно с сотрудниками кафедры биохимии Гданьского медицинского университета (Гданьск, Польша) Р. Т. Смоленским и Е. М. Сломиньской выполнено измерение содержания аденозина в эффлюенте из изолированного сердца мышцей (вклад соискателя – 75%).

Статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала и написание рукописи диссертации выполнены лично соискателем.

В совместных публикациях с профессорами В. В. Зинчуком, С. Хлопицким, Р. Грыглевским и [2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 22, 23, 27] использована



их консультативная помощь (вклад автора – 80%). В обзорных публикациях [8, 17, 28] использованы данные автора и соавторов (вклад автора – 75%). В публикацию, посвящённую эффектам метилового эфира гамма-бутиробетаина [9], включены, наряду с данными автора (40%), результаты других исследований, выполненных соавторами, кроме того, М. Дамброва и И. Калвиньш оказали консультативную помощь. В статье об особенностях эндотелий-зависимой вазодилатации у eNOS-/- мышей [10] вклад автора составил 70%, профессор С. Хлопицкий оказал консультативную помощь, Б. Лорковска и Л. Дрелихаж осуществляли техническую помощь в экспериментах, А. Гэмбска участвовала в проведении генотипирования eNOS-/- мышей. В публикациях, посвящённых влиянию ксантинооксидазного окислительного стресса на эндотелий-зависимую регуляцию коронарного кровотока [3, 12], принимали участие, наряду с автором (вклад – 70%), профессора С. Хлопицкий и Р. Грыглевский (консультативная поддержка, участие в написании статьи), а также Р. Ольшанецкий (участие в моделировании ксантинооксидазного окислительного стресса). В статье по исследованию роли пуриновых рецепторов в механизме NO-зависимого коронарорасширяющего эффекта небиволола и карведилола [13] профессор С. Хлопицкий участвовал в написании статьи, М. Ломница оказала техническую помощь в проведении экспериментов и оформлении публикации (вклад автора – 80%). В публикацию по антиоксидантным и NO-высвобождающим свойствам бета-адреноблокаторов [14] наряду с данными автора (30%) включены результаты соавторов по антиоксидантной активности бета-адреноблокаторов. В работе, посвящённой механизмам действия ангиотензина-(1-7) в коронарном русле [15], М. Ломница и А. Федорович оказали техническую помощь в проведении экспериментов и оформлении публикации, профессор С. Хлопицкий оказывал консультативную помощь (вклад автора – 80%). Статья о механизмах инактивации брадикинина в коронарном русле [16] подготовлена при консультативной поддержке профессора С. Хлопицкого и технической поддержке М. Ломницкой и А. Якубовского (вклад автора – 80%). В публикациях, посвящённых механизмам коронарорасширяющего действия ацетилхолина [18, 19] наряду с автором (вклад 70%) принимали участие профессор С. Хлопицкий (консультативная помощь), П. Гвездь (техническая помощь в проведении экспериментов) и Л. Дрелихаж (помощь в оформлении публикаций). В статье, посвящённой изучению функции эндотелия в коронарном русле трансгенных мышей линии Tg $\alpha$ q44\* [20], приведены данные, полученные соавторами (вклад автора – 20%). В работе по исследованию эффектов, опосредованных альфа-2 и бета-3

адренорецепторами в изолированной аорте морской свинки [26], наряду с автором (вклад 75%) принимали участие профессор В. В. Зинчук (помощь в анализе результатов исследования и оформлении публикации), П. Б. Станкевич (техническая помощь в организации экспериментов) и Ч. Ф. Юровский (участвовал в проведении экспериментов). Результаты, полученные соавторами научных работ, в диссертацию не включены.

Особую благодарность автор выражает профессору С. Хлопицкому и профессору Р. Грыглевскому (Ягеллонский университет) за помощь в организации проведения исследований на базе Ягеллонского университета и полезные замечания при обсуждении полученных результатов.

### **Апробация результатов диссертации**

Результаты исследования и основные положения диссертации представлены и обсуждены на:

10-м и 16-м международных симпозиумах Ягеллонского медицинского научного центра (Краков, Польша, 2002, 2008); VII научном симпозиуме секции экспериментальной кардиологии Польского кардиологического общества (Гданьск, Польша, 2002); Международной конференции «Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине», посвящённой 100-летию юбилею присуждения Нобелевской премии академику И. П. Павлову (Минск, 2004); Международном семинаре «Signal transduction in cardiovascular system: Workshops in cardiovascular pharmacology» (Варшава, 2004) 4-й международной конференции «Peroxynitrite and reactive oxygen species in biology and medicine» (Констанц, Германия, 2004); международных конференциях «Дисфункция эндотелия» (Витебск, 2004, 2006, 2008, 2010, 2012); Международном съезде Общества по изучению свободных радикалов кислорода «Reactive Oxygen Species and Antioxidants» (Лодзь, Польша, 2005); V Международной конференции в честь профессора Жакоба Парнаса (Киев, 2005); Международном симпозиуме «Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и патологии» (Гродно, 2007); Международной конференции «Лекарственные средства и биологически активные соединения» (Гродно, 2007); юбилейной конференции, посвящённой 50-летию Гродненского государственного медицинского университета (Гродно, 2008); конференции, посвящённой 50-летию кафедры нормальной физиологии Гродненского государственного медицинского университета (Гродно, 2009); конференции, посвящённой 50-летию кафедры патологической физиологии Гродненского государственного медицинского университета (Гродно, 2010), ежегодной научной конференции Гродненского медицинского университета (Гродно, 2011), V Всероссийской с международным участием школы-конференции по

физиологии кровообращения (Москва, 2012), Республиканской научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы» (Гродно, 2012), Международной научной конференции «Фундаментальные науки и современная медицина» (Минск, 2012), III международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы стресса» (Витебск, 2013), Международной научной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Минск, 2013).

### **Опубликованность результатов диссертации**

По теме диссертации опубликованы 54 научные работы, из них 6 – без соавторов, в том числе 1 монография, 1 глава в коллективной монографии, 27 статей в научных журналах, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении учёных степеней и присвоении учёных званий в Республике Беларусь, 13 статей в сборниках и 12 тезисов докладов в материалах съездов и конференций.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 226 страницах, состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, основной части, включающей 7 глав собственных исследований и обсуждения результатов, заключения, библиографического списка, включающего 625 источников (28 на русском и 597 – на иностранных языках) и 54 публикации соискателя.

В диссертации 32 рисунка, 62 таблицы, которые занимают 53 страницы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Исследования выполнены на 296 белых морских свинок обоего пола массой 300–400 г и 271 мыши обоего пола массой 20–25 г, из которых 156 мышей линии C57BL/6J, 24 мыши линии FVB, 59 мышей с «нокаутированным» геном эндотелиальной NO-синтазы (eNOS<sup>-/-</sup> мыши) и 37 мышцах линии Tgαq\*44. Контрольных чёрных мышей линии C57BL/6J использовали для оценки механизмов эндотелий-зависимых коронарорасширяющих реакций в изолированном сердце мыши. eNOS<sup>-/-</sup> мышей использовали для оценки степени и механизмов компенсации эндотелий-зависимой коронарной вазодилатации в условиях дефицита эндотелиального NO. Линия FVB – белые мыши, которые являлись контрольной группой для изучения механизмов действия пуринов в условиях хронического окислительного стресса. Линия Tgαq\*44 – мыши линии FVB, у которых повышена экспрессия в сердце α-субъединицы белка Gq. У этих

животных развивается окислительный стресс (проявляется повышенным содержанием супероксид аниона в сердце) с 2-месячного возраста и хроническая сердечная недостаточность (ХСН) к 14-месячному возрасту.

Все исследования проведены с разрешения комиссий по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета и Ягеллонского университета (Краков, Польша) в соответствии с рекомендациями, изложенными в Европейской конвенции о защите лабораторных животных.

Основной моделью, используемой для оценки механизмов эндотелий-зависимой вазодилатации в коронарном русле, являлось изолированное сердце, перфузируемое по методу Лангендорфа ретроградно через аорту под постоянным перфузионным давлением (60 мм рт. ст. для морской свинки, 100 мм рт. ст. для мыши). Для проведения исследований использовали аппарат Лангендорфа фирмы «Hugo Sachs Electronics». В качестве перфузионного раствора применяли раствор Кребса – Хензеляйта следующего состава (мМ): NaCl 118, CaCl<sub>2</sub> 2,52, MgSO<sub>4</sub> 1,64, NaHCO<sub>3</sub> 24,88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, глюкоза 5,55, натрия пируват 2,0. Перфузионный раствор оксигенировали смесью 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> под давлением, регулируемым с помощью клапана Готлиба. Температуру перфузионного раствора (37°C) поддерживали с помощью термостата. Сердца стимулировали с постоянной частотой (273 импульса в минуту для морской свинки, 400 импульсов в минуту для мыши) двумя платиновыми электродами, введёнными в правое предсердие. Коронарный поток (объём жидкости, протекавший через сердце в минуту) регистрировали с помощью ультразвукового датчика фирмы «Hugo Sachs Electronics». Измеряли также максимальную скорость изменения давления в левом желудочке (dP/dt<sub>max</sub>), по которой оценивали величину сократимости миокарда.

Для выяснения механизмов эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока исследуемые соединения вводили путём инфузий (до стабилизации коронарного потока) с помощью инфузионного насоса, обеспечивающего постоянную скорость введения (в изолированном сердце морской свинки), либо в виде болюсов (в изолированном сердце мыши). В процессе исследования использовали эндотелий-зависимые вазодилататоры: ацетилхолин, брадикинин, аденозин, АТФ, АДФ, ангиотензин-(1-7), метиловый эфир гамма-бутиробетаина. Изучали также эффекты в коронарном русле селективного агониста альфа-2 адренорецепторов клонидина, селективного агониста бета-3 адренорецепторов BRL 37344, неселективного агониста бета-1/бета-2 адренорецепторов изопреналина, бета-адренергических антагонистов: небиволола, карведилола, пропранолола, надолола, метопролола, атенолола, соталола, пиндолола, лабеталола. Для контроля

эндотелий-независимой вазодилатации применяли S-нитрозоаминопеницилламин (SNAP). Для анализа механизмов действия вышеуказанных соединений использовали ряд антагонистов: неселективный ингибитор NO-синтазы L-N<sup>G</sup>-нитро-аргинина метиловый эфир (L-NAME), ингибитор циклооксигеназы индометацин, антагонист мускариновых M<sub>2</sub> холинорецепторов метоктрамин, антагонист мускариновых M<sub>3</sub> холинорецепторов 4-дифенил-ацетокси-N-метил-пиперидин (4-DAMP), неселективный антагонист мускариновых рецепторов атропин, антагонист кининовых B<sub>2</sub> рецепторов икатибант, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента периндоприлат, ингибитор нейтральной эндопептидазы тиорфан, антагонист ангиотензиновых AT<sub>2</sub> рецепторов PD123319, антагонист Mas рецепторов D-аланин-7-ангиотензин-(1-7) (A-779), антагонист альфа-1/альфа-2 адренорецепторов фентоламин, антагонист альфа-1 адренорецепторов празозин, антагонист альфа-2 адренорецепторов йохимбин, антагонист бета-1/бета-2 адренорецепторов надолол, антагонисты бета-3 адренорецепторов L-748337 и цианопиндолол, антагонист серотониновых 5HT<sub>1a</sub> рецепторов NAN-190, антагонист пуриновых P<sub>1</sub> рецепторов 8-сульфофенил-теофиллин (8-СФТ), антагонист пуриновых P<sub>2</sub> рецепторов сурамин. Указанные антагонисты добавляли в перфузионный раствор. В ходе эксперимента исследуемые соединения вводили дважды: до применения соответствующего антагониста (контрольный ответ) и в его присутствии (не ранее 20 мин. после начала перфузирования с антагонистом). Общая продолжительность каждого эксперимента составляла не более 3 ч.

Небиволол (D- и L-изомеры) предоставлен для исследования фармацевтической фирмой «Berlin Chemie» (Германия), карведилол произведен фармацевтической фирмой «SmithKline Beecham» (Великобритания), гамма-бутиробетаин и его метиловый эфир синтезированы I. Kums (Институт органического синтеза, Рига, Латвия), SNAP синтезирован R. Olszanecki (Ягеллонский университет, Краков, Польша); остальные исследованные в работе соединения произведены компанией «Sigma Aldrich» (США).

Индометацин растворяли в 5% растворе гидрокарбоната натрия, небиволол и карведилол – в диметилсульфоксиде, остальные соединения – в физиологическом растворе.

Особенностью проведения экспериментов по изучению влияния окислительного стресса на эндотелий-зависимую коронарную вазодилатацию в изолированном сердце морской свинки явилось то, что в перфузионный раствор Кребса – Хензелята перед началом эксперимента добавляли ксантин в концентрации  $5 \cdot 10^{-3}$  М. После регистрации эндотелий-зависимых коронарорасширяющих ответов на ацетилхолин, брадикинин и АДФ, а также

эндотелий-независимого вазодилаторного ответа на SNAP проводили 30-минутную инфузию ксантиноксидазы (0,01 ЕД/мин). После прекращения инфузии и стабилизации коронарного потока вновь регистрировали вышеуказанные коронарорасширяющие ответы.

Исследование сосудорасширяющих реакций на изолированных кольцах аорты морской свинки и мыши выполняли для определения специфичности механизмов эндотелий-зависимой вазодилатации в коронарных сосудах. Аортальные кольца подвешивали в термостатируемых при температуре 37°C стеклянных камерах, содержащих 5 мл раствора Кребса – Хензеляйта, оксигенированного смесью 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Кольца были соединены с датчиками изометрического растяжения («Harvard Apparatus», США). Вазодилатацию на изолированных аортальных кольцах изучали на фоне субмаксимального сокращения, вызванного фенилэфрином или простагландином F<sub>2α</sub>.

Для оценки влияния изучаемых соединений на выработку простаглицлина клетками коронарного эндотелия определяли скорость выделения его метаболита 6-кето-простаглицдина F<sub>1α</sub> в эффлюенте из изолированного сердца с использованием иммунохимического метода [Gryglewski R.J. et al., 1995]. Для сравнения процессов генерации аденозина из адениловых нуклеотидов в коронарном русле мышей линии Tgαq с хроническим окислительным стрессом и контрольных мышей линии FVB определяли скорость выделения аденозина в эффлюенте из изолированных сердец этих групп мышей в базальных условиях, а также после введения аденозина, АДФ и АТФ, с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [Smolenski R.T. et al., 1993]. Для контроля генотипа eNOS+/+ и eNOS-/- мышей проводили генотипирование методом полимеразной цепной реакции в соответствии с протоколом лаборатории Джексона (Бар Харбор, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы «Статистика». На первом этапе оценивали нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения данные выражали как среднее (M) ± стандартное отклонение (S), если же распределение отличалось от нормального, результаты выражали как медиана (Me) и интерквартильный размах (25-й перцентиль – 75 перцентиль) – (25%; 75%). Поскольку распределение в большинстве групп данных отличалось от нормального, сравнение их проводили с помощью непараметрических методов с использованием критерия Манна-Уитни для несвязанных групп или критерия Вилкоксона для связанных групп. При оценке различия между

группами определяли  $p$  – вероятность нулевой гипотезы при сравнении групп. Статистически достоверным различие между оцениваемыми группами считали при  $p < 0,05$ .

### **Эндотелий-зависимые механизмы в холинергической регуляции коронарного кровотока**

В изолированном сердце морской свинки и мышцы ацетилхолин вызывал дозозависимый прирост коронарного потока при болюсном введении в дозах, начиная с  $3 \cdot 10^{-11}$  М. Коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином в сердце мышцы, состояла из двух фаз: начальной, или ранней вазодилатации, и поздней вазодилатации; средняя продолжительность этих фаз, соответственно, 8 (7;11) с и 220 (169;309) с. Между двумя фазами вазодилатации в большинстве экспериментов наблюдали кратковременную вазоконстрикцию.

В изолированном сердце морской свинки прирост коронарного потока под влиянием ацетилхолина ( $3 \cdot 10^{-10}$  М) снижался в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME ( $10^{-4}$  М) на 56,2% в сравнении с исходной величиной. В сердце мышцы L-NAME также уменьшал вазодилатацию, вызванную ацетилхолином, в большей степени влияя на фазу ранней вазодилатации. Ингибитор циклооксигеназы, ответственной за синтез простаглицина – индометацин ( $5 \cdot 10^{-6}$  М), не влиял на прирост коронарного потока под влиянием ацетилхолина в изолированном сердце морской свинки. В то же время в изолированном сердце мышцы индометацин практически полностью устранял фазу поздней вазодилатации, не изменяя раннюю вазодилатацию. Вазоконстрикторная фаза эффекта ацетилхолина в изолированном сердце мышцы усиливалась в присутствии L-NAME (таблица 1). Ацетилхолин также увеличивал скорость выделения в эфлюэнте из изолированного сердца мышцы метаболита простаглицина 6-кето-простаглицина  $F_{1\alpha}$  с 26,8 (16,0; 36,4) пкг/мин до 167,4 (121,8; 236,7) пкг/мин ( $p < 0,05$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в сердце морской свинки коронарорасширяющий эффект ацетилхолина опосредован NO и не зависит от простаглицина, а в сердце мышцы поздняя фаза этого эффекта реализуется через высвобождение простаглицина. В то же время наличие кратковременной фазы ранней вазодилатации, ингибируемой L-NAME, позволяет заключить, что ацетилхолин стимулирует генерацию NO и в коронарном русле мышцы.

Следующим этапом исследования было установить подтип холинорецепторов, через который ацетилхолин оказывает регулирующее влияние на коронарный поток. Известно, что в сосудистом эндотелии встречаются два подтипа мускариновых холинорецепторов –  $M_2$  и  $M_3$

рецепторы [Niihashi M. et al., 2000]. В связи с этим сравнивали вклад вышеупомянутых рецепторов в механизм коронарной вазодилатации, вызванной ацетилхолином.

Таблица 1 – Влияние L-NAME и индометацина на эффекты ацетилхолина в коронарном русле изолированного сердца морской свинки и мыши; Me (25%; 75%)

Животное		Прирост коронарного потока, вызванный ацетилхолином ( $3 \cdot 10^{-10}$ М)			
		до применения L-NAME	в присутствии L-NAME	до применения индометацина	в присутствии индометацина
Морская свинка		7,3 (3,9;11,6); n = 7	3,20 (2,27;4,90)*; n = 7	6,5 (4,6;7,4); n = 5	6,9 (5,0;7,3); n=5
Мышь	Ранняя вазодилатация	0,77 (0,50;0,78) n=9	0,30 (0,18;0,49)*; n=9	0,51 (0,39;0,92); n=10	0,45 (0,31;0,91); n=10
	Поздняя вазодилатация	0,59 (0,52;0,80); n = 9	0,37 (0,32;0,52)*; n = 9	0,47 (0,42;0,71); n = 10	0,07 (0;0,11)*; n = 10
	Вазоконстрикция	-0,05 (-0,16;0,12); n=6	-0,16 (-0,25; -0,10)*; n=6	-0,17 (-0,24;-0,10); n=8	-0,13 (-0,30;-0,05); n=8

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

В сердце мыши и морской свинки коронарорасширяющий эффект ацетилхолина не изменялся под влиянием антагониста мускариновых  $M_2$  холинорецепторов метоктрамина ( $3 \cdot 10^{-7}$  М) и в то же время практически полностью блокировался антагонистом мускариновых  $M_3$  холинорецепторов 4-дифенилацетокси-N-метилпиперидином (4-DAMP,  $3 \cdot 10^{-8}$  М). Так, прирост коронарного потока, вызванный ацетилхолином в дозе  $3 \cdot 10^{-10}$  М, в экспериментах с метоктрамином составлял в сердце морской свинки 4,11 (3,58; 8,12) мл/мин до применения антагониста и 4,13 (3,46; 7,41) мл/мин в его присутствии ( $p > 0,05$ ); соответствующие показатели в сердце мыши составляли 1,00 (0,70; 1,40) мл/мин и 0,90 (0,84; 0,99) мл/мин ( $p > 0,05$ ). В то же время в экспериментах с 4-DAMP прирост коронарного потока под влиянием ацетилхолина ( $3 \cdot 10^{-10}$  М) в изолированном сердце морской свинки был 4,55 (3,50; 1,68) мл/мин до введения ингибитора и 0,00 (-0,02; 0,02) мл/мин в его присутствии ( $p < 0,05$ ); у мыши вышеуказанные показатели составляли 1,37 (0,73; 1,54) мл/мин и 0,09 (0,07; 0,10) мл/мин ( $p < 0,05$ ), соответственно.



Среди вероятных кандидатов на роль эндогенных лигандов мускариновых рецепторов следует отметить гамма-бутиробетаин и его эфиры, которые, как предполагалось, могут обладать свойствами холинергических агонистов [Dzintare M. et al., 2002]. В связи с этим следующим этапом исследования было изучить влияние гамма-бутиробетаина и его метилового эфира на коронарный поток изолированного сердца морской свинки, а также оценить участие NO и мускариновых холинорецепторов в механизме коронарорасширяющего эффекта данных соединений.

Установлено, что метиловый эфир гамма-бутиробетаина, вводимый в изолированное сердце морской свинки путём инфузии, вызывал дозозависимый прирост коронарного потока в концентрациях  $3 \cdot 10^{-6}$ – $10^{-4}$  М. В то же время гамма-бутиробетаин в этих концентрациях, а также в концентрации  $3 \cdot 10^{-4}$  М не влиял на коронарный поток. Коронарорасширяющий эффект метилового эфира гамма-бутиробетаина значительно уменьшался в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME ( $10^{-4}$  М). Так, прирост коронарного потока, вызванный метиловым эфиром гамма-бутиробетаина в концентрациях  $10^{-5}$  М и  $3 \cdot 10^{-5}$  М, до применения вышеуказанного ингибитора составлял 5,78 (3,84; 6,08) мл/мин и 6,49 (5,12; 7,36) мл/мин, соответственно; в присутствии L-NAME этот показатель составил для указанных концентраций 2,12 (1,45; 2,35) мл/мин ( $p < 0,05$ ) и 2,50 (1,80; 2,86) мл/мин, соответственно ( $p < 0,05$ ). Атропин ( $10^{-6}$  М) полностью устранял коронарорасширяющий эффект метилового эфира гамма-бутиробетаина.

Таким образом, в изолированном сердце морской свинки коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином, опосредована NO и не зависит от простаглицлина, в то же время у мыши отмечается кратковременная ранняя NO-зависимая вазодилатация и более длительная поздняя вазодилатация, реализуемая через простаглицлин. Эффекты ацетилхолина в коронарном русле изолированного сердца морской свинки и мыши опосредованы мускариновыми  $M_3$  холинорецепторами и не зависят от  $M_2$  холинорецепторов. Метиловый эфир гамма-бутиробетаина в изолированном сердце морской свинки вызывает коронарорасширяющий эффект, обусловленный генерацией NO вследствие активации мускариновых холинорецепторов.

### **Эндотелий-зависимые механизмы в адренергической регуляции коронарного кровотока**

Исследованы эффекты агонистов альфа-2 и бета-1/2/3 адренорецепторов в коронарном русле изолированных сердец морской свинки и мыши, а также механизмы влияния на коронарный поток ряда бета-адреноблокаторов.

Селективный агонист альфа-2 адренорецепторов клонидин уменьшал коронарный поток в изолированных сердцах обоих видов животных,

что свидетельствует о коронаросуживающем эффекте и, соответственно, отсутствии роли эндотелиальных сосудорасширяющих факторов в эффектах, опосредованных альфа-2 адренорецепторами, в коронарном русле. С другой стороны, в сердце морской свинки вазоконстрикторный эффект клонидина усиливался в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME ( $10^{-4}$  М). Так, изменение коронарного потока под влиянием клонидина ( $10^{-9}$  М) составило -0,56 (-0,65; -0,44) мл/мин до применения данного антагониста и -1,13 (-1,27; -1,07) мл/мин в его присутствии ( $p < 0,05$ ). Очевидно, коронарная вазодилатация, связанная с активацией эндотелиальных альфа-2 адренорецепторов, маскируется коронаросуживающим эффектом, опосредованным гладкомышечными альфа-2 адренорецепторами.

Селективный агонист бета-3 адренорецепторов BRL 37344 увеличивал коронарный поток в изолированном сердце обоих видов животных, начиная с концентрации  $10^{-6}$  М. Однако этот эффект устранялся антагонистом бета-1/бета-2 адренорецепторов надололом ( $10^{-5}$  М), что свидетельствует об отсутствии функциональной роли бета-3 адренорецепторов в коронарном русле. С другой стороны, BRL 37344 в присутствии надолола вызывал дозозависимое расслабление колец изолированной аорты морской свинки, начиная с концентрации  $10^{-6}$  М. Сосудорасширяющий эффект BRL 37344 уменьшался антагонистами бета-3 адренорецепторов цианопиндололом и L-74833, а также ингибитором NO-синтазы L-NAME. Так, расслабление колец изолированной аорты морской свинки под влиянием BRL 37344 в концентрации  $3 \cdot 10^{-5}$  М составило 24,34 (15,56; 33,30)% от сокращения, вызванного простагландином F $2\alpha$  в контрольных кольцах, в то время как в присутствии цианопиндолола ( $10^{-6}$  М) и L-NAME ( $3 \cdot 10^{-4}$  М) этот показатель был равен 5,73 (3,08; 7,17)% ( $p < 0,05$ ) и 8,76 (3,57; 15,93)% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что, в отличие от коронарных сосудов, в некоторых других областях сосудистого русла бета-3 адренорецепторы имеют значение для регуляции перфузии тканей через эндотелиальную L-аргинин-NO систему. Вероятно, эндотелиальные бета-3 адренорецепторы преобладают в магистральных и не имеют существенного значения в более мелких сосудах.

Кроме того, оценен вклад NO в механизмы эффектов, опосредованных бета-1/бета-2 адренорецепторами, в коронарном русле изолированного сердца морской свинки и мыши. Ингибитор NO-синтазы L-NAME не влиял на коронарорасширяющий эффект неселективного агониста бета-адренорецепторов изопреналина в сердце мыши. У морской свинки статистически достоверное уменьшение сосудорасширяющего ответа на изопренлин под влиянием L-NAME отмечено только для малых концентраций соединения ( $10^{-8}$  М). Так, прирост коронарного потока,

вызванный изопреналином в концентрации  $10^{-8}$  М, был равен 2,59 (2,25;2,91) мл/мин до применения L-NAME и 1,76 (1,31;2,02) мл/мин в его присутствии ( $p < 0,05$ ); аналогичные показатели для концентрации  $10^{-7}$  М составили 6,95 (5,64;7,80) мл/мин и 5,34 (4,18;5,63) мл/мин ( $p > 0,05$ ). Эти результаты указывают на решающую роль NO-независимых механизмов в коронарной вазодилатации, опосредованной бета-1/бета-2 адренорецепторами.

Исследованы также эффекты ряда бета-адренергических антагонистов в коронарном русле изолированного сердца морской свинки. Небиволол и карведилол вызывали дозозависимый прирост коронарного потока, начиная с концентрации  $10^{-6}$  М. Ещё один из исследованных бета-адреноблокаторов пропранолол увеличивал коронарный поток изолированного сердца морской свинки в относительно высоких концентрациях ( $10^{-5}$  М и выше). Остальные бета-адреноблокаторы (надолол, атенолол, метопролол, пиндолол, соталол, лабеталол) не вызывали увеличения коронарного потока в изолированном сердце морской свинки. Коронарная вазодилатация, индуцированная небивололом и карведилолом, а также пропранололом, уменьшалась при ингибировании NO-синтазы L-NAME. В то же время ингибитор циклооксигеназы индометацин ( $5 \cdot 10^{-6}$  М), антагонист бета-1/бета-2 адренорецепторов надолол ( $10^{-5}$  М), антагонист альфа-адренорецепторов фентоламин ( $10^{-5}$  М) не влияли на коронарорасширяющий эффект небиволола и карведилола, что позволяет исключить вклад простаглицина, а также различных подтипов адренорецепторов в механизмах активации эндотелиальной L-аргинин-NO системы данными бета-адренергическими антагонистами.

Таким образом, роль NO в адренергической регуляции коронарного кровотока не является определяющей, так как активация альфа-2 адренорецепторов ведёт к коронарной вазоконстрикции, возбуждение бета-1/бета-2 адренорецепторов способствует NO-независимой коронарной вазодилатации, а эффектов, реализуемых через бета-3 адренорецепторы, в коронарном русле не выявлено. Бета-адренергические антагонисты третьей генерации небиволол и карведилол, а также неселективный бета-адреноблокатор пропранолол (в высоких концентрациях) обладают NO-зависимым коронарорасширяющим действием в изолированном сердце морской свинки, причём этот эффект не обусловлен взаимодействием с адренорецепторами.

### **Эндотелий-зависимые механизмы в кининергической регуляции коронарного кровотока**

В изолированном сердце обоих видов животных брадикинин вызывал прирост коронарного потока. Ингибитор NO-синтазы L-NAME уменьшал

коронарорасширяющий эффект брадикинина в сердце обоих видов животных. В изолированном сердце морской свинки прирост коронарного потока, вызванный брадикинином в дозе  $3 \cdot 10^{-12}$  М, до применения L-NAME составлял 7,1 (3,9; 9,3) мл/мин, а в присутствии последнего – 2,2 (1,5; 3,7) мл/мин ( $p < 0,05$ ). Аналогичные показатели в сердце мыши для дозы брадикинина  $10^{-9}$  М составили 2,20 (1,50; 2,80) мл/мин и 0,80 (0,40; 1,10) мл/мин, соответственно ( $p < 0,05$ ). С другой стороны, ингибитор циклооксигеназы индометацин у обоих видов животных не оказывал существенного влияния на коронарную вазодилатацию, вызванную брадикинином. В то же время отмечено увеличение выделения метаболита простаглицина б-кето-простаглицина  $F_{1\alpha}$  в изолированном сердце мыши под влиянием брадикинина ( $10^{-9}$  М) в 2,34 раза. Коронарорасширяющий эффект брадикинина полностью блокировался антагонистом кининовых  $B_2$  рецепторов икатибантом ( $10^{-7}$  М) в изолированном сердце морской свинки и мыши.

Показано также, что в изолированном сердце морской свинки ингибитор ангиотензин-превращающего фермента периндоприлат ( $10^{-6}$  М) потенцировал коронарную вазодилатацию, вызванную брадикинином (таблица 2). С другой стороны, этот ингибитор блокировал коронарную вазоконстрикцию, вызванную ангиотензином I, не влияя на коронаросуживающий эффект ангиотензина II. Так, изменение коронарного потока под влиянием ангиотензина I ( $10^{-10}$  М) составило -3,9 (-5,1; -3,1) мл/мин до применения периндоприлата и -0,22 (-0,67; -0,02) мл/мин в его присутствии ( $p < 0,05$ ); соответствующие показатели для ангиотензина II были -4,4 (-4,9; -3,9) мл/мин и -5,7 (-6,3; -3,9) мл/мин ( $p > 0,05$ ), что подтверждает ингибирование периндоприлатом в концентрации  $10^{-6}$  М ангиотензин-превращающего фермента.

Ингибитор нейтральной эндопептидазы тиорфан в концентрации  $10^{-6}$  М не изменял прирост коронарного потока, вызванный брадикинином. В более высокой концентрации ( $10^{-5}$  М) указанный ингибитор усиливал коронарную вазодилатацию, вызванную брадикинином, однако, как известно, в этой концентрации тиорфан также ингибирует ангиотензин-превращающий фермент [Miyamoto A. et al., 2002]. С другой стороны, в присутствии периндоприлата ( $10^{-6}$  М) добавление тиорфана в концентрации  $10^{-5}$  М не приводило к дальнейшему усилению коронарной вазодилатации, вызванной брадикинином. Это свидетельствует об отсутствии роли нейтральной эндопептидазы в инактивации брадикинина в коронарных сосудах.

Оценены также механизмы влияния на коронарный поток изолированного сердца морской свинки ангиотензина-(1-7) – эндогенного пептида, являющегося одним из компонентов ренин-ангиотензиновой

системы. Предполагается, что ангиотензин-(1-7) вызывает NO-зависимый сосудорасширяющий эффект, механизм которого связан с активацией калликреин-кининовой системы [Ren Y. et al., 2002]. Указанный эффект может реализовываться через ангиотензиновые AT<sub>2</sub> рецепторы [Heitsch H. et al., 2001] либо через так называемые Mas-рецепторы (рецепторы, ассоциированные с онкогеном Mas) [Bayorh M.A. et al., 2002].

Таблица 2 – Влияние ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента и нейтральной эндопептидазы на коронарную вазодилатацию, вызванную брадикинином, в изолированном сердце морской свинки; Me (25%; 75%)

Ингибитор	Прирост коронарного потока, вызванный брадикинином (мл/мин)					
	без ингибитора			в присутствии ингибитора		
	3·10 <sup>-13</sup> М	10 <sup>-12</sup> М	3·10 <sup>-12</sup> М	3·10 <sup>-13</sup> М	10 <sup>-12</sup> М	3·10 <sup>-12</sup> М
Периндоприлат (10 <sup>-6</sup> М)	0,7 (0,4;1,2); n=13	5,5 (3,2;6,8); n=14	10,3 (8,6;11,2); n=9	1,4 (1,0;3,4)*; n=13	8,3 (5,5;10,0)*; n=14	11,9 (8,6;16,2); n=9
Тиорфан (10 <sup>-6</sup> М)	1,6 (1,2;2,3); n=5	4,4 (2,8;6,0); n=8	8,9 (8,1;10,6); n=8	1,2 (1,0;1,5); n=5	3,1 (2,0;4,6); n=8	8,3 (6,6;10,8); n=8
Тиорфан (10 <sup>-5</sup> М)	1,1 (0,9;1,6); n=5	2,9 (1,5;4,5); n=7	8,1 (7,3;9,3); n=6	2,2 (1,7;2,6); n=5	4,5 (3,5;6,6); n=7	10,3 (9,4;10,5); n=6
Тиорфан (10 <sup>-5</sup> М) и периндоприлат (10 <sup>-6</sup> М)	2,4 (1,4;3,8); n=8	10,2 (8,4;11,7); n=8	14,2 (13,9;15,5); n=6	2,5 (1,6;4,7); n=8	9,9 (7,2;12,2); n=8	14,6 (12,8;15,1); n=6

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

В изолированном сердце морской свинки ангиотензин-(1-7) вызвал прирост коронарного потока, начиная с 3·10<sup>-10</sup> М. Этот эффект уменьшался ингибитором NO-синтазы L-NAME. Так, увеличение коронарного потока, вызванное ангиотензином-(1-7) в дозе 10<sup>-8</sup> М, составило 9,77 (8,08; 12,21) мл/мин до применения L-NAME и 1,72 (0,84; 3,50) мл/мин в присутствии последнего (p<0,05). Коронарорасширяющий эффект ангиотензина-(1-7) устранялся антагонистом кининовых В<sub>2</sub> рецепторов икатибантом (10<sup>-7</sup> М). С другой стороны, коронарная вазодилатация, индуцированная ангиотензином-(1-7), не изменялась антагонистом ангиотензиновых AT<sub>2</sub> рецепторов PD123319 (10<sup>-6</sup> М) и антагонистом Mas-рецепторов A-779 (10<sup>-6</sup> М).

Таким образом, в изолированном сердце морской свинки и мышцы брадикинин оказывает коронарорасширяющий эффект, опосредованный NO и кининовыми  $B_2$  рецепторами. Основным ферментом, ответственным за инактивацию брадикинина в коронарном русле изолированного сердца морской свинки, является ангиотензин-превращающий фермент; нейтральная эндопептидаза не имеет значения для деградации брадикинина. Ангиотензин-(1-7) вызывает коронарную вазодилатацию, реализуемую с участием NO и кининовых  $B_2$  рецепторов в изолированном сердце морской свинки.

### **Эндотелий-зависимые механизмы в пуриnergической регуляции коронарного кровотока**

Учитывая противоречивые данные об участии эндотелиальных сосудорасширяющих факторов в механизмах регуляторного влияния аденозина и других пуринов на кровоток в различных органах и тканях [Keef D. et al., 1992; Hein T.W. et al., 1999; Lynch F.M. et al., 2006; Kedzior K. et al., 2009], был исследован вклад NO в эффекты аденозина и АТФ в коронарном русле изолированного сердца морской свинки и мышцы. У животных обоих видов аденозин и АТФ вызывали прирост коронарного потока, который значительно уменьшался в условиях ингибирования NO-синтазы L-NAME. Так, в сердце морской свинки увеличение коронарного потока, вызванное аденозином в концентрациях  $3 \cdot 10^{-7}$  М,  $10^{-6}$  М и  $3 \cdot 10^{-6}$  М в присутствии L-NAME, составляло 41,5%, 38,9% и 66,2% от исходной величины, соответственно. Прирост коронарного потока, индуцированный АТФ в тех же концентрациях, в условиях ингибирования NO-синтазы L-NAME был равен 22,7%, 33,2% и 23,1% от контроля, соответственно. С другой стороны, коронарорасширяющий эффект высоких концентраций аденозина и АТФ ( $10^{-5}$  М) существенно не изменялся L-NAME (таблица 3).

В изолированном сердце мышцы L-NAME уменьшал прирост коронарного потока, вызванный аденозином ( $10^{-9}$  М), с 2,77 (2,08; 3,12) мл/мин до 1,20 (0,66; 1,77) мл/мин ( $p < 0,05$ ); соответствующие показатели для АТФ составили 2,67 (2,33; 2,80) мл/мин и 1,76 (1,27; 1,79) мл/мин, соответственно ( $p < 0,05$ ).

На следующем этапе исследовано участие основных подтипов пуриновых рецепторов –  $P_1$  и  $P_2$  рецепторов – в механизмах коронарной вазодилатации, вызванной пуринами. Известно, что аденозин является лигандом  $P_1$  рецепторов, а АТФ – лигандом  $P_2$  рецепторов [Ralevic V. et Burnstock G., 1991]. Однако АТФ может подвергаться дефосфорилированию с образованием аденозина и таким образом реализовывать свое влияние через  $P_1$  рецепторы [Korchazhkina O. et al., 1999]. Установлено, что

у животных обоих видов коронарорасширяющий эффект аденозина ингибировался антагонистом пуриновых  $P_1$  рецепторов 8-сульфофенилтеофиллином (8-СФТ). Коронарная вазодилатация, вызванная АТФ, значительно уменьшалась 8-СФТ ( $10^{-5}$  М) и не изменялась антагонистом  $P_2$  рецепторов сурамином ( $10^{-5}$  М) в изолированном сердце морской свинки. Так, 8-СФТ уменьшал прирост коронарного потока, вызванный АТФ ( $10^{-6}$  М), с 5,32 (3,52; 6,69) мл/мин до 1,29 (0,98; 2,03) мл/мин ( $p < 0,05$ ). На изолированных кольцах аорты сосудорасширяющий эффект АТФ, напротив, уменьшался сурамином: при концентрации АТФ  $10^{-6}$  М расслабление колец составило 44,4 (28,4; 57,9)% в контроле и 16,7 (2,2; 20,0)% в присутствии сурамина ( $p < 0,05$ ). В изолированном сердце мыши 8-СФТ также уменьшал прирост коронарного потока, вызванный АТФ, однако в меньшей степени, чем в сердце морской свинки: с  $2,08 \pm 0,30$  мл/мин до  $1,30 \pm 0,35$  мл/мин ( $p < 0,05$ ). Сурамин в сердце мыши также ослаблял коронарорасширяющий эффект АТФ: прирост коронарного потока был равен 2,09 (1,94; 2,28) мл/мин до применения антагониста и 1,32 (1,10; 1,57) мл/мин в присутствии последнего ( $p < 0,05$ ). Эти результаты свидетельствуют о том, что в коронарном русле существуют механизмы, ответственные за быструю генерацию аденозина из АТФ, причём эти механизмы выражены не во всех областях сосудистого русла.

Таблица 3 – Влияние L-NAME на прирост коронарного потока, вызванный аденозином и АТФ в изолированном сердце морской свинки; Me (25%; 75%)

Кон- цент- рация, М	Прирост коронарного потока (мл/мин)			
	аденозин		АТФ	
	без L-NAME	в присутствии L-NAME	без L-NAME	в присутствии L-NAME
$3 \cdot 10^{-7}$	11,1 (7,6;15,0); n=4	4,6 (2,6;7,1)*, n=4	1,6 (1,2;1,9), n=4	0,4 (0,3;0,9)*, n=4
$10^{-6}$	13,8 (10,6;17,3); n=4	5,4 (4,0;8,9)*, n=4	2,1 (1,4;3,8), n=5	0,7 (0,66;1,0)*, n=5
$3 \cdot 10^{-6}$	17,6 (12,5;21,6), n=4	11,6 (10,4;17,0), n=4	7,9 (4,9;9,5), n=5	1,8 (1,2;2,8)*, n=5
$10^{-5}$	21,0 (13,3;21,4), n=5	16,1 (15,5;21,1), n=5	11,9 (7,5;12,0), n=5	5,5 (4,8;5,8), n=5

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

Таким образом, в изолированных сердцах морской свинки и мышцы аденозин, АДФ и АТФ вызывают коронарную вазодилатацию, опосредованную NO. В изолированном сердце морской свинки и мышцы коронарорасширяющий эффект аденозина связан с активацией пуриновых P<sub>1</sub> рецепторов; в то же время коронарная вазодилатация, вызванная АТФ, опосредована P<sub>1</sub> рецепторами в изолированном сердце морской свинки и как P<sub>1</sub>, так и P<sub>2</sub> рецепторами в изолированном сердце мышцы.

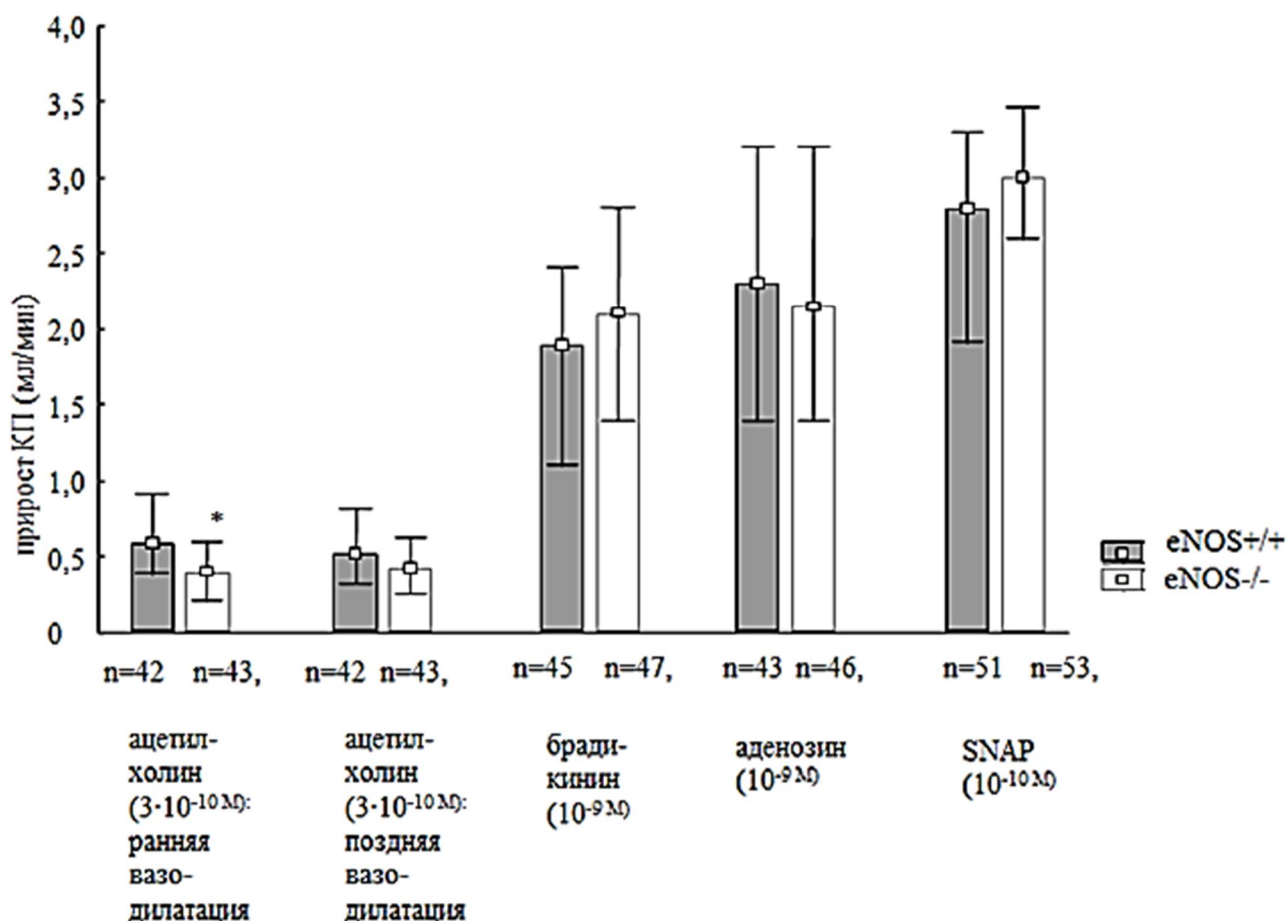
### **Механизмы эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока в условиях окислительного стресса и дефицита эндотелиального NO**

Оценка механизмов эндотелий-зависимой вазодилатации в условиях нарушения функционирования эндотелиальной системы L-аргинин-NO проведена на мышцах с «нокаутированным» геном NO-синтазы (eNOS<sup>-/-</sup> мышцах). Базальный коронарный поток не различался статистически достоверно в изолированных сердцах eNOS<sup>+/+</sup> и eNOS<sup>-/-</sup> мышей, составив 1,32 (0,96; 1,76) мл/мин и 1,12 (0,75; 1,69) мл/мин, соответственно, (p>0,05). Эндотелий-зависимые коронарорасширяющие реакции на брадикинин и аденозин, поздняя фаза эндотелий-зависимого коронарорасширяющего ответа на ацетилхолин, а также эндотелий-независимая коронарная вазодилатация, вызванная S-нитрозоамино-пеницилламином (SNAP), также были примерно одинаковы у eNOS<sup>+/+</sup> и eNOS<sup>-/-</sup> мышей (рисунок). Только ранняя фаза эндотелий-зависимой коронарной вазодилатации, вызванной ацетилхолином, была на 32,8% ниже в группе eNOS<sup>-/-</sup> мышей.

В экспериментах на изолированных кольцах аорты эффекты ацетилхолина были противоположными у eNOS<sup>+/+</sup> и eNOS<sup>-/-</sup> мышей: дозозависимое расслабление колец аорты у eNOS<sup>+/+</sup> и, напротив, сокращение у eNOS<sup>-/-</sup> мышей. В то же время эндотелий-независимая вазодилатация под влиянием SNAP не отличалась в аорте <sup>+/+</sup> и eNOS<sup>-/-</sup> мышей, что свидетельствует о специфичности компенсации эндотелий-зависимой вазодилатации для коронарного русла.

Кроме того, сравнивали реактивную гиперемиию в сердцах eNOS<sup>+/+</sup> и eNOS<sup>-/-</sup> мышей. Показано, что пик реактивной гиперемии (максимальный прирост коронарного потока) не различается у мышей данных групп, независимо от продолжительности окклюзии. В то же время показатель объёма реактивной гиперемии, характеризующий степень восполнения «кислородного долга», в коронарном русле eNOS<sup>+/+</sup> мышей превосходит соответствующий параметр у eNOS<sup>-/-</sup> мышей: так, при 30-секундной окклюзии он был равен 0,699 (0,496; 0,874) мл у eNOS<sup>+/+</sup> мышей и 0,483 (0,405; 0,573) мл/мин у eNOS<sup>-/-</sup> мышей (p<0,05).





Примечание: данные представлены как Me (25%, 75%); \* – статистически достоверное различие между группами eNOS+/+ и eNOS-/- мышей по критерию Манна – Уитни (p<0,05)

#### Рисунок – Сравнение эндотелий-зависимых и эндотелий-независимых сосудорасширяющих ответов у eNOS+/+ и eNOS-/- мышей

Влияние ингибитора NO-синтазы L-NAME на эндотелий-зависимые коронарорасширяющие реакции различалось у eNOS+/+ и eNOS-/- мышей (таблица 4).

В изолированном сердце контрольных мышей L-NAME уменьшал прирост КП, вызванный ацетилхолином (в большей степени раннюю фазу), брадикинином и аденозином. В сердце eNOS-/- мышей отмечалось лишь незначительное уменьшение ранней фазы сосудорасширяющего ответа на ацетилхолин, а также коронарной вазодилатации, вызванной аденозином. Наряду с этим в сердце eNOS+/+ мышей L-NAME потенцировал вазоконстрикторную фазу ответа на ацетилхолин, не влияя на данную фазу у eNOS-/- мышей. Отмечено также, что ингибирование NO-синтазы в сердце животных обеих групп способствовало снижению пика реактивной гиперемии, вызванной 5-секундной и 15-секундной окклюзией, не изменяя статистически значимо пик реактивной гиперемии, вызванной 30-секундной

окклюзией. С другой стороны, L-NAME уменьшал объем реактивной гиперемии в сердце eNOS+/+ мышей после 15- и 30-секундной окклюзии, но не влиял на этот показатель у eNOS-/- мышей.

Таблица 4 – Влияние L-NAME (5·10<sup>-4</sup> М) на коронарорасширяющие реакции в изолированных сердцах eNOS+/+ и eNOS-/- мышей; Me(25%;75%)

Соединение, доза		Прирост коронарного потока (мл/мин)			
		eNOS+/+ мыши		eNOS-/- мыши	
		без L-NAME	в присутствии L-NAME	без L-NAME	в присутствии L-NAME
ацетил- холин (3·10 <sup>-10</sup> М)	ранняя фаза	0,77 (0,50;0,78); n=9	0,30 (0,18;0,49)*; n=9	0,67 (0,40;0,75); n=12	0,29 (0,19;0,51)*; n=12
	вазокон- стрикция	-0,05 (-0,16;0,12); n=6	-0,16 (-0,25;-0,10)*; n=6	-0,23 (-0,48;-0,08); n=7	-0,25 (-0,32;-0,11); n=7
	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 <sup>-9</sup> 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
аденозин (10 <sup>-9</sup> М)		2,90 (2,30;3,20); n=10	1,20 (0,80;1,80)*; n=10	3,40 (1,70; 3,80); n=10	2,20 (1,80;2,60)*; n=10
SNAP (10 <sup>-10</sup> М)		2,36 (1,75;3,51); n=12	2,66 (2,42;3,97); n=12	2,91 (2,58;3,67); n=12	2,87 (2,54;3,52); n=12

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

При анализе возможной роли простаглицина в компенсации эндотелий-зависимой регуляции коронарного потока в сердце eNOS-/- мышей установлено, что индометацин (3·10<sup>-6</sup> М) блокировал позднюю фазу коронарной вазодилатации, вызванной ацетилхолином, у eNOS+/+ и у eNOS-/- мышей. Остальные коронарорасширяющие ответы не менялись под действием вышеупомянутого ингибитора в сердцах животных обеих групп. Скорость выделения метаболита простаглицина б-кето-простаглицина F<sub>1α</sub> не различалась в сердце eNOS+/+ и eNOS-/- мышей: 25,92 (14,80; 40,85) пкг/мин (n=8) и 23,95 (14,43; 34,78) пкг/мин (n=9), соответственно (p>0,05). Влияние ацетилхолина, брадикинина и аденозина на выделение

6-кето-простагландин  $F_{1\alpha}$  также не различалось в сердце eNOS+/+ и eNOS-/- мышей. Так, после введения ацетилхолина скорость выделения указанного метаболита составляла 167,4 (121,8; 236,7) пкг/мин в сердце eNOS+/+ мышей и 152,3 (129,0; 157,5) пкг/мин у eNOS-/- мышей ( $p>0,05$ ).

Ещё одним возможным механизмом компенсации эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока является эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF). Он обеспечивает эндотелий-зависимую вазодилатацию в условиях ингибирования генерации NO и простагландина [Félétou M. et Vanhoute P.M., 2004]. Базальный коронарный поток в присутствии L-NAME ( $5 \cdot 10^{-4}$  М) и индометацина ( $5 \cdot 10^{-6}$  М) был равен 0,95 (0,91; 1,18) мл/мин ( $n=12$ ) в сердцах eNOS+/+ мышей и 1,25 (1,14; 1,37) мл/мин ( $n=13$ ) в сердцах eNOS-/- мышей ( $p>0,05$ ). Прирост коронарного потока, вызванный брадикинином ( $10^{-9}$  М) в этих же условиях, составил 1,05 (0,57; 1,32) мл/мин у eNOS+/+ мышей и 2,13 (0,48; 2,49) мл/мин у eNOS-/- мышей ( $p<0,05$ ); аналогичные показатели для аденозина ( $10^{-9}$  М) были равны 1,02 (0,76; 1,24) мл/мин и 1,45 (0,94; 1,80) мл/мин, соответственно ( $p>0,05$ ). Эти данные доказывают ключевую роль NO- и простагландин-независимого пути (предположительно, EDHF) в механизмах компенсации эндотелий-зависимой регуляции (в частности, опосредованной кининергическими механизмами) в условиях нарушения функционирования эндотелиальной L-аргинин-NO системы.

Исследовано также влияние ксантиноксидазного окислительного стресса, ведущего к генерации супероксид аниона, в изолированном сердце морской свинки. Инфузия ксантиноксидазы (0,01 ЕД/мин, 30 мин.) в сердце, перфузируемое раствором Кребса, содержащим ксантин ( $5 \cdot 10^{-4}$  М), приводила к потенцированию коронарорасширяющего эффекта брадикинина. Так, прирост коронарного потока, вызванный брадикинином ( $10^{-12}$  М), составил 2,9 (2,1; 4,5) мл/мин до инфузии ксантиноксидазы и 8,5 (5,3; 10,3) мл/мин после неё ( $p<0,05$ ). Потенцирование коронарной вазодилатации, вызванной этим пептидом, сохранялось как минимум в течение часа после введения ксантиноксидазы. В то же время эндотелий-зависимые сосудорасширяющие ответы на ацетилхолин и АДФ незначительно уменьшались под влиянием взаимодействия ксантина и ксантиноксидазы.

В условиях одновременного ингибирования NO-синтазы L-NAME и циклооксигеназы индометацином потенцирование коронарорасширяющего ответа на брадикинин было ещё более выраженным: прирост коронарного потока, вызванный брадикинином ( $10^{-12}$  М), составил 1,56 (1,35; 1,88) мл/мин до инфузии ксантиноксидазы и 6,95 (5,24; 8,66) мл/мин после инфузии ( $p<0,05$ ). Это свидетельствует о ключевой роли NO- и простагландин-независимого пути (предположительно, EDHF) в механизмах компенсации

эндотелий-зависимой вазодилатации в условиях окислительного стресса.

Изучены также механизмы действия пуринов в условиях экспериментальной модели хронического окислительного стресса – у трансгенных мышей с повышенной экспрессией субъединицы  $\alpha$  белка  $G_q$  в кардиомиоцитах (линия Tg $\alpha q^*44$ ). У этих животных в возрасте 14–16 месяцев развивается дилатационная кардиомиопатия [Mende U. et al., 2001]. Уже в возрасте 2-х месяцев у Tg $\alpha q^*44$  мышей отмечено повышенное содержание супероксид аниона в сердце [Drelicharz L. et al., 2008], подтверждая роль окислительного стресса в развитии патологии. В возрасте 14 месяцев у этих животных развивается дисфункция эндотелия.

Показано, что в возрасте 8 месяцев, в стадии компенсации сердечной недостаточности, увеличен вклад аденозиновых рецепторов в механизм коронарорасширяющего действия АДФ в изолированном сердце мышей линии Tg $\alpha q^*44$ . Так, процент ингибирования антагонистом аденозиновых рецепторов 8-СФТ коронарной вазодилатации, вызванной АДФ, составил 52,2 (40,9; 60,4)% в сердце контрольных мышей линии FVB и 68,9 (61,6; 72,8)% у трансгенных мышей ( $p < 0,05$ ). Для 14-месячных животных эти показатели были равны 52,2 (40,9; 60,4)% и 68,9 (61,6; 72,8)%, соответственно ( $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о более выраженных процессах дефосфорилирования адениновых нуклеотидов (прежде всего АДФ) до аденозина. Физиологический смысл этого феномена, во-первых, в увеличении содержания в коронарных сосудах аденозина, обладающего антиишемическими свойствами и участвующего в механизме ишемического preconditionирования [Kitakaze M. et al., 1999], во-вторых, в уменьшении концентрации АДФ, известного своими проагрегантными свойствами [Boulin D.J. et al., 1972], за счёт превращения его в обладающего антиагрегантным действием аденозин. Повышенная генерация аденозина из АДФ доказана увеличением скорости выделения данного соединения в сердце мышей линии Tg $\alpha q^*44$ : этот показатель был равен 76,4 (68,5; 93,3) пкМ/мин у контрольных мышей и 145,4 (115,3; 169,1) мл/мин у трансгенных ( $p < 0,05$ ).

Ещё один компенсаторный механизм, включающийся у данных мышей в возрасте 14 месяцев (стадия декомпенсации) – усиление коронарорасширяющего эффекта аденозина. Так, прирост коронарного потока, вызванный аденозином ( $10^{-9}$  М), в возрасте 14 месяцев, составил 1,86 (1,69; 1,94) мл/мин у контрольных мышей и 2,38 (2,06; 2,45) мл/мин у трансгенных животных ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, в изолированном сердце eNOS-/- мышей базальный коронарный поток, эндотелий-зависимые коронарорасширяющие ответы на брадикинин и аденозин, а также поздняя фаза коронарной вазодилатации,

вызванной ацетилхолином, существенно не отличаются от соответствующих показателей у контрольных eNOS<sup>+/+</sup> мышей. В то же время у eNOS<sup>-/-</sup> мышей снижены ранняя фаза сосудорасширяющей реакции на ацетилхолин, а также объём реактивной гиперемии, обусловленной 15- и 30-секундной окклюзией. В аорте eNOS<sup>-/-</sup>-мышей отсутствует эндотелий-зависимый сосудорасширяющий эффект ацетилхолина, который в аорте eNOS<sup>+/+</sup> мышей опосредован исключительно NO. Основным механизмом компенсации базального коронарного потока и коронарорасширяющих эффектов брадикинина и аденозина – активация NO- и простаглицлин-независимого пути. Наряду с этим в механизме ранней фазы вазодилатации, вызванной ацетилхолином, а также коронарорасширяющего ответа на аденозин (частично) в условиях дефицита эндотелиального NO имеет значение активация других изоформ NOS. Ксантиноксидазный окислительный стресс потенцирует эндотелий-зависимую коронарную вазодилатацию, вызванную брадикинином, и в то же время уменьшает эндотелий-зависимые коронарорасширяющие эффекты ацетилхолина и АДФ в изолированном сердце морской свинки. Механизм потенцирования коронарорасширяющего ответа на брадикинин связан с активацией NO- и простаглицлин-независимого пути. В условиях экспериментальной модели хронического окислительного стресса и сердечной недостаточности у мышей увеличивается вклад аденозиновых рецепторов в механизм коронарной вазодилатации, вызванной экзогенным АДФ, в период компенсации функции сердца, а также усиливается коронарорасширяющий эффект аденозина в период декомпенсации сердечной недостаточности. Эти изменения сопровождаются повышением генерации аденозина из АДФ в сердце.

Таким образом, NO и другие сосудорасширяющие факторы эндотелиального происхождения играют важную роль в механизмах гуморального контроля коронарного кровотока, в частности, в холинергической, кининергической и пуринергической системах регуляции. Эндотелий-зависимые механизмы гуморального управления перфузией сердца также имеют значение в условиях окислительного стресса и дефицита эндотелиального NO. Знание их необходимо как для понимания сущности процессов, развивающихся при патологии сердечно-сосудистого аппарата, так и для поиска новых путей её коррекции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Холинергическая регуляция коронарного кровотока в изолированном сердце морской свинки реализуется через NO, а в сердце мыши – с участием NO и простаглицлина. Коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином ( $3 \cdot 10^{-10}$  М), в изолированном сердце морской свинки уменьшается в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME на 56,2%. Коронарный вазодилататорный ответ на ацетилхолин у мышей состоит из двух фаз: кратковременной NO-зависимой ранней вазодилатации (ингибируется L-NAME на 61,0%) и более длительной поздней вазодилатации, реализуемой через простаглицлин (уменьшается в присутствии ингибитора циклооксигеназы индометацина на 85,1%). В поздней фазе коронарорасширяющего ответа на ацетилхолин в сердце мыши отмечается увеличение выделения в эффуенте из изолированного сердца метаболита простаглицлина б-кето-простаглицлана  $F_{1\alpha}$  в 6,9 раза. Холинергическая регуляция в сердце животных обоих видов реализуется через  $M_3$  холинорецепторы и не зависит от  $M_2$  холинорецепторов, так как коронарорасширяющий ответ на ацетилхолин полностью устраняется антагонистом  $M_3$  холинорецепторов 4-DAMP и существенно не изменяется антагонистом  $M_2$  рецепторов метоктрамином. У морской свинки метиловый эфир гамма-бутиробетаина вызывает NO-зависимую коронарную вазодилатацию, опосредованную мускариновыми рецепторами [10, 19, 20, 26, 40, 52].

2. Агонист альфа-2 адренорецепторов клонидин вызывает коронарную вазоконстрикцию в изолированном сердце морской свинки и мыши. Активация бета-1/бета-2 адренорецепторов ведёт к коронарной вазодилатации в изолированных сердцах морской свинки и мыши; при ингибировании NO-синтазы отмеченный эффект не изменяется у мыши и умеренно (на 32,0% для концентрации изопrenalина  $10^{-7}$  М) уменьшается у морской свинки. Агонист бета-3 адренорецепторов BRL37344 в условиях блокады бета-1/бета-2 адренорецепторов в аорте морской свинки вызывает NO-зависимую вазодилатацию, опосредованную бета-3 адренорецепторами, в то же время в изолированных сердцах морской свинки и мыши указанное соединение не увеличивает коронарный поток, что свидетельствует об отсутствии функциональной роли бета-3 адренорецепторов в коронарном русле. Бета-адренергические антагонисты небиволол и карведилол (в концентрациях  $10^{-6}$  М и выше), а также пропранолол (в концентрациях  $10^{-5}$  М и выше) вызывают NO-зависимую коронарную вазодилатацию в изолированном сердце морской свинки,

причём этот эффект не обусловлен взаимодействием с адренорецепторами. Другие бета-адреноблокаторы (надолол, атенолол, метопролол, пиндолол, соталол) не обладают коронарорасширяющими свойствами [3, 5, 6, 7, 8, 12, 14, 15, 24, 25, 27, 30, 31, 32, 34, 40, 43, 44, 48, 53].

3. В изолированном сердце морской свинки и мыши участие калликреин-кининовой системы в эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока опосредуется NO, так как субмаксимальная коронарная вазодилатация, вызванная брадикинином, уменьшается L-NAME на 69,0% в изолированном сердце морской свинки и на 63,6% – у мыши. Простациклин не принимает участия в механизме коронарорасширяющего эффекта брадикинина, так как последний не ингибируется индометацином. Регулирующее влияние калликреин-кининовой системы на коронарный поток реализуется через кининовые  $B_2$  рецепторы, так как антагонист данных рецепторов икатибант устраняет коронарный вазодилататорный ответ на брадикинин у животных обоих видов. Коронарная вазодилатация, вызванная брадикинином, усиливается ингибитором АПФ периндоприлатом (на 100% и 51,9%, соответственно, для доз брадикинина  $3 \cdot 10^{-13}$  М и  $10^{-12}$  М) и не изменяется ингибиторами нейтральной эндопептидазы тиорфаном и фосфорамидоном. Это свидетельствует о том, что решающая роль в инактивации брадикинина в коронарном русле принадлежит ангиотензин-превращающему ферменту, но не нейтральной эндопептидазе. Кининергическая регуляция коронарного кровотока реализуется также через ангиотензин-(1-7). Прирост коронарного потока, вызванный этим пептидом, уменьшается L-NAME на 68,8% для дозы  $10^{-9}$  М и на 85,3% для дозы  $3 \cdot 10^{-9}$  М и полностью устраняется икатибантом [16, 17, 26, 33, 37, 42].

4. Аденозин и АТФ участвуют в механизмах регуляции коронарного кровотока через эндотелиальный NO в изолированном сердце морской свинки и мыши. Коронарная вазодилатация, вызванная этими соединениями, уменьшается в присутствии L-NAME в сердце животных обоих видов. Пуриновые  $P_1$  (аденозиновые) рецепторы принимают участие в механизме коронарорасширяющего эффекта экзогенного АТФ также у животных обоих видов. Коронарная вазодилатация, вызванная АТФ, снижается в присутствии антагониста  $P_1$  рецепторов 8-сульфофенилтеофиллина на 70,8% в изолированном сердце морской свинки и на 37,5% у мыши. Коронарорасширяющий эффект АТФ в изолированном сердце мыши развивается также с участием  $P_2$  рецепторов, поскольку прирост коронарного потока, вызванный АТФ, уменьшается антагонистом пуриновых  $P_2$  рецепторов сурамином на 36,8%. В то же время в изолированной аорте морской свинки сосудорасширяющий эффект АТФ реализуется через  $P_2$  рецепторы без участия  $P_1$  рецепторов [18, 22, 23, 51].

5. Выявлено отсутствие существенного различия между группами мышей с «нокаутированным» геном эндотелиальной NO-синтазы (eNOS<sup>-/-</sup> мыши) и контрольных животных (eNOS<sup>+/+</sup> мыши) по базальному коронарному потоку, коронарорасширяющим эффектам брадикинина и аденозина, а также поздней фазе коронарной вазодилатации, вызванной ацетилхолином. В то же время у eNOS<sup>-/-</sup> мышей снижены ранняя фаза сосудорасширяющей реакции на ацетилхолин (на 38,5%), а также объём реактивной гиперемии после 30 с окклюзии (на 68,5%). Основным механизмом в компенсации базального коронарного потока и коронарорасширяющего влияния брадикинина и аденозина у мышей является активация NO- и простациклин-независимого пути. С другой стороны, ранняя фаза вазодилатации, вызванной ацетилхолином, а также коронарорасширяющий эффект аденозина реализуются с участием других изоформ NO-синтазы. В аорте eNOS<sup>-/-</sup> мышей эндотелий-зависимая вазодилатация не выявлена, что отражает специфичность вышеуказанных компенсаторных механизмов коронарного русла [11, 28, 36, 39, 46].

6. Окислительный стресс, вызванный окислением ксантина ксантинооксидазой, усиливает эндотелий-зависимую коронарную вазодилатацию, вызванную брадикинином (в 4,3 раза для дозы брадикинина  $3 \cdot 10^{-13}$  М), в то же время умеренно снижает коронарорасширяющие эффекты ацетилхолина и АДФ в изолированном сердце морской свинки. Эндотелий-зависимая вазодилатация в этих условиях обусловлена NO- и простациклин-независимыми механизмами. У мышей линии Tgαq\*44 как экспериментальной модели хронического окислительного стресса и сердечной недостаточности отмечено увеличение вклада аденозиновых рецепторов в механизм коронарной вазодилатации, вызванной экзогенным АДФ (степень ингибирования субмаксимальной коронарорасширяющей реакции на АДФ под действием антагониста аденозиновых рецепторов 8-СФТ составляет в сердце 8-месячных животных 68,9 (61,6; 72,8)% у трансгенных мышей и 52,2 (40,9; 60,4)% у контрольных животных; для соответствующих групп 14-месячного возраста указанные показатели составляют 63,6 (50,5; 71,9)% и 51,4 (43,8; 56,8)%, соответственно). При этом отмечается повышение генерации аденозина из АДФ на 90,3%. Эти изменения предшествуют развитию нарушений сократительной функции сердца и дисфункции коронарного эндотелия. Наряду с этим в период декомпенсации сердечной недостаточности отмечается увеличение коронарорасширяющего эффекта аденозина (на 46,3% в сравнении с контролем) [4, 13, 21, 22, 35, 38, 41, 45, 47, 50].

7. Сосудорасширяющие факторы эндотелиального происхождения участвуют в механизмах холинергической, кининергической и



пуринергической регуляции коронарного кровотока. В частности, во всех указанных механизмах имеет значение NO, а в холинергической регуляции также простаглицлин. Кроме того, во всех вышеупомянутых эндотелий-зависимых механизмах регуляции коронарного кровотока значительную роль играет также NO- и простаглицлин-независимый путь, поскольку ингибиторы синтеза NO и простаглицлина не устраняют полностью коронарорасширяющие эффекты ацетилхолина, брадикинина и пуринов. В то же время адренергическая регуляция коронарного кровотока осуществляется в основном через эндотелий-независимые механизмы [1, 2, 5, 6, 7, 19, 20, 23, 24, 26, 33, 51, 54].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Полученные автором сведения о механизмах эндотелий-зависимых коронарорасширяющих ответов в изолированном сердце вносят существенный вклад в развитие фундаментальных и прикладных исследований в области физиологии системы кровообращения, расширяя методологию научных исследований, посвящённых регуляторной функции коронарного эндотелия. На основе данных о простаглицлин-зависимом характере поздней фазы коронарорасширяющего ответа на ацетилхолин разработан метод оценки простаглицлин-продуцирующей способности эндотелия коронарных сосудов. Соискателем получено положительное решение по заявке № а20110904 «Способ оценки показателя ингибирования коронарорасширяющего ответа на АДФ 8-сульфофенил-теофиллином в изолированном сердце мыши для оценки аденозин-генерирующей способности сердца» на выдачу патента на изобретение Республики Беларусь. Результаты выполненной работы внедрены в научно-исследовательскую работу ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Ягеллонского центра экспериментальной терапии Ягеллонского университета г. Кракова (Польша) (акты внедрения прилагаются).

Выявленные автором новые данные о механизмах эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока создают основу для разработки новых подходов коррекции дисфункции коронарного эндотелия и новых лекарственных средств. Учитывая обоснованную автором настоящего исследования особую роль кининергических механизмов в регуляции коронарного кровотока в условиях дефицита эндотелиального монооксида азота и окислительного стресса, увеличение содержания брадикинина и активация кининовых рецепторов представляются перспективными направлениями лечения патологии коронарных сосудов, сопровождающейся

нарушением функционирования эндотелиальной L-аргинин-NO системы. Исходя из выявленного на модели трансгенных мышей с повышенной экспрессией в сердце  $\alpha$ -субъединицы белка G компенсаторного механизма, формирующегося в условиях хронического окислительного стресса, активация дефосфорилирования АДФ до аденозина представляется перспективным подходом при патологических состояниях, сопровождающихся нарушением прооксидантно-антиоксидантного баланса в коронарных сосудах. Полученные автором новые знания могут быть рекомендованы к использованию в сфере образовательных услуг при подготовке специалистов медико-биологического профиля. Результаты выполненной работы и сделанные на их основе выводы внедрены в учебный процесс по курсу «Физиология человека и животных» на факультете биологии и экологии УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», на кафедрах медико-биологического профиля Ярославского государственного педагогического университета имени К. Д. Ушинского, УО «Белорусский государственный медицинский университет» и УО «Гродненский государственный медицинский университет» (акты внедрения прилагаются).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Монографии

1. **Козловский, В. И.** Механизмы регуляции коронарного потока, опосредованные эндотелиальными сосудорасширяющими факторами / В. И. Козловский. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – 216 с.

### Главы в коллективных монографиях

2. **Козловский, В. И.** NO-зависимые основы фармакологической коррекции нарушений регуляции сосудистого гомеостаза / В. И. Козловский // Дисфункция эндотелия: фундаментальные и клинические аспекты / под ред. В. В. Зинчука. – Гродно, 2006. – С. 84–106.

### Статьи в журналах

3. Chlopicki, S. NO-dependent vasodilation induced by nebivolol in coronary circulation is not mediated by beta-adrenoceptors or by 5-HT<sub>1A</sub> receptors / S. Chlopicki, **V. I. Kozlovski**, R. J. Gryglewski // J. Physiol. Pharmacol. – 2002. – Vol. 53, № 4. – P. 615–624.

4. Olszanecki, R. Paradoxical augmentation of bradykinin-induced vasodilatation by xanthine/xanthineoxidase-derived free radicals in isolated guinea pig heart / R. Olszanecki, **V. I. Kozlovski**, S. Chlopicki, R. J. Gryglewski. // J. Physiol Pharmacol. – 2002. – Vol. 53, № 4. – P. 689–699.

5. **Kozlovski, V. I.** Effects of two beta-3 agonists, CGP 12177A and BRL 37344, on coronary flow and contractility in isolated guinea pig heart / V. I. Kozlovski, S. Chlopicki, R. J. Gryglewski // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2003. – Vol. 41, №5. – P. 706–713.

6. Chlopicki, S. Clonidine-induced coronary vasodilatation in isolated guinea pig heart is not mediated by endothelial alpha2 adrenoceptors / S. Chlopicki, **V. I. Kozlovski**, R. J. Gryglewski // J Physiol. Pharmacol. – 2003. – Vol. 54, № 4. – P. 511–521.

7. **Козловский, В. И.** Эффекты, связанные с возбуждением  $\alpha_2$ -адренорецепторов в коронарном кровообращении изолированного сердца морской свинки / В. И. Козловский, С. Хлопицкий, Р. Е. Грыглевский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета, 2004. – № 1. – С. 10–14.

8. **Козловский, В. И.** Исследование сосудорасширяющих и бета-адреноблокирующих свойств d- и l-небиволола на изолированном сердце и изолированной аорте морской свинки / В. И. Козловский, С. Хлопицкий, Р. Е. Грыглевский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2004. – № 2. – С. 35–39.

9. Максимович, Н. Е. Современные экспериментальные методы оценки морфофункциональных свойств эндотелия сосудов / Н. Е. Максимович, **В. И. Козловский**, Н. А. Максимович // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2004. – № 2. – С. 26–30.

10. Dambrova, M. The methylester of gamma-butyrobetaine, but not gamma-butyrobetaine itself, induces muscarinic receptor-dependent vasodilatation / M. Dambrova, S. Chlopicki, E. Liepinsh, O. Kirjanova, O. Gorshkova, **V. I. Kozlovski**, S. Uhlen, I. Liepina, R. Petrovska, I. Kalvinsh. // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 2004. – Vol. 369, № 5. – P. 533–539.

11. Chlopicki, S. Compensation of endothelium-dependent responses in coronary circulation of eNOS-deficient mice / S. Chlopicki, **V. I. Kozlovski**, B. Lorkowska, L. Drelicharz, A. Gebaska // J Cardiovasc Pharmacol. – 2005. – Vol. 46, № 1. – P. 115–123.

12. **Козловский, В. И.** Исследование механизма коронарорасширяющего эффекта карведилола в изолированном сердце морской свинки / В. И. Козловский, С. Хлопицкий, Р. Е. Грыглевский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2005. – № 1. – С. 56–60.

13. **Kozlovski, V. I.** Free radicals generated by xanthine/xanthine oxidase system augment nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase (COX)-independent component of bradykinin-induced vasodilatation in the isolated guinea pig heart / V. I. Kozlovski, R. Olszanecki, S. Chlopicki // Pharmacol. Rep. – 2006. – Vol. 58, № 3. – P. 405–412.

14. **Kozlovski, V. I.** Nebivolol and carvedilol induce NO-dependent coronary vasodilatation that is unlikely to be mediated by extracellular ATP in the isolated guinea pig heart / V. I. Kozlovski, M. Lomnicka, S. Chlopicki // Pharmacol. Rep. – 2006. – Vol. 58, Suppl. – P. 103–110.

15. Szajerski, P. Radical scavenging and NO-releasing properties of selected beta-adrenoreceptor antagonists / P. Szajerski, J. Zielonka, A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gebicki, **V. I. Kozlovski**, L. Drelicharz, S. Chlopicki // Free Radic. Res. – 2006. – Vol. 40, № 7. – P. 741–752.

16. **Kozlovski, V. I.** On the mechanism of coronary vasodilation induced by angiotensin-(1-7) in the isolated guinea pig heart / V. I. Kozlovski, M. Lomnicka, A. Fedorowicz, S. Chlopicki // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2007. – Vol. 100, № 6. – P. 361–365.

17. **Kozlovski, V. I.** Inhibition of neutral endopeptidase by thiorphan does not modify coronary vascular responses to angiotensin I, angiotensin II and bradykinin in the isolated guinea pig heart / V. I. Kozlovski, M. Lomnicka, A. Jakubowski, S. Chlopicki // Pharmacol. Rep. – 2007. – Vol. 59, № 4. – P. 421–427.

18. **Козловский, В. И.** Роль аденозина в регуляции функций сердечно-сосудистой системы / В. И. Козловский, В. В. Зинчук, П. Б. Станкевич,

С. Хлопицкий // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2007. – № 1. – С. 49–54.

19. Gwóźdź, P. Prostacyclin, but not nitric oxide, is the major mediator of acetylcholine-induced vasodilatation in the isolated mouse heart / P. Gwóźdź, L. Drelicharz, **V. I. Kozlovski**, S. Chlopicki // Pharmacol. Rep. – 2007. – Vol. 59, № 5. – P. 545–552.

20. **Козловский, В. И.** Коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином в изолированном сердце морской свинки и мыши: различный вклад оксида азота и простациклина / В. И. Козловский, П. Гвудзь, Л. Дрелихаж, В. В. Зинчук, С. Хлопицкий // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71, № 3. – С. 11–14.

21. Drelicharz, L. NO and PGI(2) in coronary endothelial dysfunction in transgenic mice with dilated cardiomyopathy / L. Drelicharz, **V. Kozlovski**, T. Skorka, S. Heinze-Paluchowska, A. Jasinski, A. Gebaska, T. Guzik, R. Olszanecki, L. Wojnar, U. Mende, Gabor Csanyi, S. Chlopicki // Basic. Res. Cardiol. – 2008. – Vol. 103, № 5. – P. 417–430.

22. **Козловский, В. И.** Исследование механизмов действия аденозина, АДФ и АТФ в коронарном кровообращении трансгенных мышей с хроническим окислительным стрессом и сердечной недостаточностью / В. И. Козловский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2009. – № 1. – С. 59–61.

23. **Козловский, В. И.** Сравнение механизмов действия аденозина и АТФ в коронарном русле изолированного сердца морской свинки / В. И. Козловский, В. В. Зинчук, С. Хлопицкий // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2009. – № 2. – С. 55–57.

24. **Козловский, В. И.** Исследование роли NO в эффектах агонистов различных подтипов адренорецепторов в коронарных сосудах / В. И. Козловский, В. В. Зинчук, С. Хлопицкий // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 2. – С. 10–13.

25. **Козловский, В. И.** Роль эндотелия в вазодилатации, опосредованной различными подтипами адренорецепторов / В. И. Козловский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2010. – № 1. – С. 32–35.

26. **Козловский, В. И.** Сравнение механизмов эндотелий-зависимых коронарорасширяющих эффектов ацетилхолина и брадикинина в изолированном сердце мыши / В. И. Козловский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2010. – № 1. – С. 36–39.

27. **Козловский, В. И.** Исследование эффектов активации бета-3 и альфа-2 адренорецепторов на модели изолированной аорты морской свинки / В. И. Козловский, В. В. Зинчук, П. Б. Станкевич, Ч. Ф. Юровский // Новости медико-биологических наук. – 2010. – Т. 1, № 1. – С. 9–12.

28. **Козловский, В. И.** Значение NO в механизме реактивной гиперемии в коронарном русле изолированного сердца мыши / В. И. Козловский, В. В. Зинчук // Новости медико-биологических наук. – 2010. Т. 1, № 2. – С. 149–152.

29. **Козловский, В. И.** Роль калликреин-кининовой системы в эндотелий-зависимой регуляции кровоснабжения тканей / В. И. Козловский, В. В. Зинчук, П. Б. Станкевич, С. Хлопицкий // Известия Национальной Академии Наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2013. – № 4. – С. 105–114.

#### **Статьи в научных сборниках**

30. **Козловский, В. И.** Коронарорасширяющий эффект карведилола, опосредованный эндотелиальным оксидом азота / В. И. Козловский, С. Хлопицкий, Р. Е. Грыглевский. // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: труды III международной научно-практической конференции, 18-20 мая 2004 года. – Витебск, 2004. – С. 11–15.

31. **Козловский, В. И.** Коронарорасширяющие свойства пропранолола, опосредованные эндотелиальным оксидом азота / В. И. Козловский, С. Хлопицкий // Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине (к 100-летию юбилею присуждения Нобелевской премии академику И. П. Павлову): труды конференции. – Минск, 2004. – С. 187–188.

32. **Козловский, В. И.** Коронарорасширяющие свойства некоторых бета-адренергических антагонистов, опосредованные оксидом азота / В. И. Козловский, С. Хлопицкий // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: труды IV международной научно-практической конференции, 18–20 мая 2006 г. – Витебск, 2006. – С. 90–93.

33. **Козловский, В. И.** NO-зависимое коронарорасширяющее действие ангиотензина-(1-7) в изолированном сердце морской свинки / В. И. Козловский, С. Хлопицкий // Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и патологии: материалы Международного симпозиума, Гродно, 28–29 сентября 2006 г. / редкол.: И. И. Степура, И. Б. Заводник. – Гродно, 2006. – Ч. 1. – С. 129–135.

34. **Козловский, В. И.** Исследование роли эндотелиальных  $\alpha_2$ - и  $\beta_3$ -адренорецепторов в коронарном русле изолированного сердца морской свинки и мыши / В. И. Козловский, С. Хлопицкий // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: труды V международной научно-практической конференции. – Витебск, 2008. – С. 73–75.

35. **Козловский, В. И.** Увеличение роли аденозиновых рецепторов в механизме действия АДФ в коронарном русле трансгенных мышей с хронической недостаточностью кровообращения / В. И. Козловский, С. Хлопицкий // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические

исследования: труды VI международной научно-практической конференции. – Витебск, 2010. – С. 201–204.

36. **Козловский, В. И.** Базальный коронарный поток и эндотелий-зависимая коронарная вазодилатация у мышей с «нокаутированным» геном NO-синтазы / В. И. Козловский, С. Хлопицкий // Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии: Материалы республиканской конференции с международным участием, Гродно, 14 мая 2010 г. – Гродно, 2010. – С. 72–76.

37. **Козловский, В. И.** Сравнительная оценка роли ангиотензин-превращающего фермента и нейтральной эндопептидазы в инактивации брадикинина в изолированном сердце морской свинки / В. И. Козловский // Актуальные проблемы медицины: материалы ежегодной итоговой научной конференции. – Гродно, 15–16 декабря 2011 г. – Гродно, 2011. – С. 344–347.

38. **Козловский, В. И.** Потенцирование коронарорасширяющего ответа на брадикинин под влиянием ксантинооксидазного окислительного стресса в изолированном сердце морской свинки / В. И. Козловский // Материалы республиканской научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы», Гродно, 15–16 мая 2012 г. – Гродно, ГрГМУ, 2012. – С. 84–87.

39. **Козловский, В. И.** Особенности реактивной гиперемии в коронарном русле мышей с «нокаутированным» геном эндотелиальной NO-синтазы / В. И. Козловский, С. Хлопицкий, В. В. Зинчук // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: Материалы VII Международной научно-практической конференции, Витебск, 24–25 мая 2012 г. – Витебск, УО «ВГУ им. П. М. Машерова», 2012. – С. 176–179.

40. **Козловский, В. И.** Роль эндотелиального NO в механизмах регуляции коронарного кровотока, реализуемой через холинорецепторы и адренорецепторы / В. И. Козловский, В. В. Зинчук // Фундаментальные науки и современная медицина: материалы междунар. конф. (25–26 октября 2012 г., Минск, Беларусь). – Минск, Промбытсервис, 2012. – С. 150–152.

41. **Козловский, В. И.** Влияние окислительного стресса на эндотелий-зависимые коронарорасширяющие эффекты ацетилхолина и брадикинина в изолированном сердце морской свинки / В. И. Козловский, В. В. Зинчук, С. Хлопицкий // Фундаментальные и прикладные проблемы стресса: Материалы III Международной научно-практической конференции, Витебск, 16–17 апреля 2013 г. – Витебск: ВГУ им. П. М. Машерова, 2013. – С. 59–61.

42. **Козловский, В. И.** Сравнение роли простаглицлина в механизме коронарной вазодилатации, вызванной ацетилхолином и брадикинином / В. И. Козловский, В. В. Зинчук, С. Хлопицкий // Фундаментальные науки –

медицине: материалы Междунар. науч. конф. (Минск, 17 мая 2013 г.). В 2 ч. Ч. 1 / Нац. акад. наук Беларуси. Ин-т физиологии; редкол.: И. В. Залуцкий [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2013. – С. 346–349.

#### Тезисы докладов на конференциях

43. **Kozlovski, V. I.** Beta-adrenolytics with endothelium-dependent coronary vasodilator action / V. I. Kozlovski, S. Chlopicki, R. J. Gryglewski // 10-th Symposium of Jagiellonian Medical Research Centre, June 2-nd – 4-th, 2002. – P. 50.

44. **Kozlovski, V. I.** Plejotropowe działanie nebiwololu na środbłonek wieńcowy / V. I. Kozlovski, S. Chlopicki, R. J. Gryglewski // Nowe perspektywy leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego: VII Sympozjum Naukowe Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, 28–30 listopad 2002. – S. 6.

45. Olszanecki, R. Wolne rodniki tlenowe paradoksalnie nasilają rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez bradykininę w modelu izolowanego serca świnki morskiej / R. Olszanecki, **V. I. Kozlovski**, S. Chlopicki, R. J. Gryglewski // Nowe perspektywy leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego: VII Sympozjum Naukowe Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, 28–30 listopad 2002. – S. 6.

46. **Kozlovski, V. I.** Compensation of endothelium-dependent responses in coronary circulation of eNOS-deficient mice / V. I. Kozlovski, B. Lorkowska, L. Drelicharz, S. Chlopicki // Signal transduction in cardiovascular system: Workshops in cardiovascular pharmacology. – 13–16 May 2004, Warsaw. – P. 85.

47. Olszanecki, R. Paradoxical augmentation of bradykinin-induced vasodilatation by xanthine/xanthine oxidase-derived free radicals in isolated guinea pig heart / R. Olszanecki, **V. I. Kozlovski**, S. Chlopicki, R. J. Gryglewski // 4-th International Conference on peroxynitrite and reactive oxygen species in biology and medicine / University of Konstanz, Germany, July 27–31, 2004. – Konstanz, 2004. – P. 104.

48. Szajerski, P. ROS scavenging properties of selected beta-adrenoceptor antagonists / P. Szajerski, J. Zielonka., A. Marcinek, J. Gebicki, **V. I. Kozlovski**, S. Chlopicki // Summer Meeting of Society For Free Radical Research «Reactive Oxygen Species and Antioxidants», Lodz, Poland, 2–5 July 2004. – P. 255.

49. **Kozlovski, V. I.** Nebivolol as a beta-adrenoceptor independent coronary vasodilator: involvement of NO / V. I. Kozlovski, S. Chlopicki // 5-th Parnas Conference. – Kiev, 2005. – P. 61.

50. **Козловский, В. И.** Потенцирование сосудорасширяющей реакции на брадикинин на фоне окислительного стресса, вызванного взаимодействием ксантина и ксантиноксидазы в изолированном сердце морской свинки



/ В. И. Козловский, Р. Ольшанецкий, С. Хлопицкий // Лекарственные средства и биологически активные соединения: материалы международной конференции, посвящённой 40-летию НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродно, 11–12 октября 2007 г. / редкол.: П. С. Пронько, Л. И. Надольник. – Гродно, 2007. – С. 72–73.

51. **Козловский, В. И.** Исследование механизма действия АТФ в коронарном русле изолированного сердца морской свинки / В. И. Козловский // Актуальные вопросы медицины: материалы конференции, посвящённой 50-летию ГрГМУ. – Гродно, 2008. – С. 162.

52. Хлопицкий, С. Сравнение вклада мускариновых  $M_2$  и  $M_3$  рецепторов в коронарную вазодилатацию, вызванную ацетилхолином в изолированном сердце мыши и морской свинки / С. Хлопицкий, **В. И. Козловский** // Актуальные вопросы медицины: материалы конференции, посвящённой 50-летию ГрГМУ. – Гродно, 2008. – С. 366.

53. **Kozlovski, V. I.** Endothelial adrenoceptors in the isolated mouse heart / V. I. Kozlovski, S. Chlopicki // New frontiers in cardiovascular research // 16-th Symposium of Jagellonian Medical Research Center, Krakow, Poland, 5–7 June 2008. – Krakow, 2008. – P. 52.

54. **Козловский, В. И.** Механизмы регуляции коронарного потока изолированного сердца, опосредованные эндотелиальными сосудорасширяющими факторами / В. И. Козловский, С. Хлопицкий, В. В. Зинчук // Физиология кровообращения: V Всероссийская с международным участием школа-конференция. Москва, 31 января – 3 февраля 2012 г. Сборник тезисов. – М.: Макс Пресс, 2012. – С. 77–78.

## РЕЗЮМЕ

**Козловский Валерий Иванович**

### **Гуморальные механизмы эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока**

**Ключевые слова:** эндотелий, коронарный кровоток, монооксид азота (NO), простациклин, холинорецепторы, адренорецепторы, брадикинин, пурины.

**Объекты исследования:** изолированные сердца и аорта морских свинок, белых мышей линии FVB и трансгенных Tgaq\*44, чёрных мышей линии C57BL/6J и с «нокаутированным» геном эндотелиальной NO-синтазы.

**Цель исследования:** установление роли эндотелиальных сосудорасширяющих факторов в гуморальных механизмах регуляции коронарного кровотока, осуществляемых посредством активации холинергических, адренергических, кининергических и пуринергических рецепторов, и выявление особенностей эндотелий-зависимых регуляторных механизмов в коронарном русле в условиях окислительного стресса и дефицита эндотелиального NO.

**Методы исследования:** физиологические, фармакологические, биохимические.

**Использованная аппаратура:** устройство для перфузии изолированного сердца HSE, хроматографические колонки Luna C18, масс-спектрометр LCQ Deca XP.

**Полученные результаты и их новизна.** Установлен вклад простациклина в холинергическую регуляцию коронарного кровотока. Доказана решающая роль ангиотензин-превращающего фермента, но не нейтральной эндопептидазы в инактивации брадикинина в коронарном русле. Выявлено участие ангиотензина-(1-7) в кининергической регуляции коронарного кровотока. Показано отсутствие существенного значения NO в адренергической регуляции коронарного кровотока. Установлены роль NO в коронарорасширяющих эффектах аденозина и АТФ, вклад аденозиновых рецепторов в коронарную вазодилатацию, вызванную АТФ. Показано значение NO- и простациклин-независимых механизмов в коронарном русле при окислительном стрессе и дефиците эндотелиального NO.

**Рекомендации по использованию.** Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научную работу нескольких университетов и научно-исследовательских учреждений. Предложены методы оценки механизмов эндотелий-зависимой регуляции коронарного кровотока, которые могут использоваться в экспериментальной медицине.

**Область применения:** научно-исследовательские учреждения, изучающие физиологию кровообращения, медико-биологические вузы.

## РЭЗІЮМЭ

Казлоўскі Валерый Іванавіч

### Гумаральныя механізмы эндатэлій-залежнай рэгуляцыі каранарнага крывацёку

**Ключавыя словы:** эндатэлій, каранарны крывацёк, монааксід азоту (NO), простацыклін, халінарэцэптары, адрэнэрэцэптары, брадыкінін, пурыны.

**Аб'екты даследавання:** ізаляваныя сэрцы і аорта марскіх свінак, белых мышэй лініі FVB і трансгенных Tgαq\*44, чорных мышэй лініі C57BL/6J і з «накаўтаваным» генам эндатэліяльнай NO-сінтазы.

**Мэта даследавання:** устанаўленне ролі эндатэліяльных сасудапашыральных фактараў у гумаральных механізмах рэгуляцыі каранарнага крывацёку, якія ажыццяўляюцца праз актывацыю халінэргічных, адрэнэргічных, кінінэргічных і пурынэргічных рэцэптараў, і выяўленне асаблівасцяў эндатэлій-залежных рэгуляторных механізмаў у каранарным русле ва ўмовах акісляльнага стрэсу і дэфіцыту эндатэліяльнага NO.

**Метады даследавання:** фізіялагічныя, фармакалагічныя, біяхімічныя.

**Выкарыстаная апаратура:** прыстасаванне для перфузіі ізаляванага сэрца HSE, храматаграфічныя калонкі Luna C18, мас-спектрометр LCQ Deca XP.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Устаноўлены ўклад простацыкліна ў халінэргічную рэгуляцыю каранарнага крывацёку. Даказана рашаючая роля ангіятэнзін-ператвараючага ферменту, але не нейтральнай эндапептыдазы ў інактывацыі брадыкініну ў каранарным русле. Выяўлены ўдзел ангіятэнзіну-(1-7) у кінінэргічнай рэгуляцыі каранарнага крывацёку калікрэін-кінінавай сістэмай. Паказана адсутнасць істотнага значэння эндатэліяльнага NO ў механізмах адрэнэргічнай рэгуляцыі каранарнага крывацёку. Устаноўлены роля NO ў механізме каранарарасшыральных эфектаў адэназіну і АТФ, уклад адэназінавых рэцэптараў у каранарную вазадылатацыю, выкліканую АТФ. Паказана значэнне NO- і простацыклін-незалежных механізмаў у каранарным русле пры акісляльным стрэсе і дэфіцыце эндатэліяльнага NO.

**Рэкамендацыі па выкарыстанню.** Вынікі даследавання ўкаранены ў вучэбны працэс і навуковую працу некалькіх універсітэтаў і навукова-даследчых устаноў. Прапанаваны метады ацэнкі механізмаў эндатэлій-залежнай рэгуляцыі каранарнага крывацёку, якія могуць выкарыстоўвацца ў эксперыментальнай медыцыне.

**Галіна выкарыстання:** навукова-даследчыя ўстановы, якія вивучаюць фізіялогію крывацёку, медыка-біялагічныя ВНУ.

## SUMMARY

**Kozlovskii Valery Ivanovich**

### **Humoral mechanisms of endothelium-dependent regulation of the coronary flow**

**Keywords:** endothelium, coronary flow, nitric oxide (NO), prostacyclin, cholinceptors, adrenoceptors, bradykinin, purines.

**The objects of research:** isolated hearts and aorta of guinea pigs, white mice of FVB line and transgenic Tgαq\*44, black mice of C57BL/6J line and mice with «knocked out» gene of endothelial NO-synthase.

**The aim of research:** establishing of the role of endothelial vasodilating factors in the humoral mechanisms of regulation of the coronary flow implementing through activation of cholinergic, kininergic, adrenergic and purinergic receptors, and revealing of the features of the endothelium-depending regulatory mechanisms in the coronary vascular bed in conditions of oxidative stress and deficiency of endothelial NO.

**The methods of research:** physiological, pharmacological, biochemical.

**Equipment used:** device for perfusion of the isolated heart, chromatographic column Luna C18, mass-spectrometer LCQ Deca XP.

**The results and their novelty.** The contribution of prostacycline to the cholinergic regulation of the coronary flow was defined. The deciding role of angiotensin-converting enzyme but not neutral endopeptidase in inactivation of bradykinin in coronary circulation has been proved. Participation of angiotensin-(1-7) in kininergic regulation of the coronary blood flow has been revealed. Lack of significance of NO for the mechanisms of adrenergic regulation of the coronary flow has been shown. The role of NO in the mechanism of the coronary vasodilator action of adenosine and ATP as well as the contribution of adenosine receptors to the coronary vasodilation induced by ATP were defined. The role of NO- and prostacyclin-independent mechanisms in the coronary vascular bed in conditions of oxidative stress and deficiency of endothelial NO was proven.

**Recommendations for application.** The results have been applied in teaching process and scientific work of several universities and scientific institutios. New methods of assessment of the mechanisms of endothelium-dependent regulation of the coronary flow were proposed. They can be used in experimental medicine.

**A field of use:** research laboratories in physiology of blood circulation, institutes of higher education in biology and medicine.



Научное издание

**КОЗЛОВСКИЙ**  
**Валерий Иванович**

**ГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭНДОТЕЛИЙ-ЗАВИСИМОЙ  
РЕГУЛЯЦИИ КРОНАРНОГО КРОВотоКА**

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
доктора биологических наук

по специальности 03.03.01 – физиология

Подписано в печать 20.03.2015.  
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.  
Гарнитура Таймс. Ризография.  
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,46. Тираж 80 экз. Заказ 30.

Издатель и полиграфическое исполнение  
учреждение образования  
«Гродненский государственный медицинский университет».  
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013.  
Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.