

R interval

Н. М. Яцковская  
А. А. Чиркин

Normal pP

RS

# СТРЕСС И ТОНУС СОСУДОВ

**Н. М. Яцковская**  
**А. А. Чиркин**

# **СТРЕСС И ТОНУС СОСУДОВ**

Монография

Чебоксары  
Издательский дом «Среда»  
2023

УДК 616.1  
ББК 54.10  
Я93

***Рецензенты:***

д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры  
нормальной физиологии УО «Витебский государственный  
медицинский университет»

*Владимир Иванович Кузнецов;*

д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой  
зоологии и ботаники УО «Витебский государственный  
университет им. П.М. Машерова»

*Дмитрий Данилович Жерносеков*

**Я93**     **Стресс и тонус сосудов** : монография / Н. М. Яцковская,  
А. А. Чиркин, под. ред. проф. А. А. Чиркина. – Чебоксары:  
Среда, 2023. – 112 с.

**ISBN 978-5-907561-93-9**

В последнее десятилетие проявилась тенденция к увеличению количества фундаментальных и прикладных исследований в рамках концепции стресса – неспецифической реакции организма на действие различных раздражителей. В этой монографии представлены данные о влиянии окислительного и иммобилизационного стресса на биохимические показатели миокарда, сыворотки крови, а также на вазоконстрикторные и вазодилатационные эффекты перфузируемого фрагмента аорты лабораторных крыс.

Книга предназначена для студентов и научных работников-физиологов, патофизиологов, биохимиков и фармакологов, а также может быть полезной для преподавателей медико-биологических специальностей и учителей средних учебных заведений.

ISBN 978-5-907561-93-9

DOI 10.31483/a-10458

© Яцковская Н. М. Чиркин А. А., 2023

© ИД «Среда», оформление, 2023

## Оглавление

Список сокращений.....	5
Предисловие .....	6
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТОНУСЕ СОСУДОВ.....	11
Глава 2. СОСТОЯНИЕ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ У КРЫС .....	34
Глава 3. ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТОНУС ПЕРФУЗИРУЕМОГО ФРАГМЕНТА АОРТЫ .....	50
3.1. Влияние окислительного стресса, вызванного введением параквата на адренергическую констрикцию изолированного кольца аорты крыс .....	54
3.2. Влияние окислительного стресса, вызванного введением параквата на эндотелийзависимую дилатацию изолированного кольца аорты крыс .....	57
Глава 4. ОСТРЫЙ ИММОБИЛИЗАЦИОННЫЙ СТРЕСС И ТОНУС ПЕРФУЗИРУЕМОГО ФРАГМЕНТА АОРТЫ .....	65
4.1. Эндотелий-зависимая вазодилатация изолированного кольца аорты крыс .....	68
4.2. Влияние S-метилизотиомочевины на изменения эндотелий- зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс .....	71
4.3. Сократительная активность изолированного кольца аорты крыс ....	74
4.4. Влияние S-метилизотиомочевины на изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс ..	77
Глава 5. ХРОНИЧЕСКИЙ ИММОБИЛИЗАЦИОННЫЙ СТРЕСС И ТОНУС ПЕРФУЗИРУЕМОГО ФРАГМЕНТА АОРТЫ.....	85
5.1. Действие хронического иммобилизационного стресса на динамику относительной массы стресс-реагирующих органов .....	87
5.2. Эндотелий-зависимая вазоконстрикция и вазодилатация изолированного кольца аорты крыс .....	88

## Стресс и тонус сосудов

---

5.3. Влияние S-метилизотиомочевины на стресс-индуцированные изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс .....	90
5.4. Сократительная активность изолированного кольца аорты крыс .....	92
5.5. Влияние S-метилизотиомочевины на изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс ...	93

### Список сокращений

- АлАТ** – аланинаминотрансфераза  
**АМК** – активные метаболиты кислорода  
**АсАТ** – аспаратаминотрансфераза  
**Г** – гуанин  
**КФК** – креатинфосфокиназа (креатинкиназа)  
**МК** – мочевая кислота  
**Т** – тимин  
**ОХС** – общий холестерин (холестерол)  
**ТГ** – триглицериды (триацилглицеролы)  
**ХС ЛПВП** – холестерин липопротеинов высокой плотности  
**ХС ЛПНП** – холестерин липопротеинов низкой плотности  
**ЩФ** – щелочная фосфатаза  
**GSH** – восстановленный глутатион  
**NO·** – монооксид азота (радикал)  
**nNOS (NOS-1)** – нейрональная изоформа синтазы оксида азота  
**iNOS (NOS-2)** – индуцибельная изоформа синтазы оксида азота  
**eNOS (NOS-3)** – эндотелиальная изоформа синтазы оксида азота  
**NOX** – NADPH-оксидазы (семейство)  
**MLC** – легкая цепь миозина  
**MLCK** – киназа легкой цепи миозина  
**TPR** – общее периферическое сопротивление  
**SERCA** – Ca<sup>2+</sup>-АТФаза саркоплазматического ретикулула  
**VGCC (VDCC)** – внутриклеточные кальциевые каналы  
**VIP** – кишечинальный вазоактивный пептид  
**VSM** – сосуды гладких мышц

### Предисловие

Под понятием «окислительный стресс» понимают дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами, а в последнее время – нарушение окислительно-восстановительной сигнализации и контроля. Общеизвестно, что окислительный стресс может привести к повреждению клеток и тканей, что играет фундаментальную роль в сосудистой дисфункции. Физиологически активные формы кислорода (АФК), или активные метаболиты кислорода (АМК), контролируют функцию сосудов, модулируя различные окислительно-восстановительные сигнальные пути. При сосудистых заболеваниях окислительный стресс провоцирует эндотелиальную дисфункцию и воспаление, поражая ряд клеток сосудистой стенки [1]. Окислительный стресс связан с патогенезом многих хронических заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, диабет, гиперхолестеринемия и атеросклероз, и является сопутствующим патогенным фактором заболеваний, связанных с ожирением [2]. Кроме того, сосудистый окислительный стресс является ведущей причиной сердечно-сосудистых заболеваний. Повышенный окислительный стресс приводит к вазоконстрикции, ремоделированию сосудов, воспалению и фиброзу [3]. Недостаточная клеточная защита от окислительного стресса была описана как основной фактор развития сосудистых заболеваний [4]. Окислительный стресс также является основной причиной эпигенетических изменений, происходящих при старении [5].

Артериальный эндотелий подвергается различным повреждающим воздействиям, таким как колебательное напряжение сдвига, нарушенный турбулентный поток и окислительный стресс. Основными АМК, образующимися в ответ на несколько раздражителей (гипергликемия, гиперлипидемия, гипертензия), является супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), который быстро соединяется с NO с образованием пероксинитрита, снижая биодоступность NO и приводя к дисфункции эндотелия [6–9]. В ответ эндотелиальные клетки активируются, продуцируют сосудосуживающие агенты (тромбоксан A<sub>2</sub>, эндотелин-1 или простагландин H<sub>2</sub> и др.) и инициируют воспалительную реакцию, что ведет к развитию значимых для населения сосудистых патологий [10]. Дисфункция эндотелия имеет решающее значение в инициации сосудистой дисфункции, приводящей к нескольким патологическим состояниям, включая

макрососудистые (атеросклероз) и микрососудистые заболевания [11; 12]. Ремоделирование сосудов, жесткость, структурные аномалии эластина и повышенный окислительный стресс являются признаками повреждения сосудов при гипертонии [13]. Cahill P.A. и Redmond E.M. в 2016 году опубликовали статью с названием «Сосудистый эндотелий на страже здоровья сосудов» [14]. Многочисленные исследования подтверждают такую точку зрения [15–19]. Однако, и в 2022 году высказываются сомнения о достаточной изученности роли окислительного стресса в развитии представлений о его влиянии на тонус сосудов [20].

В Республике Беларусь, в частности, Витебской школой физиологов, влияние стресса на тонус сосудов интенсивно изучается с конца XX столетия (А.П. Солодков, И.В. Городецкая, А.С. Дорошенко, С.С. Лазуко, С.С. Майорова (Скринауэ), В.И. Шебеко, И.Ю. Щербинин, Н.М. Яцковская и др., 2003–2022 годы) [21–24]. Основными недостаточно изученными вопросами остаются поиск патогенетически важных отличий между действием окислительного и иммобилизационного типов стресса на сосудистый тонус, а также оценка роли индуцибельной изоформы NO-синтазы в изменениях тонуса сосудов.

Целью монографии явилось выявление методом перфузии изолированного кольца аорты крысы соотношения процессов вазоконстрикции и вазодилатации при моделировании окислительного и иммобилизационного стресса.

Эта цель подразумевала решение трех основных задач монографии:

1) методами биохимического анализа оценить особенности обмена веществ при остром и хроническом иммобилизационном стрессе у крыс;

2) исследовать состояние вазоконстрикции и эндотелиальной дилатации при моделировании окислительного стресса у крыс введением параквата;

3) изучить постстрессорные изменения эндотелий-зависимой дилатации и  $\alpha_1$ -адренореактивности изолированного кольца аорты крыс при действии высокоселективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины.

Поиску ответов на эту цель и задачи посвящено основное содержание данной монография.



**Список использованной литературы к предисловию**

1. Sena, C.M. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches / C.M. Sena, A. Leandro, L. Azul [et al.] // *Front Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – 1668. – doi: 10.3389/fphys.2018.01668
2. Bhatti, J.S. Therapeutic strategies for mitochondrial dysfunction and oxidative stress in age-related metabolic disorders / J. S. Bhatti, S.Kumar, M.Vijayan [et al.] // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2017. – Vol. 146. – P. 13–46. – doi: 0.1016/bs.pmbts.2016.12.012
3. Rodriguez-Porcel, M. Studies on Atherosclerosis. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Rodriguez-Porcel M., Chade A.R., Miller J.D. – 2017. – 1st Edn. Berlin: Springer. doi:10.1007/978-1-4899-7693-2
4. Li, H. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis / H. Li, S. Horke, U. Förstermann // *Atherosclerosis.* – 2014. – Vol. 237. – P. 208–219. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001
5. Guillaumet-Adkins, A. Epigenetics and oxidative stress in aging / A. Guillaumet-Adkins, Y.Yañez, M. D. Peris-Diaz [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. – № 9175806. – doi:10.1155/2017/9175806
6. Sena, C.M. Effects of alpha-lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats / C.M. Sena, E. Nunes, T. Louro [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 153. – P. 894–906. – doi: 10.1038/sj.bjp.0707474
7. Sena, C.M. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats / C.M. Sena, P. Matafome, T. Louro [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 163. – P. 424–437. – doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01230
8. Sena, C.M. Endothelial dysfunction. A major mediator of diabetic vascular disease / C.M. Sena, A.M. Pereira, R. Seça // *Biochim. Biophys. Acta* – 2013. – Vol. 1832. – P. 2216–2231. – doi: 10.1016/j.bbadis.2013.08.006
9. Sena, C.M. Adiponectin improves endothelial function in mesenteric arteries of rats fed a high-fat diet: role of perivascular adipose tissue / C.M. Sena, A. Pereira, R.Fernandes [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 174. – P. 3514–3526. doi: 10.1111/bph.13756

10. Campbell, N.R. Using the Global Burden of Disease study to assist development of nation-specific factsheets to promote prevention and control of hypertension and reduction in dietary salt: a resource from the World Hypertension League / N.R. Campbell, D.T. Lackland, L. Lisheng [et al.] // *J. Clin. Hypertens.* – 2015. – Vol. 17. – P. 165–167. doi:10.1111/jch.12479
11. Peng, Z. Endothelial Response to Pathophysiological Stress / Z. Peng, B. Shu, Y. Zhang [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* – 2019. – Vol. 39. – P. e233–e243. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312580>
12. Zhou, N. Rho kinase regulates aortic vascular smooth muscle cell stiffness via actin/SRF/myocardin in hypertension / N. Zhou, J. Lee, S. Stoll [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2017. – Vol. 44. – P. 701–715. – doi 0.1159/000485284
13. Martínez-Revelles, S. Lysyl oxidase induces vascular oxidative stress and contributes to arterial stiffness and abnormal elastin structure in hypertension: role of p38MAPK / S. Martínez-Revelles, A. B. García-Redondo, M. S. Avendaño [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2017. – Vol. 27. – P. 379–397. – doi:10.1089/ars.2016.6642
14. Cahill, P.A. Vascular endothelium – gatekeeper of vessel health / P.A. Cahill, E.M. Redmond // *Atherosclerosis.* – 2016. – Vol. 248. – P. 97–109. – doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007
15. Boulanger, C.M. Endothelium / C.M. Boulanger // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2016. – Vol.36. – P. e26–e31. – doi: 10.1161/ATVBAHA.116.306940
16. Gimbrone, M.A. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis / M.A. Gimbrone, G. García-Cardena // *Circ Res.* – 2016. – Vol. 118. – P. 620–636. – doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
17. Masi, S. Aging modulates the influence of arginase on endothelial dysfunction in obesity / S. Masi, R. Colucci, E. Duranti [et al.] // *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol.* – 2018. – Vol. 38. – P. 2474–2483. – doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311074
18. Dou, H. Role of adipose tissue Endothelial ADAM17 in age-related coronary microvascular dysfunction / H. Dou, A. Feher, A.C.Davila [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2017. – Vol. 37. – P. 1180–1193. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309430

19. Ng, J. Local hemodynamic forces after stenting: implications on restenosis and thrombosis / J. Ng, C.V. Bourantas, R. Torii [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2017. – Vol. 37. – P. 2231–2242. – doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309728

20. Shi, X. Oxidative Stress, Vascular Endothelium, and the Pathology of Neurodegeneration in Retina / X. Shi, P. Li, H. Liu, V. Prokosch // *Antioxidants.* – 2022. – Vol. 11. – P. 543. – doi: 10.3390/antiox11030543

21. Солодков А.П. Эндотелиальные механизмы изменения сосудистого тонуса: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Витебск: ВГМУ, 1998. – 28 с.

22. Майорова С.С. Влияние стресса на функциональную активность ВКса-каналов коронарных сосудов / С.С. Майорова С.С. Лазуко, А.П. Солодков // *Вестник ВГМУ.* – 2007. – Т. 6. №1. – С. 1–10.

23. Солодков А.П. Монооксид азота и функциональная активность кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости коронарных сосудов при ограничении двигательной активности крыс / А.П. Солодков, С.С. Майорова, С.С. Лазуко // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2009. – Т. 95. №7. – С. 736–749.

24. Скринауэ С.С. Влияние тетраэтиламмония на тонус коронарных сосудов в условиях блокады конституциональной и индуцируемой NO-синтазы до и после иммобилизационного стресса / С.С. Скринауэ, С.С. Лазуко // *Вестник фармации.* – 2016. – №3 (73). – С. 77–86.

25. Яцковская Н.М. Изменения относительной массы стресс-реагирующих органов и постстрессорные изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты при хроническом иммобилизационном стрессе у крыс / Н.М. Яцковская // *Новости медико-биологических наук.* – 2022. – Т. 22. №3. – С. 160–161.

## ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТОНУСЕ СОСУДОВ

В связи с бурным развитием знаний о межклеточном и внутриклеточном сигналинге в статье суммированы современные представления о влиянии молекул окислительного стресса на тонус сосудов и развитие артериальной гипертензии. Состояние окислительно-восстановительных систем и биодоступность оксида азота являются ключевыми факторами, контролирующими влияние окислительного стресса на тонус сосудов.

**Введение.** В нейрогуморальной регуляции тонуса кровеносных сосудов важную роль играют эндотелиальные клетки. Эндотелий относится к клеткам мезенхимального происхождения, которые выстилают внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов, образуя границу между циркулирующей кровью или лимфой и стенкой сосуда. Ангиопоэтин-2 совместно с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) обеспечивают пролиферацию и миграцию клеток эндотелия. Вазоконстрикция и вазодилатация, и, следовательно, контроль артериального давления, относятся к важнейшим функциям эндотелия [1,2].

Эндотелиальная дисфункция развивается в ответ на накопление липидов и провоспалительных стимулов. Она характеризуется экспрессией молекул адгезии (E-селектин, VCAM-1 и ICAM-1), активацией факторов транскрипции (AP-1 и NF-κB), повышением экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-1, TNFα и IFNγ). Окисленные липопротеины низкой плотности способны повышать внутриклеточную продукцию и внеклеточную секрецию АТФ, а также митохондриальную продукцию активных метаболитов кислорода (mtROS) и митохондриальной ДНК (mtDNA). АТФ активирует рецептор P2Y<sub>2</sub>R, что приводит к последующей продукции IL-1β посредством модуляции индукции mtROS-mtDNA сигнального пути TLR9-NF-κB [3]. Проатерогенный профиль, экспрессируемый эндотелиальными клетками, способствует накоплению липидов и липопротеинов в интиме. В то же время NF-κB-индуцированная экспрессия деубиквитиназы A20 (TNFAIP3) способствует восстановлению эндотелиального барьера. Сигнальный белок ERK5 также необходим для поддержания нормальной функции эндотелиальных клеток [4–6].

Эндотелий сосудов играет ключевую роль в локальной регуляции тонуса кровеносных сосудов и архитектуры сосудистой стенки за счет высвобождения сосудорасширяющих и вазоконстрикторных веществ, а также факторов с прокоагулянтными, антикоагулянтными, фибринолитическими, антибактериальными свойствами; факторов роста, хемокинов, свободных радикалов и др. Выделенные эндотелиальные релаксирующие факторы, (NO, простагландины и гиперполяризационный фактор эндотелия), а также сосудосуживающие факторы (эндотелин, супероксидный анион-радикал и тромбоксаны), играют важную роль в поддержании и регуляции тонуса и периферического сопротивления сосудов. Нарушение эндотелиальной функции, как следствие снижения выработки/высвобождения или повышенной инактивации вазодилаторов, происходящих из эндотелия, а также взаимодействия NO с ангиотензином, активными метаболитами кислорода (АМК) и окисленными липопротеинами, повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний, например, эндотелиопатий, вызванных избыточной продукцией ангиотензина, перекисным окислением липидов, ишемией/реперфузией или диабетом [7–9].

**Синтез оксида азота и его функции.** Существуют экзогенные (пища, лекарства) и эндогенные источники оксида азота. Экзогенные источники оксида азота превращаются по схеме нитраты→нитриты→оксид азота [10–11]. В клетках млекопитающих известны три изоформы синтазы оксида азота (NOS), которые синтезируют эндогенную метастабильную свободно радикальную молекулу оксида азота (NO·): эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS). Нейрональная (NOS-1) и эндотелиальная изоформы (NOS-3) зависят от кальция и продуцируют низкие уровни этого газа в качестве сигнальной молекулы клетки; индуцибельная изоформа (NOS-2) не зависит от кальция и производит большое количество газа, который может быть цитотоксичным. NOS-3 – это белок, связанный с кавеолами; цитозольные формы фермента неактивны. Кавеолы – небольшие (размером 50–100 нм) колбообразные впячивания плазматической мембраны многих типов клеток, особенно в эндотелиоцитах. В состав кавеол входит ключевой белок – кавеолин, а также большое количество холестерина, сфинголипидов, сайтов связывания сигнальных бел-

ков – G-белков, инозитол-3-фосфата, протеинкиназ. Кавеолы вовлечены в регуляцию мембранных каналов; в клетках эндотелия они задействованы в оценке скорости кровотока, а в гладких мышцах кавеолин Cav1 участвует в оценке растяжения мышц. NOS окисляют гуанидиновую группу L-аргинина в процессе, который потребляется пять электронов и образуется NO, при этом происходит окисление NADPH и восстановление молекулярного кислорода. Трансформация осуществляется в каталитическом сайте фермента, прилегающем к специфическому сайту связывания L-аргинина. Факторы тромбоцитов, напряжение сдвига, ацетилхолин и цитокины стимулируют выработку NO изоформой eNOS. NO является важным регулятором и медиатором многочисленных процессов в нервной, иммунной и сердечно-сосудистой системах. Низкие уровни производства оксида азота обычно связаны с ишемическими повреждениями тканей. Высокое потребление соли снижает выработку NO у больных гипертонической болезнью [13–15].

Благодаря наличию неспаренного электрона на  $2\pi$  орбитали, оксид азота проявляет высокую реакционную способность. NO хорошо растворим в воде и липидах, имеет наиболее высокий по сравнению с другими молекулами коэффициент диффузии, легко и беспрепятственно проникает через клеточные мембраны. Это делает окись азота идеальной сигнальной молекулой для кратковременного аутокринного (внутри клетки) или паракринного (между близко расположенными или соседними клетками) обмена сигналами. Время жизни оксида азота составляет ~ 6–10 сек, после чего он превращается в нитраты и нитриты при участии кислорода и воды. Радиус действия NO в тканях не превышает 500 мкм. Суточная продукция NO одним только эндотелием составляет 1,7 ммоль, а базальная концентрация газа в плазме приближается к 3 нмоль (уровень NO для клеток эндотелия оценивается в 4 пмоль/мин на 1 мг белка). Эндотелий кровеносных сосудов использует оксид азота в качестве сигнала окружающим гладкомышечным клеткам расслабиться, что приводит к вазодилатации и увеличению кровотока. Стандартные фармацевтические препараты нитроглицерин и амилнитрит являются предшественниками оксида азота, который обеспечивает расслабление гладких мышц сосудов, что приводит к расширению артерий и увеличению кровотока. NO может быть также нейротрансмиттером и связан с нейрональной активностью

и различными функциями (например, избеганием обучения); NO частично опосредует цитотоксичность макрофагов в отношении микробов и опухолевых клеток. Оксид азота в клетках млекопитающих вызывает два типа реакций: S-нитрозилирование тиолов и нитрозилирование некоторых металлоферментов. S-нитрозилирование включает (обратимое) превращение тиоловых групп, например, остатков цистеина в белках, с образованием S-нитрозотиолов (RSNO). Это механизм динамической посттрансляционной модификации большинства полипептидов. Нитрозилирование металлических центров, содержащих ионы переходных металлов железа или меди, ведет к образованию нитрозильных комплексов металлов, что нарушает ферментативную активность цитохромов, рибонуклеотидредуктазы, аконитазы и др. Помимо обеспечения нормальных функций, NO участвует в ряде патофизиологических состояний (септический шок, гипертензия, ишемия мозга, нейродегенеративные заболевания и др.) [14–16].

Образованный в клетках эндотелия оксид азота проникает в подэндотелиальные гладкомышечные клетки и активирует гуанилатциклазу, связываясь с гемом. Циклический ГМФ (цГМФ) активирует протеинкиназу G, которая вызывает обратный захват  $Ca^{2+}$  и открытие кальций-активируемых калиевых каналов. Падение концентрации  $Ca^{2+}$  ведет к тому, что киназа легкой цепи миозина (MLCK) не может фосфорилировать молекулу миозина, тем самым приводя к расслаблению клеток гладких мышц. В клетках эукариот выявлены 3 основных типа внутриклеточных рецепторных белков, с которыми взаимодействует цГМФ: цГМФ-зависимые протеинкиназы (протеинкиназы G), цГМФ-регулируемые ионные каналы и цГМФ-регулируемые фосфодиэстеразы [15; 17].

Более четверти века известно о двойственном действии оксида азота: в низких концентрациях NO увеличивает генерацию активных метаболитов кислорода, тогда как более высокие концентрации ослабляют их образование посредством ингибирования активности НАДФН-оксидазы или их удаления [18; 19]. При нормальных физиологических условиях NO оказывает плеiotропное действие в регуляции функций сосудов. Баланс между уровнями супероксидного анион-радикала и высвобожденного NO играет решающую роль в поддержании нормальной функции эндотелия, что определяет тонус сосудов. Однако при патологических состояниях

избыточное образование супероксидного анион-радикала, в основном вырабатываемого НАДФН-оксидазой, стимулирует сужение сосудов и воспаление, что приводит к эндотелиальной дисфункции, главным образом, за счет снижения биодоступности NO и дисбаланса между АМК и антиоксидантной активностью [20]. Но оксид азота обладает и антиоксидантными свойствами благодаря своей способности связывать железо из лабильных пулов железа (LIP), которые могут иметь клеточную (CLIP) или внеклеточную (ECLIP) природу [21].

**Вазоконстрикция** – это сужение кровеносных сосудов в результате сокращения клеток мышечной стенки сосудов (чаще артериол). Механизм, который приводит к сужению сосудов, является следствием повышенной концентрации кальция ( $Ca^{2+}$ ) в цитозоле клеток гладких мышц сосудов [22]. Многие стимулы могут приводить к каскадам сигнальной трансдукции, которые вызывают выход ионов кальция из саркоплазматического ретикулума через кальциевые каналы по инозитол-3-фосфат ( $IP_3$ ) – опосредованному механизму. Вышедшие ионы кальция связываются с кальмодулином, который, в свою очередь, активирует киназу легкой цепи миозина (MLCK). Этот фермент отвечает за фосфорилирование легкой цепи миозина (MLC), чтобы обеспечить формирование поперечных мостиков между миозином и актином, следовательно, сокращение. Известно несколько вариантов последовательности событий, ведущих к сокращению гладкомышечных волокон стенки сосудов.

1. Напряжение (изменение внутриклеточной концентрации АТФ) → активация растяжением ионных каналов (снижение активности АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов) → первичное и вторичное (после повышения активности управляемых напряжением натриевых каналов) открытие VGCC (VDCC) – внутриклеточных кальциевых каналов → повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  → снижение активности  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  – обменника. Поскольку концентрация  $Ca^{2+}$  снаружи клетки в 1000 раз выше, чем в цитозоле, обеспечивается поток ионов кальция внутрь клетки. Это приводит к повышению чувствительности к  $Ca^{2+}$  калиевых каналов, сокращению гладких мышечных клеток сосудов, возбуждению нейронов, стимуляции экспрессии генов и высвобождению сигнальных молекул.



2. NPY – нейропептид Y – состоит из 36 аминокислотных остатков, секретируется наряду с другими нейротрансмиттерами (ГАМК и глутамат), регулирует многие центральные и периферические биохимические процессы. Путь воздействия – связывание с NPY-рецептором → активация Gi-белка → снижение концентрации цАМФ → снижение активности протеинкиназы А (РКА) → снижение степени фосфорилирования MLCK → повышение активности MLCK → фосфорилирование MLCP (не зависит от кальция). MLCs (легкие цепи миозина) структурно и функционально отличаются от тяжелых цепей миозина (MHCs). Ассоциация MLC с гибким (шейным) участком тяжелых цепей миозина необходима для сборки макромолекулярных комплексов, обеспечивая тем самым моторную функцию миозина по перемещению связанной с его головкой нити актина.

3. Адреналин, норадреналин, дофамин, тромбоксан, эндотелин → соответствующие мембранные рецепторы → активация Gq-белка → повышение активности фосфолипазы С (PLC) → образование внутриклеточных посредников инозитол-3-фосфата и диацилглицерола (IP<sub>3</sub> и DAG) → активация рецептора IP<sub>3</sub> в саркоплазматическом ретикулуме → повышение концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup>.

4. Ангиотензин → рецептор ангиотензина I → в гладкомышечных клетках: активация Gq → повышение активности PLC → повышение образования IP<sub>3</sub> и DAG → активация рецептора IP<sub>3</sub> в саркоплазматическом ретикулуме → повышение концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup>; в эндотелии – синтез эндотелина. Аналогичное действие вазопрессин (антидиуретический гормон) через свои рецепторы.

5. Ассиметричный диметиларгинин → снижение продукции оксида азота.

К часто используемым в лабораторной и клинической практике относят адреналин, норадреналин, ангиотензин, метоксамин, фенилэфрин [23].

**Вазодилатация** – это расширение кровеносных сосудов, главным образом, артериол, приводящее к снижению артериального давления крови. Основная функция вазодилатации – увеличение притока крови к тканям, которые нуждаются в кислороде, глюкозе,

липидов или в других питательных веществах. Ткани обладают несколькими способами увеличения кровотока, включая высвобождение вазодилаторов (например, аденозин) в местную интерстициальную жидкость, которая диффундирует в капиллярное русло, провоцируя местную вазодилатацию [24]. Расширение сосудов напрямую влияет на соотношение между средним артериальным давлением, сердечным выбросом и общим периферическим сопротивлением (TPR). Расширение сосудов происходит во время систолы, тогда как вазоконстрикция следует в фазе диастолы. Расширение сосудов способствует снижению TPR и артериального давления путем расслабления клеток гладких мышц срединной оболочки крупных артерий и более мелких артериол. Вазодилатация и вазоконстрикция модулируются местными паракринными агентами из эндотелиальных клеток (например, оксид азота, брадикинин, ионы калия и аденозин), а также вегетативной нервной системой организма и надпочечниками, которые секретируют катехоламины [25]. Вазодилатация включается при снижении концентрации цитозольного кальция или дефосфорилирования миозина с помощью фосфатазы легкой цепи миозина и индукции кальциевых симпортеров и антипортеров, которые откачивают ионы кальция из внутриклеточного компартмента, что способствует расслаблению гладкомышечных клеток и, следовательно, расширению сосудов. Это достигается за счет обратного захвата ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазматическую сеть через обменники и выталкивания через плазматическую мембрану [26].

Существует три основных внутриклеточных стимула, которые могут привести к расширению сосудов. 1. Аденозин вызывает гиперполяризацию за счет изменения мембранного потенциала покоя клетки, что изменяет уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  за счет модуляции чувствительных к напряжению кальциевых каналов в плазматической мембране. 2. Простагландин обеспечивает повышение уровня цАМФ и активности протеинкиназы А, что вызывает увеличение выведения кальция из цитоплазмы. 3. Оксид азота, образованный в эндотелии, вызывает в гладкомышечных клетках синтеза цГМФ, который через протеинкиназу G инициирует вазодилатацию.

Дефосфорилирование легких цепей миозина (MLC) является наиболее частой причиной вазодилатации, как основной причины прекращения взаимодействия головок миозина и актина в процессе мышечного сокращения. Протеинкиназа G (цГМФ-зависимая протеинкиназа) – серин/треонин специфичная киназа, активируемая цГМФ, действует по двум механизмам: 1) фосфорилирование MLCK → снижение активности MLCK → дефосфорилирование MLC → дилатация; 2) повышение активности SERCA (Ca<sup>2+</sup>-АТФаза саркоплазматического ретикулума) → перенос Ca<sup>2+</sup> из цитозоля в саркоплазматический ретикулум → дилатация. По такому механизму действуют снижение концентрации эндотелина, гистамин (через гистаминовый H<sub>2</sub> рецептор), простаглицин (через IP рецептор), простаглицин D<sub>2</sub> (через DP-рецептор), простаглицин E<sub>2</sub> (через EP-рецептор) → повышение активности Gs-белка → повышение активности аденилатциклазы → повышение цАМФ → повышение активности протеинкиназы A (ПКА) → фосфорилирование MLCK → снижение активности MLCK → дефосфорилирование MLC → дилатация. Аналогично, а также через модуляцию активности чувствительных к напряжению кальциевых каналов действует VIP (интестинальный вазоактивный пептид из 28 аминокислотных остатков): 1) VIP → повышение активности Gs-белка → ... дилатация; 2) VIP → гиперполяризация → закрытие VDCC → снижение концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup> → ... дилатация.

Внеклеточный аденозин (через A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> аденозиновые рецепторы) → повышение активности АТФ-чувствительных K<sup>+</sup>-каналов → гиперполяризация → закрытие VDCC → снижение концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup> → ... дилатация.

Внеклеточные АТФ и АДФ (через P2Y рецептор) → активация белка Gq → повышение активности фосфолипазы C → повышение цитозольной концентрации Ca<sup>2+</sup> → повышение активности синтазы оксида азота → повышение концентрации NO → ... дилатация.

L-аргинин (через альфа-2 рецептор?) → активация белка Gi → уменьшение концентрации цАМФ → активация Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы → снижение концентрации цитозольного Na<sup>+</sup> → повышение активности Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>-обменника → снижение концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup> → ... дилатация.

Натрий-уретические пептиды, простагландин I<sub>2</sub>, простагландин E<sub>2</sub>, гепарин (через соответствующие рецепторы эндотелина) → снижение синтеза эндотелина [27; 28].

Известно, что симпатическая нервная система играет определенную роль в вазодилатации. Нейроны, которые контролируют расширение сосудов, происходят из гипоталамуса. Некоторая симпатическая стимуляция артериол в скелетных мышцах опосредуется адреналином, действующим на β-адренергические рецепторы артериолярных гладких мышц, которые опосредуются сигнальными путями через цАМФ. Этот механизм вазодилатации не имеет большого значения для физиологических процессов человека [29].

**Активные метаболиты кислорода кровеносных сосудов.** Итак, функции гладких мышц сосудов регулируются сложной сетью внутриклеточных сигнальных путей, включающих рецепторы клеточной поверхности, G-белки, ионные каналы/транспортёры, киназы/фосфатазы, цитоскелетные белки/адаптеры и факторы транскрипции. Эти пути контролируются эндокринными, нейрональными, паракринными /аутокринными, метаболическими и механическими первичными стимулами. Первичные стимулы индуцируют выработку молекул вторичных посредников, которые влияют на функции клеточных мишеней, причем эти эффекты должны быть легко обратимыми. К вторичным посредникам относят цитозольный Ca<sup>2+</sup>, циклические нуклеотиды, фосфолипиды и, в последнее время, активные метаболиты кислорода (АМК). К АМК относят любые электрофильные кислородсодержащие вещества: супероксидный анион-радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) и его продукт дисмутации - перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), которые образуются путем восстановления молекулярного кислорода одним или двумя электронами, соответственно. Перенос электронов катализируется членами большой семьи ферментов оксидоредуктаз. Для многих из них, включая комплексы I и III митохондриальной цепи переноса электронов, несвязанную эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), ксантиноксидазу, циклооксигеназы и липоксигеназы, продуцирование АФК считается вторичным по отношению к основной функции фермента, по крайней мере, в нормальных физиологических условиях. Однако основным источником АФК в сосудистой сети (в том числе

в гладких мышцах и эндотелии) является семейство НАДФН-оксидаз (NOX), для которых единственной функцией является производство супероксидного анион-радикала и/или  $H_2O_2$  [30; 31].

В фагоцитах функция NOX заключается в создании «окислительного взрыва», целью которого является уничтожение захваченных патогенов. В не фагоцитирующих клетках, включая гладкие мышцы и эндотелий, образованные НАДФН-оксидазой АМК действуют как незаменимые молекулы - вторичные посредники, обеспечивающие функционирование клеток в норме. Только во время «окислительного стресса», ключевого признака сердечно-сосудистых заболеваний, АМК вырабатываются в избытке и считаются вредными. Из семи известных изоформ NOX четыре экспрессируются в гладких мышцах и эндотелии сосудов (NOX1, 2, 4 и 5).

Экспериментальный и теоретический анализ химических свойств супероксидного анион-радикала и  $H_2O_2$  в водных или гидрофобных средах показали, что обе молекулы могут изменять функции белков за счет окисления остатков цистеина. Одноэлектронное окисление (сульфенилирование;  $R - SOH$ ) легко обратимо благодаря действию тиоредоксинов, глутатионпероксидаз и восстановленного глутатиона (GSH). Дополнительное окисление –  $SOH$  (сульфинилирование;  $R-SO_2H$ ) также обратимо под действием сульфиредоксина-1, но дальнейшее окисление  $-SO_2H$  (сульфонилирование;  $R-SO_3H$ ) считается необратимым. Недавние работы также показали, что АМК-зависимое окисление метионина ( $R-SCHO$ ) также может влиять на белковые и сосудистые функции, и это действие обратимо под действием метионинсульфоксидредуктазы. Остатки цистеина, лизина и гистидина также могут быть модифицированы посредством образования аддуктов Михаэля с пероксидами липидов (LOO-), такими как 4-гидроксиноненал, образующихся при окислении полиненасыщенных жирных кислот. Будучи липидами, эта последняя форма модификации может иметь особое значение для окислительной регуляции мембраносвязанных белков, таких как ионные каналы [32; 33]. Супероксидный анион-радикал самопроизвольно реагирует с NO с образованием пероксинитрита (ONOO-). ONOO- также модифицирует функцию белка путем нитрования остатков тирозина ( $R - ONO$ ) посредством реакции с  $CO_2$  и образования промежуточных радикалов диоксида азота и карбоната,  $NO_2^{\cdot}$  и  $CO_3^{\cdot-}$ . Нитрование влияет на функцию белка,

предотвращая или имитируя фосфорилирование. В присутствии свободного цитозольного  $\text{Fe}^{2+}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  превращается в очень мощный окислительный гидроксильный радикал ( $\cdot\text{OH}$ ), который окисляет белки без разбора, независимо от рКа, поэтому вряд ли имеет физиологическое значение. Ключевыми мишенями для обратимой окислительной модификации АМК, образованных НАДФН-оксидазами, на функции гладких мышц сосудов (VSM) является широкий спектр белков клеточной поверхности, а также внутриклеточных белков, включая фосфатазы, киназы и другие цитозольные ферменты, G-белки и адаптерные белки, ионные каналы, транспортеры и факторы транскрипции. АМК транспортируются через анионные каналы и аквапорины мембран [34; 35].

**Вазоконстрикция и активные метаболиты кислорода.** При отсутствии предварительной вазоконстрикции супероксидный анион-радикал оказывает сосудосуживающее действие на аорту и легочные артерии крыс, но не брыжеечные или бедренную артерии; в то же время  $\text{H}_2\text{O}_2$  вызывает напрямую сужение мышшиной и крысиной аорты, коронарной артерии крупного рогатого скота, церебральной артерии собак. В различных артериальных препаратах млекопитающих, предварительно суженных агонистами GPCR (G-рецепторов), супероксидный анион-радикал и  $\text{H}_2\text{O}_2$  оказывают смешанное, зависящее от концентрации действие (сокращение/релаксация), хотя доминирующим эффектом  $\text{H}_2\text{O}_2$  является релаксация. У разных млекопитающих  $\text{H}_2\text{O}_2$  и супероксидный анион-радикал последовательно усиливают субмаксимальное сокращение, вызванное KCl, потому что KCl устраняет влияние АМК на  $\text{K}^+$ -каналы. Показано, что сосудосуживающее действие супероксидного анион-радикала в значительной степени подавляются супероксиддисмутазой и лишь частично каталазой. Следовательно, сократительный эффект супероксидного анион-радикала не обязательно требует преобразования его в  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Сосудосуживающее действие АМК снижается неспецифическим ингибиторами тирозинкиназной активности белков, а также, специфическими блокаторами киназ семейства Src и протеинкиназы C. Таким образом, образованные НАДФН-оксидазами АМК повышают вазоконстрикцию путем увеличения концентрации цитозольного  $\text{Ca}^+$  [36–38].

Вазоконстрикция может быть усилена и без увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле по двум путям: через ингибирование фосфатазы легкой цепи миозина (MLCP) и полимеризации актина. Активность MLCP подавляется Rho-киназой (ROCK) путем фосфорилирования субъединицы-1 миозинфосфатазы (MYPT1). ROCK активируется фактором RhoA, который в свою очередь регулируется либо супероксидным анион-радикалом, либо Rho-гуанин фактором обмена нуклеотидов (RhoGEF). Последний непосредственно активируются G-белком, связанным с рецептором GPCR, либо опосредованно через NOX1- или NOX2-зависимым фосфорилированием тирозина с помощью Src-киназы, PYK2 (протеин-тирозин киназы 2 $\beta$ ) или JAK2 (Янус киназы-2). RhoGEF также активируются напряжением посредством взаимодействия интегринов с внеклеточным матриксом через киназу фокальной адгезии (FAK) в ассоциации с  $\text{H}_2\text{O}_2$  (образованной NOX4) и белком-2, взаимодействующим с дельта полимеразой (Poldip2). Poldip2 – это многофункциональный белок, который регулирует состав внеклеточного матрикса сосудов и активность матриксной металлопротеиназы. RhoA способствует полимеризации актина и сократимости актомиозинового комплекса [39; 40].

**К патогенезу артериальной гипертензии.** В настоящее время имеются доказательства того, что НАДФН-зависимые оксидазы могут способствовать патогенезу артериальной гипертензии через окислительный стресс [35]. Современные представления о роли окислительного стресса в патогенезе артериальной гипертензии представлены на рисунках 1 и 2.

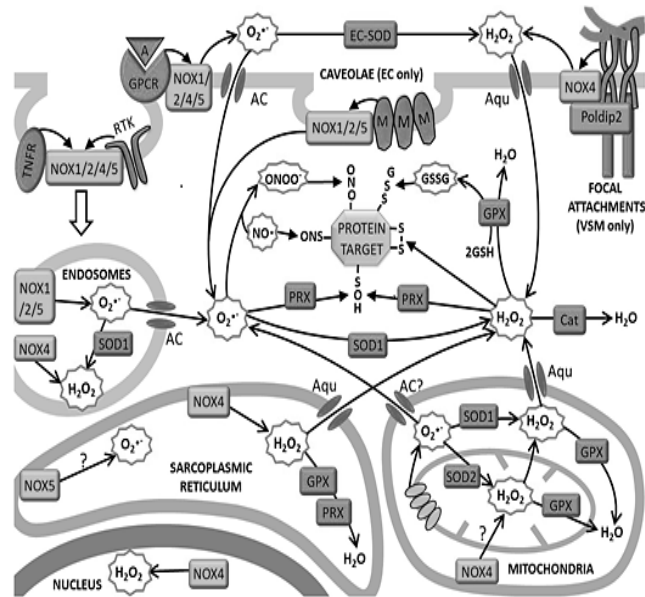


Рис. 1. НАДФН-зависимые оксидазы (NOX), пути образования, транспорта и превращений активных метаболитов кислорода в эндотелиальных клетках [35]. Сокращения: EC – эндотелиальная клетка, AC – анионный канал, Aqu – аквапорин, GPCR – рецептор, связанный с G-белками, RTK – рецептор тирозинкиназы, TNFR – рецептор фактора некроза опухолей, Cat – каталаза, SOD – супероксиддисмутаза, PRX – пероксидаза, GPX – глутатионпероксидаза, VSM – гладкие мышцы сосудов



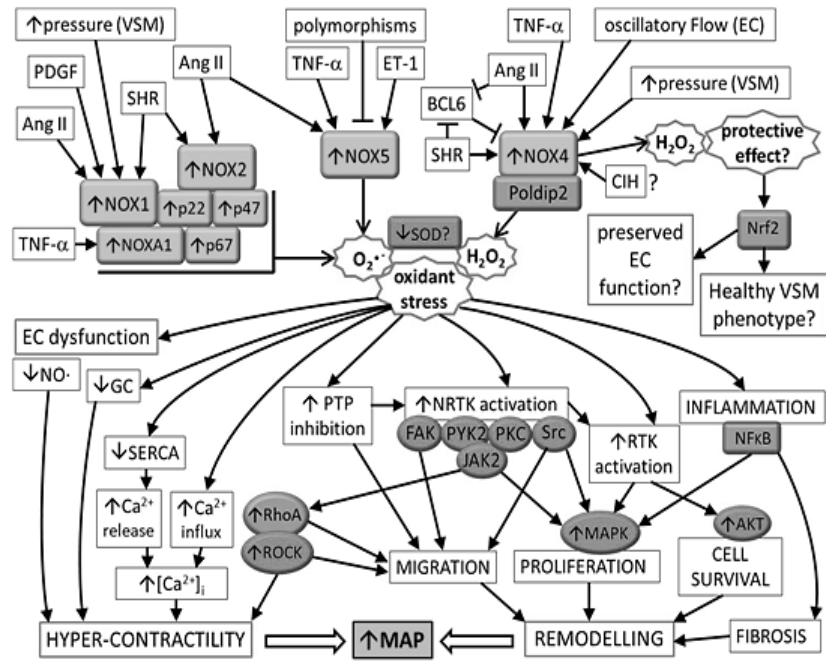


Рис. 2. Окислительный стресс и пути развития артериальной гипертензии [35]. Символом SHR обозначена спонтанная гипертензия у крыс; CIH – хроническая прерывистая гипоксия. BCL6 – транскрипционный фактор, ингибирует транскрипцию p53, что делает клетки менее чувствительными к повреждениям ДНК (защита от апоптоза)

На рис. 1 представлены основные пути образования супероксидного анион-радикала различными изоформами НАДФН-зависимых оксидаз 1) NOX1,2,4,5 – через активацию рецепторов фактора некроза опухолей, тирозинкиназных рецепторов и G-рецепторов плазматической мембраны; 2) NOX1,2,5 – в кавеолах; 3) NOX4 – в митохондриях, ядре и участках фокальной адгезии; 4) NOX4,5 – в эндоплазматическом ретикулуме; 5) NOX1,2,4,5 – в эндосомах эндотелиальных клеток. Образованные супероксидный анион-радикал и пероксид водорода перемещаются через анионные каналы и аквапорины мембран компартментов клеток. Основными ферментами превращений активных метаболитов кислорода являются супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы и глутатионпероксидаза.

Супероксидный анион-радикал, образованный эндотелиальными NOX1, 2 и 5, противодействует эндотелиальной NO-синтазе (eNOS) путем окисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (BH4) оксигеназного домена фермента. Такое «расщепление (разобщение) eNOS», заставляет фермент производить больше супероксидного анион-радикала. И наоборот, NO ограничивает выработку супероксидного анион-радикала, ингибируя активность NOX1, 2 и 5 [41–43]. В гладкомышечных клетках сосудов это способствует образованию окисленного глутатиона (GSSG), который может активировать  $Ca^{2+}$ -АТФазу саркоплазматического ретикулума (SERCA), что увеличивает перенос  $Ca^{2+}$  в саркоплазматический ретикулум, обеспечивая тем самым вазодилататорный эффект. Изменения эндотелийзависимой дилатации и  $\alpha 1$ -адренореактивности аорты крыс были продемонстрированы при окислительном стрессе, вызванном иммобилизацией крыс или введением им «лоушки НАДФН» параквата [44; 45].

На рис. 2 представлены современные представления о роли окислительного стресса в развитии артериальной гипертензии. Множественные митогенные и проконтрактивные стимулы (ангиотензин II, эндотелин ET-1, иромбоцитарный ростовой фактор PDGF, фактор некроза опухолей альфа TNF- $\alpha$ ) индуцируют экспрессию регуляторных субъединиц белков p22, p47, p67 и НАДФ-зависимых оксидаз NOX1, NOX2, а также NOXA1, и NOX5. Экспрессия NOX4 повышается за счет медиаторов воспаления (напри-

мер, TNF- $\alpha$ ) и механических сил, связанных с артериальным кровотоком (колебательный поток в эндотелии (EC) и повышенное перфузионное давление в гладких мышцах сосудов (VSM). В совокупности результатом усиленной экспрессии NOX является образование избыточного супероксидного анион-радикала и  $H_2O_2$  (NOX4), что приводит к проявлениям окислительного стресса. Накопление супероксидного анион-радикала может усугубляться снижением экспрессии или активности супероксиддисмутазы (СОД).

На рисунке 2 показано, что окислительный стресс нарушает эндотелий-зависимое расслабление благодаря связыванию NO и расцеплению eNOS. Избыток супероксидного анион-радикала снижает активность гуанилатциклазы (GC). Сосудистый тонус повышается за счет подавления активности  $Ca^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума (SERCA) и увеличенного высвобождения  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума, а также за счет повышенной экспрессии и активности RhoA и Rho-киназы (ROCK). Ремоделирование сосудов происходит за счет комбинированного действия стимулированной активными метаболитами кислорода (ROS) миграции гладкомышечных клеток сосудистой стенки (VSMC), что опосредовано киназой фокальной адгезии (ФАК). Этим процессам способствует окислительное ингибирование протеинтирозинфосфатаз (PTP) и усиление активности нерецепторных тирозинкиназ (NRTK) и рецепторных тирозинкиназ (RTK). Компоненты сигнальных путей NRTKs, ФАК, Src, PYK2 и JAK2, а также протеинкиназа C (PKC) являются важными координаторами ремоделирования сосудов. Они также способствуют повышению тонуса сосудов через RhoA/ROCK. Пролиферация VSM и фиброз также поддерживаются окислительной активацией транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Таким образом, среднее артериальное давление (mean arterial pressure, MAP) повышается за счет развития дисфункции эндотелия, процессов вазоконстрикции на уровне гладкомышечных клеток стенок сосудов, ремоделирования и фиброза стенок артерий [35].

В противовес эффектам «окислительного стресса», вызванным усилением экспрессии NOX4,  $H_2O_2$  может оказывать защитное действие при гипертензии посредством активации фактора Nrf2. Это транскрипционный фактор, который у людей кодируется геном

*NFE2L2*. NRF2 регулирует экспрессию антиоксидантных белков, защищающих клетки от окислительного повреждения, вызванного травмой и воспалением. В нормальных условиях период полураспада Nrf2 составляет всего 20 минут, и он разрушается после связывания с убиквитином. При окислительном стрессе Nrf2 не разрушается, а перемещается в ядро, трансформируется в гетеродимер, который связывается с промотором ДНК и инициирует экспрессию антиоксидантных генов с образованием высококонсервативных белков-ферментов НАДФН-хиноноксидоредуктазы 1, сульфидредоксина 1, тиоредоксинредуктазы 1, глутатион-S-трансферазы и др. Это поддерживает сохранение нормального по тонуусу фенотипа артериальных сосудов [54–57].

**Заключение.** При дисбалансе между продукцией АМК и антиоксидантной защитой избыток супероксидного анион радикала в сосудистой сети обеспечивает два немедленных эффекта. Во-первых, он будет реагировать с  $\text{NO}\cdot$  не контролируемым образом, приводя к образованию пероксинитрита  $\text{ONOO}^-$ , а во-вторых, он будет вызывать расщепление eNOS посредством окисления  $\text{BH}_4$ , заставляя eNOS образовывать супероксидный анион радикал вместо  $\text{NO}$ . Образование высоких концентраций АМК, особенно гидроксильного радикала, может непосредственно инактивировать гуанилатциклазу. Гипертонические агенты, такие как Ang II и TXA<sub>2</sub>, способствуют расщеплению eNOS. Степень, до которой это разъединение субъединиц eNOS ухудшает релаксацию, вызванную агонистами, будет также зависеть от того, сколько произведенного супероксидного анион радикала может дисмутироваться в  $\text{H}_2\text{O}_2$  эндотелиальной супероксиддисмутазой, а это будет зависеть от экспрессии и локализации супероксиддисмутазы. Конечный эффект может проявляться также в нарушении  $\text{NO}$ -опосредованной релаксации посредством закрытия калиевых каналов и деполяризации мембран гладких мышц сосудистой стенки. Эти взаимоотношения объясняют развитие гипертонического фенотипа. Развитие гипертонии связано напрямую с нарушением регуляции концентрации цитозольных ионов кальция в гладкомышечных клетках подэндотелиального слоя стенки сосудов, зависящей от молекул окислительного стресса [46–49]. Одним из последствий влияния окислительного стресса на концентрацию цитозольных ионов кальция явля-

ется избыточное производство супероксидного анион радикала, которое приводит к необратимому ингибированию фермента SERCA гладких мышц, предотвращая тем самым образование нормального про-релаксанта – оксида азота [50; 51]. Таким образом, состояние окислительно-восстановительных систем и биодоступность оксида азота являются ключевыми факторами, контролирующими влияние окислительного стресса на тонус сосудов [52; 53].

Итак, развитие дисфункции эндотелия, процессов вазоконстрикции на уровне гладкомышечных клеток стенок сосудов, ремоделирования и фиброза артерий ведут к формированию гипертензионного фенотипа артерий. В тоже время запуск пероксидом водорода Nrf2-зависимого пути может оказать антигипертензионный эффект через формирование эндогенных антиоксидантных систем, что в последние годы используется в практическом здравоохранении [35]. Завершая главу, необходимо привести четыре важнейших исследования, которые явились основополагающими вехами в изучении проблемы тонуса кровеносных сосудов [58-61]. Материалы этой главы опубликованы в 2020 году [62].

### Список использованной литературы к главе 1

1. Mizuno, Y. Inflammation and the development of atherosclerosis / Y. Mizuno, R.F. Jacob, R.P. Mason // *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. – 2011. – Vol. 18 (5). – P. 351–358.
2. Rajendran, P. The vascular endothelium and human diseases / P. Rajendran [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2013. – Vol. 9 (10). – P. 1057–1069.
3. Jin, H. P2Y<sub>2</sub>R activation by ATP induces LDL-mediated inflammasome activation through modulation of mitochondrial damage in human endothelial cells / H. Jin [et al.] // *Free Radical Biologie and Medicine*. – 2019. – Vol. 136. – P. 109–117.
4. Roberts, O.L. ERK5 and the regulation of endothelial cell function / O.L. Roberts [et al.] // *Biochemical Society Transactions*. – 2009. – Vol. 37 (Pt 6). – P. 1254–1259.
5. Vanichkitrungruang, S. Oxidation of human plasma fibronectin by inflammatory oxidants perturbs endothelial cells function / S. Vanichkitrungruang [et al.] // *Free Radical Biologie and Medicine*. – 2019. – Vol. 136. – P. 118–134.

6. Yu, H. Reactive species-induced microvascular dysfunction in ischemia/reperfusion / H. Yu, T. Kalogeris, R.J. Korthuis // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 135. – P. 182–197.
7. Bauer, V. Nitric oxide – the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions / V. Bauer, R. Sotnikova // *General Physiol. Biophys.* – 2010. – Vol. 29. №4. – P. 319–340.
8. Flammer, A.J. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice / A.J. Flammer [et al.] // *Circulation*. – 2012. – Vol. 126 (6). – P. 753–767.
9. Münzel, T. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction / T. Münzel [et al.] // *Annals of Medicine*. – 2008. – Vol. 40 (3). – P. 180–196.
10. Lundberg, J.O. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics / J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M.T. Gladwin // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2008. – Vol. 7 (2). – P. 156–167.
11. Suschek, C. Nonenzymatic NO production in human skin: Effect of UVA on cutaneous NO stores / C. Suschek, C. Opländer // *Nitric Oxide*. – 2010. – Vol. 22 (2). – P. 120–135.
12. Ignarro, L.J. Nitric Oxide. A Novel Signal Transduction Mechanism For Transcellular Communication // *Hypertension*. – 1990. – Vol. 16 (5). – P. 477–483.
13. Osanai, T. Relationship between salt intake, nitric oxide, and asymmetric dimethylarginine and its relevance to patients with end-stage renal disease / T. Osanai // *Blood Purification*. – 2002. – Vol. 20 (5). – P. 466–468.
14. Davies, S.A. Neuropeptide stimulation of the nitric oxide signaling pathway in *Drosophila melanogaster* Malpighian tubules / S.A. Davies [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 273. – R823-827.
15. Современные проблемы биохимии и физиологии регуляции сосудистого тонуса / А.П. Солодков, С.С. Лазуко // *Современные проблемы биохимии: учебное пособие / под ред. А.П. Солодкова, А.А. Чиркина*. – Витебск: УО «ВГУ имени П.М. Машерова», 2010. – С. 255–309.
16. Shami, P.J. Nitric oxide modulation of the growth and differentiation of freshly isolated acute non-lymphocytic leukemia cells / P.J. Shami [et al.] // *Leukemia Research*. – 1995. – Vol. 19 (8). – P. 527–533.

17. Biochemistry of soluble guanylate cyclase / E.R. Derbyshire, M.A. Marletta // *Handb. Exp. Pharmacol. Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2009. – Vol. 191. – P. 17–31.

18. Pieper, G.M. Stimulatory and inhibitory action of nitric oxide donor agents vs. nitrovasodilators on reactive oxygen production by isolated polymorphonuclear leukocytes / G.M. Pieper, G.A. Clarke, G.J. Gross // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1994. – Vol. 269. – P. 451–456.

19. Singh, A.K. High oxidative stress adversely affects NFκB mediated induction of inducible nitric oxide synthase in human neutrophils: Implications in chronic myeloid leukemia / A.K. Singh Singh // *Nitric Oxide*. – 2016. – Vol. 58. – P. 28–41.

20. Passos-Silva, D.G. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions / P D.G. Passos-Silva, T. Verano-Braga, R. A. S. Santos // *Clin Sci (Lond)*. – 2013. – Vol. 124 (7). – P. 443–456.

21. Sahni, S. Nitric oxide reduces oxidative stress in cancer cells by forming dinitrosyliron complexes / S. Sahni, J.R. Hickok, D.D. N. Thomas // *Nitric Oxide*. – 2018. – Vol. 76. – P. 37–44.

22. Wilson, D.P. Thromboxane A<sub>2</sub>-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697 / D.P. Wilson [et al.] // *Biochem. J.* – 2005. – Vol. 389 (Pt 3). – P. 763–774.

23. Brozovich, F.V. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders / F.V. Brozovich [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2016. – Vol. 68. – P. 476–532.

24. Sato, A. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease / A. Sato [et al.] // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. – 2005. – Vol. 288 (4). – H1633–1640.

25. Charkoudian, N. Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans / N. Charkoudian // *Journal of Applied Physiology. American Physiological Society*. – 2010. – Vol. 109 (4). – P. 1221–1228.

26. Webb, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation / R.C. Webb // *Advances in Physiology Education*. – 2003. – Vol. 27 (1–4). – P. 201–2066.

27. *Clinical Biochemistry. Metabolic and clinical aspects* / W.J. Marshall, S.K. Bangert (Eds.) – N.-Y.: Churchill Livingstone, 1995. – 854 p.

28. Clinical chemistry. Theory, analysis, and correlation / L.A. Kaplan, A.J. Pesce (Eds.) Third edition. – N.-Y.: Mosby, 1996. – 1211 p.

29. Лазуко С.С. Механизмы регуляции тонуса сосудов сердца: роль iNOS и калиевых каналов: монография / С.С. Лазуко. – Витебск: ВГМУ, 2019. – 216 с.

30. Tejero, J. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation / J. Tejero, S. Shiva, M.T. Gladwin // *Physiol. Rev.* – 2019. – Vol. 99. – P. 311–379.

31. Bedard, K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology / K. Bedard, K.H. Krause // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 245–313.

32. Moller, M.N. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems / M.N. Moller [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2019. – Vol. 294 (40). – P. 14776–14802.

33. Trevisani M., Siemens J., Materazzi S., Bautista D.M. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – Vol. 104. – P. 13519–13524.

34. Monteiro, H.P. Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling / H.P. Monteiro, R.J. Arai, L.R. Travassos // *Antioxidants Redox Signal.* – 2008. – Vol. 10. – P. 843–889.

35. Knock, G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signaling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension / G.A. Knock // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2019. – Vol. 145. – P. 385–427.

36. Ding, Y. Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone / Y. Ding [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 31799–31809.

37. Knock, G.A. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization / G.A. Knock [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 46. – P. 633–642.

38. Amberg, G.C. Local regulation of arterial L-type calcium channels by reactive oxygen species / G.C. Amberg, S. Earley, S.A. Glapa // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 107. – P. 1002–1010.

39. Jin, L. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta / L. Jin, Z. Ying, R.C. Webb // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. H1495–H1500.



40. Hernandez, M.S. Polimerase delta-interacting protein 2 deficiency protects against blood-brain permeability in the ischemic brain / M.S. Hernandez [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2018. – Vol. 15 (1). – P. 1–16.

41. Navia-Pelaeza, J.M. NOS uncoupling by oxidized LDL: Implications in atherosclerosis / J.V. Navia-Pelaeza [et al.] // *Free Radical and Medicine*. – 2017. – Vol. 113. – P. 335–336.

42. Liao, Y. NADPH oxidase 4 and endothelial nitric oxide synthase contribute to endothelial dysfunction mediated by histone methylations in metabolic memory / Y. Liao [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 115. – P. 383–394.

43. Lee, H.-Y. Nox4 regulates the eNOS uncoupling process in aging endothelial cells / H.-Y. Lee [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 113. – P. 26–35.

44. Солодков, А.П. Изменения эндотелийзависимой дилатации и  $\alpha 1$ -адренореактивности аорты крыс, вызванные ингибированием индуцируемой NO-синтазы после ограничения двигательной активности / А.П. Солодков, Н.М. Яцковская // *Российский физиологический журнал им. Н.М. Сеченова*. – 2013. – Т. 99. №7. – С. 859–868.

45. Яцковская, Н.М. Состояние вазоконстрикции и эндотелийзависимой дилатации при моделировании окислительного стресса введением параквата / Н.М. Яцковская, А.А. Чиркин // *Новости медико-биологических наук*. – 2020. – Т. 20. №1. – С. 23–29.

46. Camargo, L.L. Tsiropoulou S. Et al. Vascular NOX (NADPH oxidase) compartmentalization, protein hyperoxidation, and endoplasmic reticulum stress response in hypertension / L.L. Camargo [et al.] // *Hypertension*. – 2018. – Vol. 72. – P. 235–246.

47. Zhang, X. Angiotensin II-induced early and late inflammatory responses through NOXs and MAPK pathways / X. Zhang [et al.] // *Inflammation*. – 2017. – Vol. 40. – P. 154–165.

48. Siu, K.L. Differential Roles of Protein Complexes NOX1-NOXO1 and NOX2-p47phox in Mediating Endothelial Redox Responses to Oscillatory and Unidirectional Laminar Shear Stress / K.L. Siu, L. Gao, H. Cai // *J. Biol. Chem*. – 2016. – Vol. 291. – P. 8653–8662.

49. Masi, S. Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation / S. Masi, M. Uliana, A. Virdis // *Vasc. Pharmacol*. – 2019. – Vol. 115. – P. 13–17.

50. Massaro, M. Oxidative stress and vascular stiffness in hypertension: A renewed interest for antioxidant therapies? / M. Massaro [et al.] // *Vasc. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 116. – P. 45–50.
51. Montezano, A.C. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies / A.C. Montezano [et al.] // *Can. J. Cardiol.* – 2015. – Vol. 31. – P. 631–641.
52. Do Vale, G.T. Are reactive oxygen species important mediators of vascular dysfunction? / C.R. Do Vale G.T., C.R. Tirapelli // *Curr. Hypertens. Rev.* – 2019. – doi: 10.2174/1573402115666190416153638.
53. Pinheiro, L.C. Sources and effects of oxidative stress in hypertension / L.C. Pinheiro, G.H. Oliveira-Paula // *Curr. Hypertens. Rev.* – 2019. – doi: 10.2174/1573402115666190531071924.
54. Zhang, J. Resveratrol attenuates oxidative stress induced by balloon injury in the rat carotid artery through actions on the ERK1/2 and NF-kappa B pathway / J. Zhang J. [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2013. – Vol. 31. – P. 230–241.
55. Cabal-Hierro, L. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors / L. Cabal-Hierro, P.S. Lazo // *Cell. Signal.* – 2012. – Vol. 24. – P. 1297–1305.
56. Yamamoto, T. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity / T. Yamamoto [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P. 2758–2770.
57. Guo, Y. Epigenetic regulation of Keap1-Nrf2 signaling / Y. Guo [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2015. – Vol. 88 (Pt B). – P. 337–349.
58. Green, L.C. Nitrate biosynthesis in man / L.C. Green [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1981. – Vol. 78 (12). – P. 7764–7768.
59. Ignarro, L.J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties / L.J. Ignarro // *FASEB J.* – 1989. – Vol. 3. – P. 31–36.
60. Waldman, S.A. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system / S.A. Waldman, F. Murad // *J. Cardiovasc Pharmacol.* – 1988. – Vol. 5 (12 Suppl). – P. S115-S118.
61. Palmer, R.M. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor / R.M. Palmer, A.G. Ferrige A.G., S. Moncada // *Nature.* – 1987. – Vol. 327 (6122). – P. 524–526.
62. Чиркин А.А., Яцковская Н.М. Тонус кровеносных сосудов и окислительный стресс / А.А. Чиркин, Н.М. Яцковская // *Новости медико-биологических наук.* – 2020. – Т. 20. №3. – С. 170–180.

## ГЛАВА 2. СОСТОЯНИЕ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ У КРЫС

Стрессом называют совокупность неспецифических реакций организма на воздействие различных факторов-стрессоров [1]. В последние десятилетия сформировано представление о тканевом стрессе (тканевом адаптационном синдроме) как универсальной для всех тканей организма неспецифической адаптационной реакции, которая формируется в ткани в ответ на действие различных стрессоров. Процесс повреждения клетки в результате окисления называют окислительным стрессом за счет действия токсичных реактивных форм кислорода (гидроксильный радикал, пероксид водорода, супероксидный анион-радикал и др.) [2]. С химической точки зрения окислительный стресс представляет собой значительное увеличение клеточного редокс-потенциала или существенное снижение восстановительной способности клеточных редокс-пар типа окисленный/восстановленный глутатион. Если уровень реактивных форм кислорода превышает способность антиоксидантных систем клетки их обезвреживать, возникают нарушения энергетики и метаболизма клеток, что может привести к гибели клеток (апоптоз, некроз, аутофагия и др.) [3; 4]. Адаптация организма к действию стрессоров включает активацию специфических и неспецифических реакций и процессов [5]. В реализации стресс-реакции принимают участие симпатико-адреналовая система, в которую входит симпатическая нервная система и мозговой слой надпочечников с конечными продуктами катехоламинами (норадреналин и адреналин), гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система, конечными продуктами которой являются глюкокортикоиды, а также гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная система и ее гормоны трийодтиронин и тироксин. Гормоны этих систем регулируют важнейшие биохимические процессы неспецифической стресс-реакции организма путем мобилизации энергетических и структурных ресурсов организма (активируются реакции липолиза, протеолиза, гликогенолиза, которые приводят к увеличению в крови концентрации глюкозы, жирных кислот, аминокислот, циркулирующих микроvesикул с продуктами распада биополимеров). Возникшие простые молекулы доставляются в те органы и ткани, на которые ложится повышенная нагрузка при стрессе, для энергетических (глюкоза, триглицериды) и пластических (аминокислоты, жирные кислоты,

нуклеотиды) целей. Вслед за катаболическим эффектом наступает значительно более длительная «анаболическая фаза», в ходе которой активируется синтез нуклеиновых кислот и белков в различных органах, обеспечивающий восстановление структур, пострадавших в катаболическую фазу. Десять лет тому назад были опубликованы сообщения о важной роли микро РНК и подавления синтеза фермента *Dicer* в развитии стресс-реакции на молекулярном уровне. Эти два фактора участвуют в регуляции экспрессии генов, определяющих чувствительность клеток к действию стрессоров [6; 7]. Одним из важнейших последствий развития окислительного стресса является изменение тонуса сосудов, ведущее к возникновению и прогрессированию артериальной гипертензии и клинических проявлений атеросклероза [8; 9].

В 2002 году учеными Витебского государственного медицинского университета А.С. Дорошенко, А.П. Солодковым, В.И. Шебеко было показано, что концентрация продуктов перекисного окисления липидов в миокарде существенно увеличивалась после иммобилизационного 6-часового стресса у крыс: концентрация ДК увеличивалась приблизительно в 2 раза, а концентрация МДА – в 3 раза. После иммобилизационного стресса изменилась также активность антиоксидантных ферментов в миокарде: активность супероксиддисмутазы снижалась, активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы увеличивалась, а активность каталазы достоверно не изменялась. После 6-ти часовой иммобилизации крыс концентрация белковых SH-групп в миокарде снизилась в 2,3 раза. Эти изменения выявлялись на фоне уменьшения содержания небелковых SH-групп. В то же время, в эритроцитах наблюдалось снижение концентрации небелковых тиоловых групп на 30,3% и увеличение содержания небелковых SS- групп в 2,6 раза, а тиол/дисульфидное соотношение уменьшилось в 3,3 раза. В целом эти изменения свидетельствовали о возникновении выраженного окислительного стресса в клетках миокарда и нарушения их редокс-состояния после 6-часовой иммобилизации крыс. Авторы предположили, что повышенное образование АМК и NO в эндотелии кровеносных сосудов при иммобилизационном стрессе вполне могло быть одной из важнейших причин изменения небелкового тиол/дисульфидного соотношения в эритроцитах в пользу увеличения

S-S-групп. О повышенном образовании NO в эндотелии свидетельствовало увеличение содержания в плазме крови нитратов и нитритов. При сочетанной повышенной продукции АФК и NO могут создаваться условия для образования пероксинитрита и  $N_2O_3$ . Поэтому при иммобилизации в клетках миокарда и коронарных сосудов, вероятно, возникал не только окислительный стресс, но и усиливалось действие активных форм азота. Так как уменьшение содержания белковых SH-групп в миокарде происходило на фоне увеличения содержания продуктов перекисного окисления липидов и, несмотря на повышение активности антиоксидантных ферментов, вполне можно было заключить, что при иммобилизационном стрессе значительно нарушается редокс-состояние клеток сердца. Возможно, предположили авторы, изменение редокс-состояния кардиомиоцитов и клеток коронарных сосудов представляет собой универсальный механизм, ответственный за нарушение сократительной активности миокарда и снижение тонуса сосудов сердца при стрессе [10].

Итак, в начале XXI века молодым ученым Витебского государственного медицинского университета было уже известно, что при воздействии различных патогенов, в том числе мощных стрессоров, в клетках может увеличиваться образование и изменяться действие монооксида азота (NO). Важная роль в регуляции биологической активности NO принадлежит клеточным редокс-чувствительным молекулам белковой и небелковой природы. К таким молекулам относятся NO-синтазы, факторы транскрипции (AP-1, NF-kB, NIF-1), киназы (JNK, CDK, p 38 MAP киназа), фосфатазы, регуляторы внутриклеточного метаболизма кальция (например, рианодинового рецептор и L-тип кальциевых каналов), протеины АТФ-зависимых калиевых каналов, а также молекулы, регулирующие сократительную активность гладкой мышцы коронарных сосудов. Роль редокс-регуляции в нарушении тонуса коронарных сосудов при стрессе ранее не изучалась. В частности, не определена важность вклада этих механизмов в нарушение ауторегуляции коронарных сосудов при стрессе. В то время было известно, что низкомолекулярный тиолсодержащий антиоксидант N-ацетил-L-цистеин проникает в клетки и способен восстанавливать дисульфидные группы, что и обуславливает его способность предупреждать

нарушение эндотелий зависимой вазодилатации у спонтанно-гипертензивных крыс, восстанавливать NO-зависимое расслабление сосудов при экспериментальной сердечной недостаточности. В работе Беляевой Л.Е. и др. было показано, что N-ацетил-L-цистеин является эффективным средством, ограничивающим нарушения тонуса коронарных сосудов, обусловленные тяжелой кровопотерей [11]. В связи с тем, что стресс сопровождается активацией свободно радикального окисления и изменением редокс-состояния клеток, представлялось перспективным использовать предварительное введение N-ацетил-L-цистеина для ограничения постстрессорных нарушений функции коронарных сосудов, которые выражаются в ослаблении ауторегуляции коронарного потока, снижении коронарного расширительного резерва и сократительной функции миокарда.

Результаты экспериментов показали, что при 6-часовом иммобилизационном стрессе существенно нарушается редокс-состояние клеток миокарда. О нем свидетельствует значительное уменьшение белковых тиоловых групп в ткани миокарда. Изменение редокс-состояния кардиомиоцитов и клеток коронарных сосудов, вероятно, является важнейшей причиной нарушения тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда при 6-ти часовом иммобилизационном стрессе. Этот вывод подтверждали данные, указывающие на то, что низкомолекулярный тиолсодержащий антиоксидант, обладающий способностью стимулировать синтез глутатиона, ограничивает не только выраженность снижения содержания белковых сульфгидрильных групп в ткани миокарда при 6-ти часовом иммобилизационном стрессе, но и неблагоприятное воздействие стресса на тонус коронарных сосудов. Увеличение содержания небелковых дисульфидных групп в эритроцитах при 6-ти часовом стрессе, скорее всего, было обусловлено накопившимся в них окисленным глутатионом и является дополнительным свидетельством образования при стрессе больших количеств активных метаболитов кислорода и азота. Поэтому изменение редокс-состояния клеток сердца и коронарных сосудов при стрессе было обусловлено как повышенным образованием активных метаболитов кислорода, но так и увеличением образования пероксинитрита. Считали, что это связано с тем, что при стрессе од-

новременно повышается продукция и оксида азота, и активных метаболитов кислорода. Так как эндотелиоциты коронарных сосудов играют важнейшую роль в механизме реактивной гиперемии, то ее выраженное снижение, возникающее уже после 0,5-ти часового иммобилизационного стресса, указывало на возможность нарушения функциональных свойств эндотелия («оглушенность» эндотелиоцитов) даже после вполне кратковременного воздействия стрессора. Защитное действие N-ацетил-L-цистеина на тонус коронарных сосудов при стрессе являлось, вероятно, комплексным. Какая-то часть его положительных эффектов при стрессе могла быть опосредована оксидом азота. Результаты экспериментов показали, что предварительное введение N-ацетил-L-цистеина при стрессе повышало содержание в крови продуктов деградации монооксида азота, а внутрикоронарное введение сопровождалось коронародилатацией, обусловленной высвобождением эндотелиального NO. Возможно, это было связано с высвобождением монооксида азота из его депонированных форм. Хотя не исключено, что N-ацетил-L-цистеин способен повышать активность эндотелиальной NO-синтазы при стрессе через редокс-чувствительные механизмы регуляции функций этого фермента. Реализация этих двух механизмов действия N-ацетил-L-цистеина могла обеспечить уменьшение базального тонуса коронарных сосудов в контроле и после стресса при внутрикоронарном введении N-ацетил-L-цистеина. Еще один механизм защитного действия N-ацетил-L-цистеина на тонус коронарных сосудов при стрессе заключается, вероятно, в его прямом влиянии на редокс-состояние клеток, по крайней мере, через стимуляцию синтеза глутатиона и последующее изменение баланса между окисленным и восстановленным глутатионом. Изменение этого баланса далее может влиять на функцию редокс-чувствительных внутриклеточных факторов, регулирующих сократительную функцию клеток. Таким образом, результаты экспериментов показали, что N-ацетил-L-цистеин обладает свойствами, позволяющими рассматривать его в качестве перспективного лекарственного препарата для ограничения обусловленных стрессом нарушений тонуса коронарных сосудов [12; 13].

Целью исследования в данной главе явился сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ при моделировании

острого и хронического стресса. Для достижения этой цели экспериментальные животные были разделены на три группы: первая группа – интактные крысы (контроль), вторая группа – острый стресс (фиксация в положении на спине на протяжении 6 часов или помещение крыс в пенал для иммобилизации с фиксацией шеи) и третья группа – хронический стресс (ежедневная иммобилизация животных в пеналах по 60-90 минут на протяжении 10-14 суток). Для исследования кровь забиралась через 24 часа после завершающей иммобилизации.

В таблице 2.1 представлены материалы по сравнительной характеристике органных и гормональных показателей при остром и хроническом стрессовом воздействии.

Таблица 2.1

Выраженность стресс-реакции, концентрация гормонов, интерлейкинов в сыворотке крови и продуктов деградации монооксида азота (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>)

Показатель	Контроль	Острый стресс	Хронический стресс
Относительная масса надпочечников, мг/100 г массы тела	25,3±0,9	30,2±0,7 <sup>1</sup>	29,8±0,74 <sup>1</sup>
Относительная масса тимуса, мг/100 г массы тела	205,7±13,5	173,4±3,30 <sup>1</sup>	175,3±4,79 <sup>1</sup>
Относительная масса селезенки, мг/100 г массы тела	485,6±12,1	451,5±17,2	414,2±6,45 <sup>1</sup>
Кортикостерон сыворотки крови, нМ/л	7,5±1,2	23,0±2,7 <sup>1</sup>	10,7±2,5
Трийодтиронин, нмоль/л	2,33±0,04	2,10±0,10 <sup>1</sup>	2,11±0,07 <sup>1</sup>
Тироксин, нМ/л	45,6±2,9	38,4±2,5 <sup>1</sup>	43,6±2,11
Тиреотропный гормон, мМЕ/л	0,29±0,03	0,30±0,10	0,30±0,04

*Примечание:* <sup>1</sup> – p < 0,05 по сравнению с контролем; <sup>2</sup> – в каждой группе по 12 животных.



Из анализа данных табл. 3.1 следует, что относительная масса надпочечников достоверно повышена, а относительная масса тимуса снижена при остром и хроническом стрессе. Относительная масса селезенки снижена только при хроническом стрессе. Максимальная концентрация кортикостерона выявлена при остром стрессе; при хроническом стрессе уровень кортикостерона снижается, хотя еще превышает контрольные значения на 43%. Содержание трийодтиронина снижено как при остром, так и хроническом стрессе, а снижение уровня тироксина обнаружено только при остром стрессе.

На рубеже веков появились данные, что провоспалительные цитокины также участвуют в возникновении дисфункции эндотелия сосудов на ранних стадиях развития атеросклероза коронарных артерий и в регулировании липидного и углеводного обменов. Было высказано предположение, что провоспалительные цитокины – фактор некроза опухоли (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 (ИЛ-1) – опосредуют некоторые эффекты стресса и играют важную роль в возникновении риска заболеваний сердца и сосудов у человека [14; 15]. Исследования на грызунах показали, что различные стрессорные воздействия, такие как ограничение физической активности и экспозиция в «открытом поле» стимулируют увеличение в плазме концентрации ИЛ-6. Имобилизационный стресс приводит к образованию в гипоталамусе мРНК ИЛ-1. У человека, хронический стресс, такой как ожидание экзаменов и уход за больными родственниками, сопровождается увеличением уровня, циркулирующего в крови ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и рецепторов к ИЛ-1 (ИЛ-1Ra). Повышение в сыворотке крови концентраций ИЛ-6, ИЛ-1 и ИЛ-1Ra также были зарегистрированы при депрессии [16; 18]. Тем не менее, данные о влиянии острого стресса на уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови лабораторных крыс при моделировании у них острого эмоционального стресса (иммобилизация в пластиковых пеналах и на спине) оставались противоречивыми. Другим важным фактором являлось сопоставление интенсивности стресс-реакции при иммобилизации различной продолжительности и изменения уровня цитокинов в крови. В связи с этим была поставлена цель определить содержание провоспалительных интерлейкинов (ИЛ-1бета, ФНО- $\alpha$ ), в крови при остром иммобилизационном стрессе различной продолжительности и сопоставить их значения с выраженностью стресс-реакции. Для

достижения поставленной цели проводилось экспериментальное моделирование режимов иммобилизационного стресса различной продолжительности. Острый стресс воспроизводился иммобилизацией, которая осуществлялась путем фиксации животного в пластиковом пенале в течение 5 мин, 60 мин и 90 мин. Кроме того, острый стресс создавали путем фиксации крыс в положении на спине в течение 60 минут.

Концентрацию ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя тест-системы и реагенты ТОО "Цитокин" (С-Петербург), ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирская область, п. Кольцово), с помощью фотометра универсального Ф-300 ТП (Беларусь). Чувствительность наборов для определения ФНО- $\alpha$  была 2 пг/мл, ИЛ -1 $\beta$  - 1 пг/мл. В сыворотке крови контрольных животных обнаруживался только ИЛ-1 $\beta$  (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Концентрация провоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс при действии острого стресса различной продолжительности

Продолжительность стресса	ИЛ-1 $\beta$ (пкг/мл)	ФНО- $\alpha$ (пг/мл)
Контроль, n = 7	19,17 $\pm$ 2,58	0
Острый стресс (5 минут иммобилизация в пластиковом пенале), n = 6	12,17 $\pm$ 2,27 <sup>1</sup>	0
Острый стресс (60-минутная иммобилизация в пластиковом пенале), n = 7	38,29 $\pm$ 3,46 <sup>1</sup>	5,09 $\pm$ 1,31
Острый стресс (90 минутная иммобилизация в пластиковом пенале), n = 6	36,25 $\pm$ 1,8 <sup>1</sup>	5,42 $\pm$ 0,75
Острый стресс (60 минутная иммобилизация жесткой фиксацией на спине) n = 6	28,72 $\pm$ 1,29 <sup>1</sup>	5,45 $\pm$ 0,56

*Примечание:* <sup>1</sup> – p < 0,05 по сравнению с контролем.

Установлено, что после 5-минутной иммобилизации в пластиковых пеналах в сыворотке крови крыс уровень ИЛ-1 $\beta$  уменьшался на 36,5%. а ФНО- $\alpha$  не определялся. Увеличение продолжительности

сти пребывания крыс в пластиковых пеналах до 60 и 90 минут сопровождалось возрастанием концентрации в сыворотке крови ИЛ-1 $\beta$  почти в 2 раза. При этом разница в продолжительности иммобилизации существенного влияния не оказала на уровень цитокинов. Следует отметить, что после 60 мин и 90 мин иммобилизации у всех крыс в сыворотке крови появлялся ФНО- $\alpha$ . Более жесткая иммобилизация животных на спине в течение 60 мин, также, как и их пребывание в пластиковых пеналах в течение 60 и 90 мин, приводила к увеличению в крови ИЛ-1 $\beta$ , но в меньшей степени – на 45,6%. Подобно последствиям иммобилизации крыс в пеналах, после 60 мин жесткой фиксации на спине обнаруживался ФНО- $\alpha$ .

При определении выраженности изменений относительной массы стресс-зависимых органов было обнаружено, что после 5 мин фиксации животных в пластиковых пеналах относительная масса надпочечников увеличилась на 10% ( $p < 0,05$ , по сравнению с контролем), а селезенки и тимуса не изменилась. Подобный тип реакции свидетельствует о том, что 5 мин пребывания крыс в пластиковом пенале является мягким стрессорным воздействием. После 60 мин фиксации животных в пластиковых пеналах относительная масса надпочечников увеличилась в большей степени – на 19,5% ( $p < 0,05$ , по сравнению с контролем), а относительная масса селезенки и тимуса так же, как и при 5 мин фиксации не отличались от контроля. Пребывание крыс в пластиковых пеналах в течение 90 мин приводило к увеличению относительной массы надпочечников на 20% ( $p < 0,05$ , по сравнению с контролем) и достоверному уменьшению массы селезенки на 14%. Относительная масса тимуса при этом не изменялась. Фиксация крыс на спине в течение 60 мин, подобно 90 мин пребыванию крыс в пластиковых пеналах сопровождалась достоверным увеличением относительной массы надпочечников на 10% ( $p < 0,05$ , по сравнению с контролем), уменьшением массы селезенки на 17,4% ( $p < 0,05$ , по сравнению с контролем), и неизменной относительной массой тимуса.

По степени выраженности стресс-реакции, используемые модели можно ранжировать следующим образом: 5 мин фиксация в пластиковых пеналах является самым слабым воздействием. 60 мин более сильным, а 90 мин фиксация в пенале и 60 мин жест-

кая фиксация на спине мало отличаются друг от друга. Цитокиновый ответ у крыс, подвергнутых иммобилизации различной продолжительности, был быстрым и нарастал в пределах 90 мин.

Только мягкая 5 мин фиксация крыс в пластиковых пеналах сопровождалась уменьшением в крови ИЛ-1 $\beta$ , а 60 мин, 90 мин пребывание в пеналах и 60 мин жесткая фиксация на спине вызывали увеличение концентрации в сыворотке крови ИЛ-1 $\beta$  и появление детектируемого количества ФНО- $\alpha$ .

В таблице 2.3 представлены показатели, характеризующие развитие окислительного стресса при иммобилизации животных.

Таблица 2.3

Содержание ДК, МДА в миокарде и АОА, ПОЛ и NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> в сыворотке крови при остром и хроническом стрессе

Показатель	Контроль (n = 11)	Острый стресс (n = 8)	Хронический стресс (n = 7)
ДК, нМ/г липидов	110,2 $\pm$ 9,66	247,0 $\pm$ 14,0 <sup>1</sup>	209,6 $\pm$ 34,0 <sup>1</sup>
МДА, нМ/г белка	53,9 $\pm$ 4,40	410,3 $\pm$ 33,1 <sup>1,2</sup>	92,5 $\pm$ 9,1 <sup>1</sup>
(АОА) S, мВ $\times$ сек	11,143 $\pm$ 0,120	9,316 $\pm$ 0,39 <sup>1,2</sup>	11,28 $\pm$ 0,21
(ПОЛ) I max, мВ	1,1853 $\pm$ 0,0112	1,164 $\pm$ 0,034	1,245 $\pm$ 0,049
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> -, мкМ/л	23,7 $\pm$ 0,48	32,0 $\pm$ 1,5 <sup>1</sup>	39,8 $\pm$ 0,9 <sup>1</sup>

*Примечание:* <sup>1</sup> – P < 0,05 при сравнении с контролем;  
<sup>2</sup> – P < 0,05 при сравнении с группой «хронический стресс».

Из анализа данных табл. 3.3 следует, что в миокарде крыс достоверно повышено содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида как при остром, так и при хроническом стрессе. В отличие от постоянной повышенной концентрации диеновых конъюгатов у всех стрессированных крыс, уровень малонового диальдегида был повышен в 7,61 раза при остром стрессе, а при хроническом стрессе превышал исходный уровень всего в 1,72 раза. В плазме крови показатель перекисного окисления липидов не изменялся при иммобилизации крыс, но антиоксидантная активность оказалась достоверно сниженной при остром стрессе. При остром и хроническом стрессе отмечено повышение величин

## Стресс и тонус сосудов

отношения  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ . Приведенные данные не противоречат общепринятым характеристикам иммобилизационного стресса.

В таблице 2.4 представлены данные о зависимости биохимических показателей обмена веществ в сыворотке крови крыс от типа стрессового воздействия.

Таблица 2.4

Биохимические показатели при остром и хроническом иммобилизационном стрессе у крыс

Показатель	Группа животных		
	Контроль (n = 10)	Острый стресс (n = 12)	Хронический стресс (n = 7)
Глюкоза, ммоль/л	6,98±0,23	9,02±0,55 <sup>1</sup>	7,87±0,25 <sup>1</sup>
Триглицериды, ммоль/л	1,17±0,10	0,57±0,02 <sup>1</sup>	1,25±0,14
Глюкоза/ триглицериды	5,96±0,55	15,8±0,87 <sup>1</sup>	6,30±0,52
Мочевина, ммоль/л	5,41±0,19	6,77±0,35 <sup>1</sup>	5,46±0,11
Билирубин, мкмоль/л	3,97±0,09	4,27±0,20	3,73±0,19
Мочевая кислота, ммоль/л	0,10±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01
Холестерол, ммоль/л	1,60±0,09	1,70±0,12	1,63±0,11
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,69±0,03	0,64±0,04	0,73±0,04
ХС ЛПНП, ммоль/л	0,91±0,02	1,06±0,03 <sup>1</sup>	0,90±0,04
ХС ЛПНП/ХС ЛПВП	1,32±0,07	1,65±0,09 <sup>1</sup>	1,23±0,11
Общий белок, г/л	83,3±2,06	68,4±0,83 <sup>1</sup>	79,0±0,90
АлАТ, Ед/л	73,7±4,64	101,8±4,83 <sup>1</sup>	91,4±3,38 <sup>1</sup>
АсАТ, Ед/л	207±15,1	480±26,4 <sup>1</sup>	253±14,9 <sup>1</sup>
ЩФ, Ед/л	190±18,7	193±16,1	195±20,5
КФК, Ед/л	2769±176	4561±303 <sup>1</sup>	4087±357 <sup>1</sup>

Примечание: <sup>1</sup> – P < 0,05 по сравнению с группой крыс «контроль».

Из анализа данных таблицы 2.4 следует, что при остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы в 1,29 раза и уменьшается концентрация триглицеридов в 2,05 раза. Такие изменения обеспечивают статистически достоверное увеличение коэффициента глюкоза/триглицериды в 2,65 раза. Следовательно, шестичасовая фиксация животных в нефизиологическом положении приводит к мобилизации углеводных ресурсов клеток, что усиливает транспорт глюкозы, на фоне частичного истощения содержания триглицеридов в кровеносном русле. По всей видимости, это рациональная форма перераспределения соотношения транспортных форм энергии, поскольку для центральной нервной системы глюкоза является наиболее быстро мобилизуемым и предпочтительным источником обеспечения клеток энергией. При хроническом стрессе отмечаются признаки адаптации, поскольку концентрация глюкозы статистически достоверно повышена только в 1,13 раза, а уровень циркулирующих триглицеридов находится в пределах контрольных значений. В итоге значения коэффициента глюкоза/триглицериды практически не отличаются от контрольных значений.

Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменяется при обоих вариантах стрессового воздействия, но содержание мочевины увеличивается при остром стрессе. Причинами роста концентрации сывороточной мочевины в результате шестичасовой иммобилизации могут быть два процесса: либо это усиление синтеза мочевины при повышенном катаболизме гликогена в печени, либо - уменьшение фильтрационной функции почек за счет спазма сосудов при остром стрессе. Следовательно, можно сделать заключение, что при испытанных моделях стрессового воздействия не нарушаются превращения гемоглобина в билирубин, пуриновых азотистых оснований нуклеотидов и нуклеиновых кислот до мочевой кислоты и пути синтеза холестерина из основного метаболита общего пути катаболизма – ацетил-КоА.

Острый стресс приводит к достоверному уменьшению общего белка в сыворотке крови при одновременном увеличении содержания холестерина липопротеинов низкой плотности и величины отношения ХС ЛПНП/ХС ЛПВП. Такие результаты возможны при тканевом депонировании крови при остром стрессе, приводящем к

уменьшению циркулирующей плазмы крови и кажущемуся накоплению в ней глобулинов, транспортирующих холестерол [6]. Поскольку уровень общего холестерина в сыворотке крови у этих животных не изменялся, можно в увеличении показателей ХС ЛПНП и ХС ЛПНП/ХС ЛПВП видеть признаки проатерогенного действия острого стресса.

Анализ изменений ферментативных показателей сыворотки крови свидетельствует о том, что проницаемость мембран клеток паренхиматозных органов может быть наиболее уязвимым процессом при действии стрессовых факторов. Такое заключение иллюстрирует статистически достоверное увеличение активности АЛАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Активность щелочной фосфатазы, являющейся индикатором состояния мембран клеток желчевыводящих путей и костной ткани, не изменяется при обоих вариантах иммобилизационного стресса. Зависимость активности ферментов от характера стрессового воздействия наиболее четко проявляется при сравнении некоторых коэффициентов. Например, величины коэффициента АсАТ/АЛАТ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе составили 2,81, 4,71 и 2,77, соответственно, что означает, что острый стресс вызывает преимущественный выход в плазму крови аспаргат-аминотрансферазы, вероятно из мышечных тканей. Величины коэффициента КФК/ЩФ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе составили 14,57, 23,6 и 20,9, соответственно. Такие изменения подтверждают факт выхода КФК из мышечной ткани при обоих вариантах стресса. И, наконец, сравнение величин коэффициента КФК/АсАТ в контроле, при остром стрессе и хроническом стрессе (13,4, 9,5 и 16,2, соответственно) показывает, что при остром стрессе выход в кровь АсАТ выше, чем аналогичный выход КФК. Однако при хроническом стрессе преобладает выход в кровеносное русло креатинфосфокиназы, что свидетельствует о повреждении саркомеров мышечных волокон.

Итак, установлено, что содержание в миокарде крыс диеновых конъюгатов и ТБК-позитивных веществ достоверно увеличивалось при остром и хроническом стрессе. Однократная и десятикратная иммобилизации крыс не оказали влияния на активность процесса

перекисного окисления липидов, но величина антиоксидантной активности оказалась сниженной на 16,4% только при остром стрессе. Содержание суммы нитратов и нитритов в сыворотке крови стрессированных животных повышалось в 1,35 раза при остром стрессе и 1,68 раза – при хроническом стрессе. Следовательно, можно предполагать, что нарушения сердечно-сосудистой системы при стрессе могут быть связаны с влиянием активных форм кислорода на NO-синтазные реакции. Установлены фенотипические показатели обмена веществ в сыворотке крови, позволяющие выявить существенные различия в развитии острого и хронического стресса. При остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы, мочевины, ХС ЛПНП и уменьшается концентрация триглицеридов и общего белка. Такие изменения биохимических показателей при остром стрессе приводят к почти трехкратному повышению величины коэффициента глюкоза/триглицериды, а также к незначительному, но достоверному повышению величины коэффициента ХС ЛПНП/ХС ЛПВП.

Повышенное содержание глюкозы в сыворотке крови сохраняется и при хроническом стрессе. Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменяется при остром и хроническом стрессе. Выявлено статистически достоверное увеличение активности АлАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Активность щелочной фосфатазы не изменяется при обоих вариантах иммобилизационного стресса [19].

### Список использованной литературы к главе 2

1. Селье Г. На уровне целого организма. – М: Наука, 1972. – 122 с.
2. Элбакидзе Г.М. Внутритканевое регулирование клеточной массы и тканевый стресс / Г.М. Элбакидзе, А.Г. Элбакидзе. – М., 2007. – 150 с.
3. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
4. Чиркин А.А. Биологическая химия: учебник / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – Минск: Вышэйшая школа, 2017. – 411 с.
5. Литвицкий П.Ф. Патопфизиология: учебник / П.Ф. Литвицкий. – 4-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 496 с.



6. Anderson, R.M. A role for Dicer in aging and stress survival / R.M. Anderson // *Cell Metabolism*. – 2012. – Vol. 16. Issue 3. – P. 285–286.

7. Mori, M.A. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity / M.A. Mori [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2012. – Vol. 16. Issue 3. – P. 336–347.

8. Яцковская Н.М. Состояние вазоконстрикции и эндотелийзависимой дилатации при моделировании окислительного стресса введением параквата / Н.М. Яцковская, А.А. Чиркин // *Новости медико-биологических наук*. – 2020. – Т. 20. №1. – С 23–29.

9. Чиркин А.А. Тонус кровеносных сосудов и окислительный стресс / А.А. Чиркин, Н.М. Яцковская // *Новости медико-биологических наук*. – 2020. – Т. 20. №3. – С. 170–180.

10. Дорошенко А.С. Редокс-состояние клеток миокарда, тонус коронарных сосудов и сократительная активность сердца при иммобилизационном стрессе / А.С. Дорошенко, А.П. Солодков, В.И. Шебеко // *Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: тр. II междунар. науч.-практ. конф. (23–24 мая 2002 г.)*. – Витебск: ВГМУ, 2002. – С. 94–98.

11. Беляева Л.Е. Коррекция дисфункции эндотелия N-ацетилцистеином: редокс-зависимые механизмы его влияния / Л.Е. Беляева, В.И. Шебеко, А.П. Солодков // *Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Труды III-й международной научно-практической конференции*. – Витебск, 2004. – С. 72–79.

12. Дорошенко А.С. Влияние n-ацетил-L-цистеина на ауторегуляцию коронарного потока при стрессе различной продолжительности / А.С. Дорошенко А.С., Солодков, В.И. Шебеко // *Вестник ВГМУ*. – 2004. – Т. 3. №2. – С. 25–38.

13. Солодков А.П. Эндотелий, ауторегуляция коронарных сосудов и стресс / А.П. Солодков, А.С. Дорошенко, В.И. Шебеко [и др.] // *Вестник фонда фундаментальных исследований*. 2005. – 1 (31). – С. 79–94.

14. Ghiadoni, L. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans / L. Ghiadoni, A. Donald, M. Copley [et al.] // *Circulation*. – 2000. - Vol. 102. – P. 2473–2478.

15. Yudkin, J.S. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? / J.S. Yudkin, M. Kumari, S.E. Humphries [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2000. – Vol. 148. – P. 209–214.

16. Maes, M. Increased serum interleukin-1-receptor-antagonist concentrations in major depression / M. Maes, E. Vandoolaeghe, R. Ranjan [et al.] // *J. Affective Disord.* – 1995. – Vol. 36. – P. 29–36.

17. Minami, M. Immobilization stress induces interleukin-1 beta mRNA in the rat hypothalamus / M. Minami, Y. Kuraishi, T. Yamaguchi [et al.] // *Neurosci. Lett.* 1991. – Vol. 123. – P. 254–256.

18. Connor, T.J. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders / T.J. Connor, B.E. Leonard // *Life Sci.* – 1998. – Vol. 62. – P. 583–606.

19. Яцковская Н.М. Особенности обмена веществ и тонуса сосудов при иммобилизационном стрессе у крыс / Н.М. Яцковская, А.А. Чиркин // *Вестник ВДУ.* – 2021. – №4 (113). – С. 36–44

### ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТОНУС ПЕРФУЗИРУЕМОГО ФРАГМЕНТА АОРТЫ

Развитие эндотелиопатий вследствие уменьшения образования, высвобождения или повышенной инактивации эндотелиальных вазодилататоров (монооксид азота, простаглицлины, простаглицлины A1, A2, E1, брадикинин, гистамин, ацетилхолин и др.), а также взаимодействия монооксида азота с ангиотензином-2, активными формами кислорода и окисленными липопротеинами рассматривается в качестве важного фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний. Центральным механизмом образования монооксида азота в NO-синтазной реакции является окисление гуанидинового азота L-аргинина при участии супероксидных анион-радикалов, образующихся на домене P-450 NO-синтазы. Образованный монооксид азота в присутствии кислорода и его активных форм превращается в NO<sub>2</sub> и NO<sub>3</sub>, а также пероксинитрит [1].

Ранее было показано, что 60-минутный иммобилизационный стресс, характеризующийся увеличением относительной массы надпочечников на 19,5%, концентрацией глюкокортикоидов в 2 раза, стабильных продуктов распада монооксида азота (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) на 35%, тиреотропного гормона на 45%, интерлейкина-1β (в 2 раза), появлением в сыворотке крови фактора некроза опухоли-α, и снижением уровня тироксина на 16% и триодтиронина на 10%, сопровождался двумя типами реакции изолированного кольца аорты на ацетилхолин и фенилэфрин. Первый выражался в усилении индуцированной ацетилхолином дилатации изолированного кольца аорты и уменьшением ее ответа на α1-адренэргический стимулятор фенилэфрин. Второй проявлялся уменьшением ответа изолированного кольца аорты крыс на ацетилхолин и усилением реакции на фенилэфрин. Оба типа реакции устранялись применением высокоселективного ингибитора индуцируемой NO-синтазы S-метилизотиомочевины, который при разном типе реакции действовал разнонаправлено [2,3]. Таким образом, при кратковременном стрессе в клетках эндотелия аорты крыс выявляется присутствие индуцибельной NO-синтазы, которая может быть в одном случае источником большого количества NO (сопряженное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы), а в другом – способствовать снижению его биодоступности (разобщенное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы) [4]. Такие изменения

сопровождались увеличением содержания в миокарде крыс диеновых конъюгатов и ТБК-положительных веществ при остром стрессе в 2,25 и 7,6 раза, а при хроническом стрессе в 1,5 и 1,7 раза соответственно.

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

Для иллюстрации этого положения целесообразно исследовать влияние окислительного стресса на тонус сосудов. В качестве ин-

дуктора окислительного стресса был выбран паракват: N,N' – диметил-4,4'-дипиридила дихлорид, относящийся к производным виологена с общей формулой  $(C_5H_4NR)_2 n+$  (рис. 3.1)

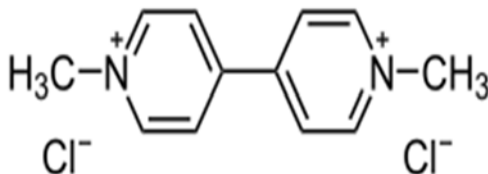


Рис. 3.1. Паракват

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

Всемирная организация здравоохранения (WHO) уделяет много внимания параквату, который благодаря циклическим окислительно-восстановительным процессам обеспечивает гербицидное действие (рис. 3.2).

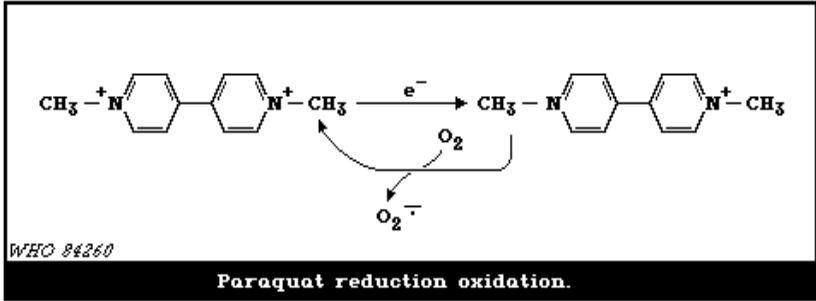


Рис. 3.2. Окислительно-восстановительные реакции параквата

Благодаря этим реакциям паракват является индуктором и исполнителем реакций окислительного стресса в клетках растений и животных (рис. 3.3).

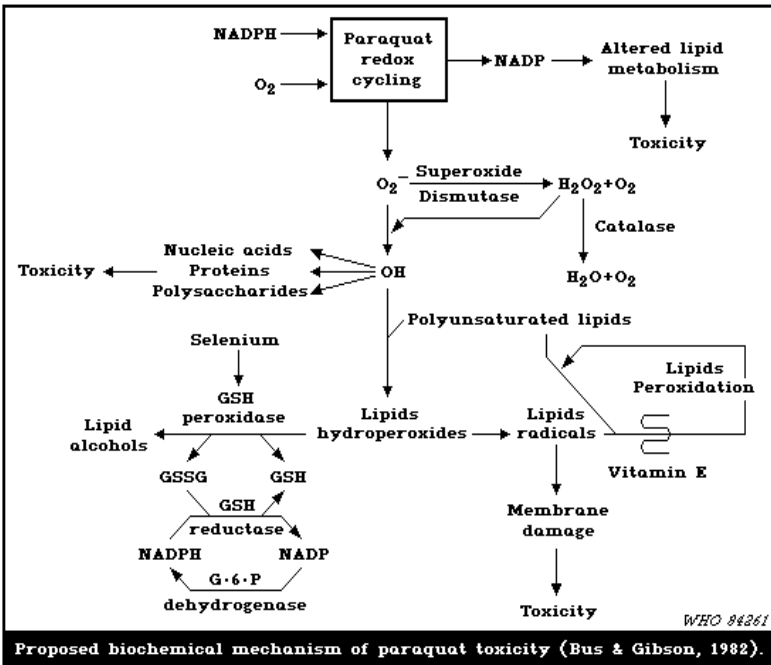


Рис. 3.3. Предполагаемый механизм развития окислительного стресса после введения параквата в организм

Целью данного раздела работы является исследование зависимой от эндотелия констрикции и дилатации кольца аорты при моделировании окислительного стресса у крыс посредством введения параквата. В настоящем исследовании, как и в предшествующих [2–5], для оценки тонуса сосудов использовали данные эндотелиальных адренергической констрикции и ацетилхолиновой дилатации кольца аорты.

Эксперименты были выполнены на 28 беспородных крысах-самках одной возрастной группы массой 180–210 г. Животные были разделены на две группы: контрольная и подопытная. В контрольную группу входили интактные животные ( $n = 14$ ). Животным подопытной группы ( $n = 14$ ) однократно интраперитонеально вводили паракват в дозе 20 мг/кг массы тела животного. По данным ВОЗ (1983 г.) для крысы граница проявления эффектов параквата лежит в диапазоне 1,5 мг/кг в сутки.

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

### **3.1. Влияние окислительного стресса, вызванного введением параквата на адренергическую констрикцию изолированного кольца аорты крысы**

Исходное напряжение кольца аорты во всех исследуемых группах животных не различалось и составляло в контрольной группе животных  $1831 \pm 19$  мг, а в группе подопытных животных после внутрибрюшинного введения параквата  $1824 \pm 22$  мг. Следовательно, введение фенилэфрина в перфузионный раствор происходило на фоне нормального напряжения кольца аорты. Увеличение концентрации  $\alpha_1$ -адреностимулятора фенилэфрина в органной ванночке от  $10^{-15}$  до  $10^{-3}$  М приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крысы (рис. 3.4).

В контроле увеличение напряжения изолированного кольца аорты крысы начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 41% от исходного напряжения), а при концентрации  $10^{-6}$  М ответная реакция возросла на 95% и достигала максимального значения.

У животных подопытной группы, перенесших интоксикацию паракватом *in vivo* и после обработки фрагментов аорты *in vitro* наблюдались отличия в сократительных реакциях аорты на введение  $\alpha_1$ -адреностимулятора. Предварительное внутрибрюшинное введение параквата приводило к снижению ответа на кумулятивное добавление фенилэфрина (рис. 3.4, А). В данной группе животных сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 11% от исходного напряжения) и достигало максимума при концентрации фенилэфрина  $10^{-6}$  М – прирост 51%. Поэтому можно сделать вывод, что в этой группе животных реакция кольца аорты действие  $\alpha_1$ -адреностимулятора была менее выражена по сравнению с контролем.

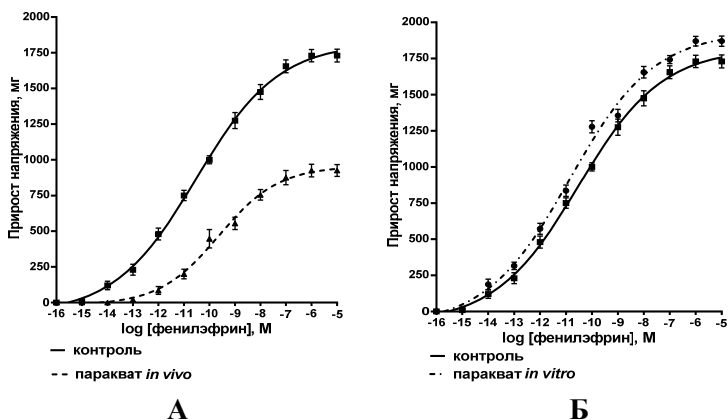


Рис. 3.4. (А) Влияние параквата *in vivo* и (Б) действие параквата *in vitro* на вазоконстрикторный ответ изолированного кольца аорты крысы при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор фенилэфрина

*Примечание:* по оси абсцисс – log концентрации фенилэфрина (М); по оси ординат – дельта сокращения в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор фенилэфрина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «паракват *in vivo*» и ● – паракват *in vitro*».

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



прироста напряжения достигался при концентрации фенилэфрина  $10^{-6}$  М (прирост на 101,6%, а в контроле на 95%) (рис. 3.4, Б).

Анализ цифрового материала, приведенного в таблице 3.1, показал, что внутрибрюшинное введение параквата животным, вероятно, снижало чувствительность аорты к действию  $\alpha_1$ -адреностимулятора, а предварительная обработка фрагмента аорты паракватом  $\alpha_1$ -адреностимулятора *in vitro* повышала ее чувствительность к фенилэфрину (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Изменения эндотелий зависимого сокращения аорты при интоксикации паракватом *in vivo* и после обработки фрагмента аорты *in vitro*

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

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

Известно, что при отсутствии предварительного спазма супероксидный анион-радикал и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оказывают вазоконстрикторное действие на аорту крыс. В условиях предварительного сужения агонистами GPCR (рецепторы, связанные G-белками) супероксидный анион-радикал и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывают смешанные, зависящие от концентрации, эффекты в системе ответов сокращение ↔ релаксация, причем доминирующим эффектом H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является релаксация [10; 11]. Кроме того, на наш взгляд, уменьшение выраженности вазоконстрикции аорты в условиях окислительного стресса, вызванного предварительным введением параквата, можно объяснить также тем, что активные метаболиты кислорода и азота оказывают обратимое повреждающее действие на мембранные рецепторные G-белки, ненасыщенные жирнокислотные компоненты фосфолипидов и ассоциированные с мембранами ферменты [12; 13]. Супероксидный анион-радикал и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в водных или гидрофобных средах способны изменять функцию белка посредством прямого окисления SH-групп остатков цистеина и создания, новых дисульфидных связей, приводя

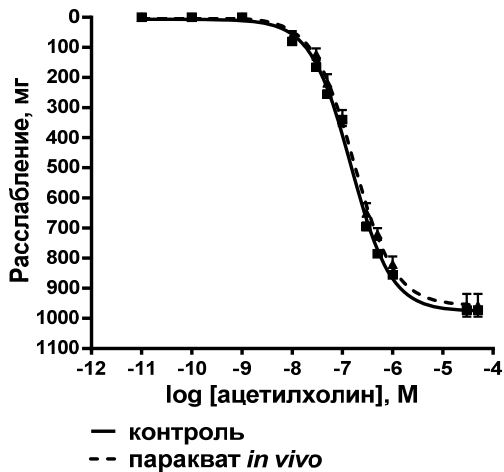
к конформационным изменениям молекул. В дополнение к прямому окислению с помощью активных метаболитов кислорода, остатки цистеина могут быть косвенно окислены пероксиредоксином или нитрозилированы монооксидом азота (NO·). Тиоредоксин также может катализировать транс-нитрозилирование цистеина нитрозоглутатионом, или цистеин может быть напрямую глутатионилирован окисленным глутатионом. Недавние работы показали, что окисление метионина может влиять на тонус сосудов. Остатки цистеина, лизина и гистидина также могут быть модифицированы посредством образования аддуктов Михаэля с пероксидами липидов, такими как 4-гидроксиноненал, образующимися при окислении полиненасыщенных жирных кислот. Такая форма модификации в липидной фазе может иметь особое значение для окислительной модификации мембраносвязанных белков гладких мышц сосудов, обеспечивших снижение чувствительности аорты подопытных крыс к действию  $\alpha_1$ -адреностимулятора [10; 14].

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

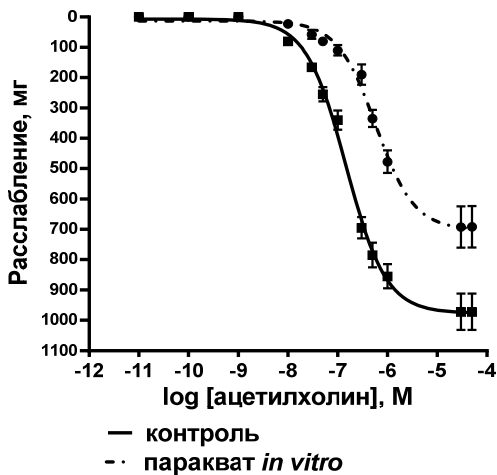
### **3.2. Влияние окислительного стресса, вызванного введением параквата на эндотелийзависимую дилатацию изолированного кольца аорты крыс**

Известно, что ацетилхолин вызывает эндотелийзависимую вазодилатацию. На рис. 3.5 представлены данные о влиянии предварительной обработки паракватом животных *in vivo* и фрагментов аорты крыс *in vitro* на расслабление изолированного кольца аорты крыс кумулятивным введением ацетилхолина.

При кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина дилатация кольца аорты контрольных крыс начиналась при концентрации  $10^{-7}$  М и составляла 22,68% (рис. 3.5). При этом максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 63,63%.



А



Б

Рис. 3.5 (А) Влияние параквата (*in vivo*) и (Б) действие параквата (*in vitro*) на дилатационный ответ изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина

*Примечание:* по оси абсцисс –  $\log$  концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина. ■ – группа «контроль»; ▲ – «паракват *in vivo*»; ● «паракват *in vitro*».

Введение параквата *in vivo* (внутрибрюшинно) не приводило к изменению эндотелий зависимой вазодилатации, так как реакция изолированного кольца аорты крыс на кумулятивное добавление в перфузионный раствор ацетилхолина практически не отличалось у животных этой группы по сравнению с контролем (рис. 3.5, А). В данной группе животных дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $10^{-7}$  М и составляла 21,2%, максимальная эндотелий зависимая дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 63,1%.

Чувствительность гладкомышечных клеток аорты животных при введении параквата *in vivo* практически не отличалась от контрольных значений  $1,67 \times 10^{-7}$ , (контроль –  $1,47 \times 10^{-7}$ , табл. 3.2).

Таблица 3.2

Влияние параквата на чувствительность к ацетилхолину изолированного кольца аорты крыс

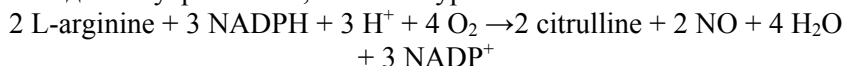
Группа	EC <sub>50</sub> , М	CI 95% EC <sub>50</sub> , М
Контроль (n = 14)	$1,47 \times 10^{-7}$	$1,20-1,80 \times 10^{-7}$
Паракват <i>in vivo</i> (n = 14)	$1,67 \times 10^{-7}$	$1,44-1,94 \times 10^{-7}$
Паракват <i>in vitro</i> (n = 14)	$5,67 \times 10^{-7}$	$4,45-7,61 \times 10^{-7}$

В группе животных, у которых изолированный фрагмент аорты был обработан паракватом *in vitro* (добавляли параквата в органную ванночку и инкубировали в течение 20 минут) введение параквата не изменяло базальное напряжение сосудов ( $3346 \pm 73$  мг), но значительно снижало вазодилаторный ответ изолированного кольца аорты при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина по сравнению с контрольной группой животных (рис. 3.5, Б).

В группе животных, у которых фрагмент аорты обрабатывался паракватом *in vitro*, дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $3 \times 10^{-7}$  М и составляла 12,6%, максимальная эндотелий зависимая дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 43,8%. При этом у

животных данной группы, наблюдалось уменьшение чувствительности гладкомышечных клеток изолированного кольца аорты к ацетилхолину.  $EC_{50}$  составила при введении параквата *in vitro*  $5,67 \times 10^{-7}$  М, тогда как в контроле –  $1,47 \times 10^{-7}$  М (табл. 3.2).

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



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

Итак, в данной главе приведены экспериментальные данные, которые демонстрируют возможность изучения тонуса аорты крыс: при прямом окислительном повреждении структурно- ферментативных ансамблей клеток эндотелия за счет циклических окислительно-восстановительных реакций введенного *in vivo* параквата; за счет отвлечения НАДФН из реакций, катализируемых эндотелиальным изоферментом NO-синтазы и 1, 2, 4 и 5 изоферментами НАДФ-оксидазы, что приводит к нарушению сигнальных путей, регулирующих контракильные функции гладких мышечных клеток.

Полученные результаты позволяют расширить представления о «метаболической памяти» и гомеостатической функции эндотелия в

поддержании тонуса сосудов. В последние годы появились фундаментальные исследования эпигенетических и генетических процессов в клетках с помощью индуктора свободно-радикальных процессов параквата [18; 19]. Перспективным является эффект окислительного повреждения ДНК паракватом *in vivo* с образованием 8-оксогуанина (8OG), мутагенного основания, которое при репликации вызывает мутации трансверсии G в T. С помощью технологии CRISPR-Cas9 был осуществлен нокаут 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (OGG1) и MUTYH-гликозилазы, двух ключевых ферментов, участвующих в эксцизионной репарации 8OG. Были созданы клетки AS52 с двойным нокаутом (DKO), более чувствительные к токсичности параквата, чем родительская (WT) линия клеток AS52 [19]. Это открывает уникальные возможности для дальнейших исследований прооксидантных свойств параквата и испытания антиоксидантных субстанций на клеточном уровне.

Итак, у животных подопытной группы, перенесших интоксикацию паракватом *in vivo* и после обработки фрагментов аорты *in vitro* наблюдались отличия в сократительных реакциях аорты на введение  $\alpha_1$ -адреностимулятора. В процессе проведенных исследований установлено, что предварительное внутрибрюшинное введение параквата приводило, к снижению ответа на кумулятивное добавление фенилэфрина животных и реакция кольца аорты на действие  $\alpha_1$ -адреностимулятора была, менее выражена по сравнению с контролем. Выявлено, что предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* обеспечила более сильную реакцию на фенилэфрин. Анализ полученных результатов, показал, что внутрибрюшинное введение параквата животным, вероятно, снижало чувствительность аорты к действию  $\alpha_1$ -адреностимулятора, а предварительная обработка фрагмента аорты паракватом  $\alpha_1$ -адреностимулятора *in vitro* повышала ее чувствительность к фенилэфрину. Полученные результаты демонстрируют, что внутрибрюшинное введение параквата не приводило к изменению эндотелий зависимой вазодилатации, так как реакция изолированного кольца аорты крыс на кумулятивное добавление в перфузионный раствор ацетилхолина практически не отличалось у животных этой группы по сравнению с контролем. Установлено, что в группе животных, у которых изолированный фрагмент аорты был обработан паракватом *in vitro* введение параквата, не изменяло базальное напряжение

сосудов, но значительно снижало вазодилататорный ответ изолированного кольца аорты при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина по сравнению с контрольной группой животных. Чувствительность гладкомышечных клеток аорты животных при введении параквата *in vivo* практически не отличалась от контрольных значений. В группе животных, у которых фрагмент аорты обрабатывался паракватом *in vitro*, наблюдалось уменьшение чувствительности гладкомышечных клеток изолированного кольца аорты к ацетилхолину [19].

### Список использованной литературы к главе 3

1. Bauer, V. Nitric oxide – the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions / V. Bauer, R.Sotnikova // Gen. Physiol. Biophys. – 2010. – Vol. 29. – P. 319–340.

2. Солодков А.П. Изменения эндотелийзависимой дилатации и  $\alpha_1$ -адренореактивности аорты крыс, вызванные ингибированием индуцируемой NO-синтазы после ограничения двигательной активности / А.П. Солодков, Н.М. Яцковская // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2013. – Т. 99. №7. – С. 859–868.

3. Солодков А.П. Провоспалительные цитокины и эндотелийзависимая дилатация при остром стрессе / А.П. Солодков, Н.М. Яцковская, Н.А. Крайнова [и др.] // Фундаментальные и прикладные проблемы стресса: материалы 3-й Международной научно-практической конференции (Витебск, 16–17 апреля 2013 г.). – Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2013. – С. 83–87.

4. Яцковская Н.М. К вопросу об образовании индуцибельной NO-синтазы в аорте стрессированных крыс // Свободные радикалы в химии и жизни. Тез. докл. 3-й Междунар. конф. (Минск, 10–11 октября 2019 г.) / отв. ред. О.И. Шадыро. – Минск: БГУ, 2019. – С. 87.

5. Лазуко С.С. NO-зависимые механизмы регуляции адренореактивности артериальных сосудов после иммобилизационного стресса // Веснік ВДУ. – 2019. – №2 (103). – С. 59–65.

6. Гурская А.И. Биохимические критерии острого и хронического стресса при иммобилизации крыс / А.И. Гурская, Е.А. Отвалко, Н.М. Яцковская, А.А. Чиркин // Веснік ВДУ. – 2017. – №1 (98). – С. 61–65.

7. Яцковская Н.М. Некоторые параметры свободно-радикальных процессов в миокарде и сыворотке крови крыс при моделировании острого и хронического стресса / Н.М. Яцковская, А.А. Чиркин // Свободные радикалы в химии и жизни. Тез. докл. 3-й Международ. конф. (Минск, 10–11 октября 2019 г.) / отв. ред. О.И. Шадыро. – Минск: БГУ, 2019. – С. 88.

8. Яцковская Н.М. Связь вазоконстрикторного эффекта с введением крысам 1,1'-диметил-4,4'-дипиридиinium дихлорида (паракват) / Н.М. Яцковская, А.А. Чиркин // Свободные радикалы в химии и жизни. Тез. докл. 3-й Международ. конф. (Минск, 10–11 октября 2019 г.) / отв. ред. О.И. Шадыро. – Минск: БГУ, 2019. – С. 86.

9. Doran, M.L. Metabolomic analysis of oxidative stress: Superoxide dismutase mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster* / M.L. Doran M.L. [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2017. – Vol. 113. – P. 323–334.

10. Knock, G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signaling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension // Free Radic. Biol. Med. – 2019. – Vol. 145. – P. 385–427.

11. Ding, Y. Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone / Y. Ding [et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286. – P. 31799–31809.

12. Tejero, J. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation / J. Tejero, S. Shiva, M.T. Gladwin // Physiol. Rev. – 2019. – Vol. 99. – P. 311–379.

13. Moller, M.N. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems / M.N. Moller [et al.] // J. Biol. Chem. – 2019. – Vol. 294. – P. 14776–14802.

14. Trevisani, M. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1 / M. Trevisani [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2007. – Vol. 104. – P. 13519–13524.

15. Liao, Y. NADPH oxidase 4 and endothelial nitric oxide synthase contribute to endothelial dysfunction mediated by histone methylations in metabolic memory / Y. Liao [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2018. – Vol. 115. – P. 383–394.



16. Yang, M. CD36 signaling in vascular redox stress / M. Yang, R.L. Silverstein // *Free Radic. Biol. Med.* – 2019. – Vol. 136. – P. 159–171.

17. Cholan, P.M. TRAIL protects against endothelial dysfunction *in vivo* and inhibits angiotensin-II-induced oxidative stress in vascular endothelial cells *in vitro* / P.M. Cholan [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 126. – P. 341–349.

18. Tajai, P. An engineered cell line lacking OGG1 and MUTYH glycosylases implicates the accumulation of genomic 8-oxoguanine as the basis for paraquat mutagenicity / P. Tajai [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 116. – P. 64–72.

19. Яцковская Н.М. Состояние вазоконстрикции и эндотелийзависимой дилатации при моделировании окислительного стресса введением параквата / Н.М. Яцковская, А.А. Чиркин // *Новости медико-биологических наук.* – 2020. – Т. 20. №1. – С. 23–29.

## ГЛАВА 4. ОСТРЫЙ ИММОБИЛИЗАЦИОННЫЙ СТРЕСС И ТОНУС ПЕРФУЗИРУЕМОГО ФРАГМЕНТА АОРТЫ

Более 35 лет тому назад были подведены некоторые итоги моделирования стресса путем иммобилизации животных. В основном этот метод использовался в качестве «стрессора» для индукции синдромов стрессовой реакции у животных. Многие такие синдромы были охарактеризованы от поведенческого уровня до нейрохимических механизмов неспецифических реакций организма. Иммобилизация животных оказалась полезным методом для изучения как центральных, так и периферических механизмов расстройств, связанных со стрессом, а также для изучения воздействия лекарств на эти расстройства [1]. В настоящее время выделяют два вида иммобилизационного стресса – сдерживание и иммобилизация [2]. Стрессы сдерживания и иммобилизации включают удержание грызунов в закрытых камерах для ограничения движения в течение длительного периода времени. Сдерживающее состояние обычно достигается путем помещения животных в трубы из оргстекла или проволочной сетки [3–6]. Иммобилизация достигается обычно прикреплением конечностей и головы животного в положении лежа к деревянным доскам [7; 8]. В настоящее время протоколы сдерживания и иммобилизации четко не различаются, и эти два термина часто используются как взаимозаменяемые. Хотя сдерживание и иммобилизация схожи в том, что они являются факторами стресса, вызванными ограничением движения, важно проводить различие между ними, поскольку сдерживание не предотвращает, а только ограничивает движения конечностей, тела и головы грызуна. Соответственно, иммобилизация вызывает более сильные реакции, чем сдерживание [9; 10]. До настоящего времени нет сравнительных исследований в пользу какого-либо одного протокола острого стресса. Кроме того, имеются сообщения о половых особенностях проявлений иммобилизационного стресса: стимул значимости местоположения пищевого вознаграждения (отслеживание целей) был увеличен у самцов крыс, а предвзятость в отношении сигналов, связанных с пищевым вознаграждением (отслеживание знаков), была увеличена у самок крыс. Иммобилизационный стресс вызывает долгосрочную десенсибилизацию оси

гипоталамус-гипофиз-надпочечники (HPA) после повторного воздействия того же (гомотипического) стрессора и сенсibilизации к новому (гетеротипическому) стрессору [11–15].

Надпочечники вырабатывают кортикостерон в ответ на стресс, и этот гормон играет важную роль в формировании памяти. Он запускает транскрипцию нейротрофического фактора мозга (BDNF) через активацию рецептора N-метил-d-аспарагиновой кислоты (NMDA) [16; 17].

В одной из недавних публикаций рассматривался вопрос о целесообразности использования грызунов в качестве модельных организмов для воспроизведения стресса. В качестве патологического состояния был отобрано посттравматическое стрессовое расстройство, которое является результатом травматических переживаний человека. Авторы показали, что модели на грызунах могут имитировать индукцию стресса и развитие расстройства. Манипулируя типом, интенсивностью, продолжительностью и частотой стресса, доклинические модели отражают основные фенотипы посттравматического стресса, измеренные с помощью различных поведенческих анализов. Чтобы информировать о валидности модели посттравматического стрессового расстройства и ее актуальности для психопатологии человека, авторы предложили, чтобы модели включали в себя батареи поведенческих тестов, индивидуальные различия, половые различия, эффекты стресса в раннем возрасте, биомаркеры, строгие критерии успеха для разработки лекарств, критерии области исследования, технологические достижения и межвидовые сравнения. Они пришли к выводу, что, несмотря на проблемы, исследования на животных будут иметь решающее значение для прогресса в понимании посттравматического стрессового расстройства и нейробиологии стресса [2].

Острый иммобилизационный стресс в течение 30 минут через 60 минут нарушил формирование памяти и снизил экспрессию мРНК BDNF и ацетилирование H3K14 в гиппокампе мышей из-за высокого уровня кортикостерона. Это означает, что реакции организма на острый стресс на протяжении часа после воздействия вызывают изменения экспрессии генов (генетический уровень) и эпигенетические изменения, связанные с функциональным состоянием нуклеосомного аппарата ядра (ацетилирование гистонов) [18]. Стресс вызывает высокий уровень свободных радикалов

и активных форм кислорода / азота и нейровоспаление в областях мозга, участвующих в патофизиологии депрессии и тревоги [19].

Особое значение имеет стресс на функционирование сердечно-сосудистой системы. Российские ученые провели исследование на крысах, которых подвергали иммобилизационному стрессу (24 ч). Установлено, что стресс приводит к гипертрофии надпочечников, инволюции тимуса, селезенки, появлению язв желудка, увеличению уровня кортизола и кортикостерона в сыворотке крови. Одновременно в 12 раз возрастает аккумуляция  $^{99m}\text{Tc}$ -пирофосфата в сердце. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крыс было показано, что стресс приводит к уменьшению давления, развиваемого левым желудочком, и увеличению конечного диастолического давления, но не влияет на коронарный проток. Морфологическое исследование показало, что стресс вызывает появление сегментарной контрактуры, интерстициального отека, кариопикноза. Стресс не влиял на уровень креатинфосфокиназы (КФК) в перфузате, оттекающем от сердца, уровень КФК в сыворотке крови и показатели ЭКГ [20]. В главе 2 этой монографии было показано, что при количестве суммы нитритов и нитратов повышается при остром стрессе на 35,5%, а при хроническом стрессе – на 67,9%. В связи с этим представляло интерес изучение соотношения вазоконстрикторных и вазодилаторных эффектов в перфузируемых фрагментах аорты крыс.

Как упоминалось ранее, синтез оксида азота катализируется тремя изоформами синтазы оксида азота: нейрональной (NOS1/nNOS), индуцибельной (NOS2/iNOS), эндотелиальной (NOS3/eNOS). Наиболее важный фермент для продукции оксида азота в сосудах – эндотелиальная синтаза оксида азота. При гипертензии содержание NOS3 по одним данным снижается, а по другим – повышается. В то же время эндотелийзависимая дилатация может сохраняться у нокаутных по гену *eNOS* (*eNOS*<sup>-/-</sup>) мышей, что свидетельствует о включении компенсаторных механизмов регуляции тонуса сосудов у этих животных. Потеря продукции монооксида азота, синтезируемого посредством NOS3, может быть компенсирована за счет оксида азота, синтез которого катализируется другими изоформами NO-синтазы, NOS1 и NOS2. Экспрессия NOS2 не обнаруживается в сосудистой системе в нормальных фи-

зиологических условиях и, вероятно, не участвует в регуляции базального уровня сосудистого тонуса и давления крови. Однако при ряде патологий, когда усиливается выработка провоспалительных белков, например, фактора некроза опухоли (TNF $\alpha$ ), можно наблюдать индукцию экспрессии гена *NOS2* и повышение содержания, кодируемого им белка. В то же время данные об изменении содержания и активности *NOS2* при развитии гипертензии противоречивы. В одних исследованиях зарегистрировано повышение содержания и активности этого белка в разных тканях, в том числе и в миокарде у крыс со спонтанной гипертензией. В других работах не обнаружено различий в активности данного фермента в нормальных физиологических условиях и при экспериментально вызванной гипертонии. Таким образом, роль индуцибельной NOS в изменении продукции NO при гипертензии до конца не понятна [21]. В связи с этим целью настоящего раздела было выяснение влияния высокоселективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины на изменение эндотелий-зависимой вазодилатации и  $\alpha_1$ -адренореактивности изолированного кольца аорты крыс, перенесших ограничение двигательной активности. Для этого блокаду iNOS осуществляли S-метилизотиомочевиной (S-MT,  $10^{-6}$ М, Sigma, USA) [22].

### 4.1. Эндотелий-зависимая вазодилатация изолированного кольца аорты крыс

Исходное напряжение кольца аорты во всех исследуемых группах животных не различалось и составляло  $1837 \pm 16$  мг. Сократительный ответ кольца аорты на фенилэфрин ( $10^{-6}$  М) в среднем достигал значения  $3517 \pm 96$  мг. В контрольной группе животных после добавления ацетилхолина дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $10^{-7}$  М и составляла 23,4% (рис. 4.1). При этом максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 57%.

У животных, перенесших острый стресс, реакция кольца аорты на ацетилхолин значительно различалась. Это дало нам возможность разделить всех стрессированных животных на две подгруппы. У животных первой подгруппы «острого стресса» дилатация изолированного кольца аорты начиналась при концентрации ацетилхолина в ванночке  $1 \times 10^{-8}$  М и составила 16%, что было больше, чем в контроле на 13,7% ( $p < 0,05$ , рис. 4.1).

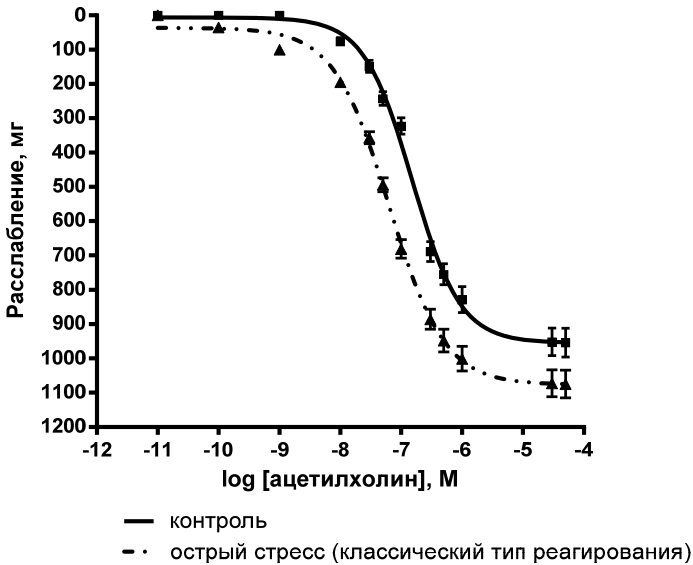


Рис. 4.1. Влияние острого иммобилизационного стресса на изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина (классический тип реагирования)

*Примечание:* по оси абсцисс – log концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «острый стресс» классический тип реагирования.

Максимальная дилатация достигала 87,5% при концентрации ацетилхолина  $10^{-5}$  М (на 30,5% больше, чем в контроле,  $p < 0,05$ ). При этом у животных данной подгруппы, перенесших стресс, наблюдалось увеличение чувствительности гладкомышечных клеток изолированного кольца аорты к ацетилхолину.  $EC_{50}$  составила при остром стрессе –  $6,38 \times 10^{-8}$  М, тогда как в контроле –  $1,51 \times 10^{-7}$  М,  $p < 0,05$  (табл. 4.1).

Таблица 4.1

Влияние острого иммобилизационного стресса на чувствительность к ацетилхолину

Группа	EC <sub>50</sub> , М	CI 95% EC <sub>50</sub> , М
Контроль (n = 7)	1,51×10 <sup>-7</sup>	1,45 – 1,58×10 <sup>-7</sup>
Острый стресс (1-я подгруппа, n = 10)	6,36×10 <sup>-8*</sup>	6,10 – 6,63×10 <sup>-8</sup>
Острый стресс (2-я подгруппа, n = 7)	1,78×10 <sup>-7</sup>	1,71 – 1,86×10 <sup>-7</sup>

*Примечание:* EC<sub>50</sub>, М – молярная концентрация ацетилхолина, вызывающая 50% ответную реакцию изолированных аортальных колец. CI 95% EC<sub>50</sub>, М – 95-процентный доверительный интервал концентрации ацетилхолина. \* – p < 0,05 по сравнению с контролем.

У животных второй подгруппы, подвергнутых стрессирующему воздействию после добавления ацетилхолина, дилатация кольца аорты начиналась при концентрации 1 × 10<sup>-7</sup> М (рис. 4.2).

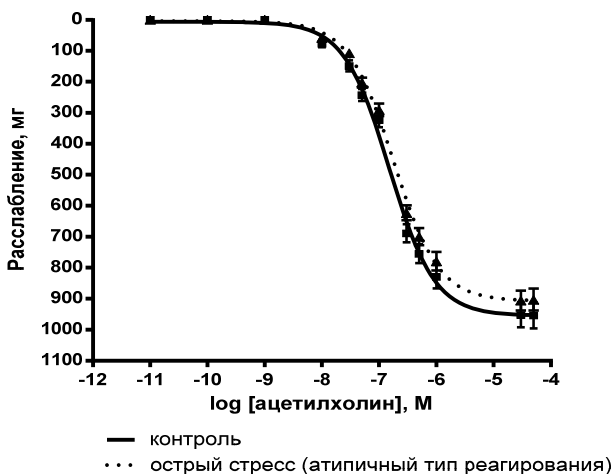


Рис. 4.2. Влияние острого иммобилизационного стресса на изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина (атипичный тип реагирования)

*Примечание:* по оси абсцисс –  $\log$  концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «острый стресс» атипичный тип реагирования.

Максимальная реакция наблюдалась при концентрации ацетилхолина  $3 \times 10^{-5}$  М и составляла 52,8%, т.е. практически не отличалась от контрольных животных и была нами расценена, как атипичная реакция. Концентрация ацетилхолина, вызывающая 50% ответную реакцию гладкомышечных клеток аортальных сосудов, у животных этой подгруппы также достоверно не отличалась от контрольных величин и равнялась  $1,78 \times 10^{-7}$  М (в контроле  $EC_{50}$  –  $1,51 \times 10^{-7}$  М, табл. 4.1).

#### **4.2. Влияние S-метилизотиомочевины на изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс**

Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины в контрольной группе животных не оказало влияния на выраженность эндотелий-зависимой дилатации кольца аорты.

У животных первой подгруппы, перенесших острый стресс, инкубирование сегмента аорты с S-метилизотиомочевинной устраняло влияние острого стресса. Дилатация изолированного кольца аорты становилась такой же, как в контроле. Она начиналась при концентрации ацетилхолина  $10^{-7}$  М, а ее максимум достигался при концентрации ацетилхолина  $3 \times 10^{-5}$  М и составлял 60% (в контроле 57%) (рис. 4.3).



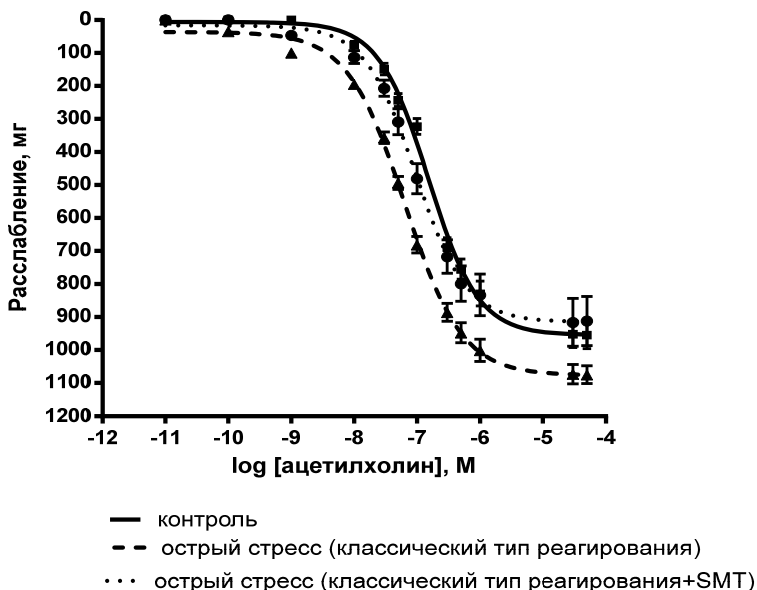


Рис. 4.3. Влияние S-метилизотиомочевины на стресс-индуцированные изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс, перенесших 60-минутный иммобилизационный стресс (классический тип реагирования)

*Примечание:* по оси абсцисс – log концентрации ацетилхолина (M); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «острый стресс» классический тип реагирования; ● – острый стресс классический тип реагирования + SMT.

Чувствительность гладкомышечных клеток аорты животных этой подгруппы также возвращалась к контрольным величинам и составила  $1,07 \times 10^{-7}$  M, (у этих же животных без S-метилизотиомочевины  $EC_{50}$  было  $6,36 \times 10^{-8}$  M, табл. 4.2).

Таблица 4.2

Влияние S-метилизотиомочевины на чувствительность к ацетилхолину изолированного кольца аорты крыс, перенесших 60-минутную иммобилизацию

Группа	EC <sub>50</sub> , М	CI 95% EC <sub>50</sub> , М
Контроль (n = 7)	1,51×10 <sup>-7</sup>	1,45 – 1,58×10 <sup>-7</sup>
Контроль + SMT (n = 6)	1,29×10 <sup>-7</sup>	1,23 – 1,35×10 <sup>-7</sup>
Острый стресс (1-я подгруппа, n = 10)	6,36×10 <sup>-8*</sup>	6,10 – 6,63×10 <sup>-8</sup>
Острый стресс + SMT (1-я подгруппа, n = 7)	1,07×10 <sup>-7</sup>	9,92×10 <sup>-8</sup> – 1,16×10 <sup>-7</sup>
Острый стресс (2-я подгруппа, n = 7)	1,78×10 <sup>-7</sup>	1,71 – 1,86×10 <sup>-7</sup>
Острый стресс+ SMT (2-я подгруппа, n = 6)	1,23×10 <sup>-7</sup>	1,12 – 1,35×10 <sup>-7</sup>

Инкубирование сегмента аорты с S-метилизотиомочевинной у животных второй подгруппы с атипичной реакцией на стресс сопровождалось существенным усилением вызываемого ацетилхолином расслабления гладкомышечных клеток аорты и возрастанием ее чувствительности к нему.

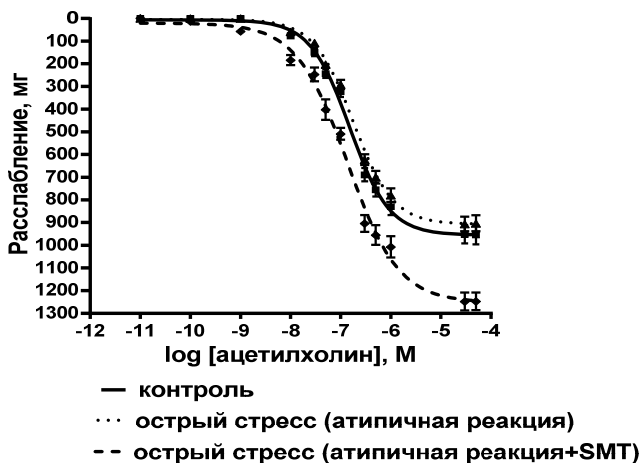


Рис. 4.4. Влияние S-метилизотиомочевины на стресс-индуцированные изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс, перенесших 60-минутный иммобилизационный стресс (атипичный тип реагирования)

*Примечание:* по оси абсцисс –  $\log$  концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «острый стресс» атипичный тип реагирования; ◆ – острый стресс атипичный тип реагирования + SMT.

У животных данной подгруппы дилатация изолированного кольца аорты начиналась при концентрации ацетилхолина в ванночке  $1 \times 10^{-8}$  М, а ее максимум достигался при концентрации ацетилхолина  $3 \times 10^{-5}$  М и составлял 90% (в контроле 57%) (рис. 4.4).

### **4.3. Сократительная активность изолированного кольца аорты крыс**

Увеличение концентрации  $\alpha_1$ -адреностимулятора фенилэфрина в органной ванночке от  $10^{-15}$  до  $10^{-3}$  М приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крысы (рис. 4.5). У животных контрольной группы увеличение напряжения изолированного кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 42% от исходного напряжения), а при концентрации  $10^{-6}$  М ответная реакция возросла на 94% и достигала максимального значения.

У животных этой группы, перенесших острый стресс наблюдались различные реакции на введение фенилэфрина и при воздействии ацетилхолина. В первой подгруппе животных, перенесших острый стресс, сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 20% от исходного напряжения), достигая максимума при  $10^{-6}$  М (прирост 57%, рис. 4.5).

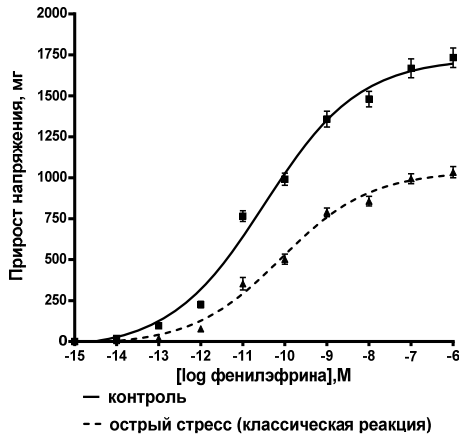


Рис. 4.5. Влияние острого иммобилизационного стресса на изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс, перенесших 60-минутный иммобилизационный стресс (классический тип реагирования)

По оси абсцисс отрицательный логарифм концентрации фенилэфрина, по оси ординат прирост сокращения изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном увеличении концентрации фенилэфрина; ■ — группа «контроль»; ▲ — «острый стресс» классический тип реагирования.

Следовательно, в этой подгруппе животных реакция на фенилэфрин была менее выражена по сравнению с контролем — классический тип реагирования. После перенесенного острого иммобилизационного стресса в данной подгруппе животных чувствительность аортальных сосудов к фенилэфрину оказалась сниженной по сравнению с контролем (в группе контрольных животных  $EC_{50}$  составляла  $3,32 \times 10^{-11}$  М, в первой подгруппе «острый стресс»  $EC_{50}$  —  $8,18 \times 10^{-11}$  М, табл. 4.3).

Влияние острого иммобилизационного стресса на чувствительность к фенилэфрину

Группа	EC <sub>50</sub> , М	CI 95% EC <sub>50</sub> , М
Контроль (n = 8)	$3,32 \times 10^{-11}$	$2,66 - 4,14 \times 10^{-11}$
Острый стресс (1-я подгруппа, n = 7)	$8,81 \times 10^{-11}$	$6,55 \times 10^{-11} - 1,02 \times 10^{-10}$
Острый стресс (2-я подгруппа, n = 7)	$5,08 \times 10^{-11}$	$4,06 - 6,37 \times 10^{-11}$

Во второй подгруппе животных, перенесших острый стресс, сужение кольца аорты в ответ на фенилэфрин было более сильным, чем в контроле – атипичный тип реагирования (рис. 4.6).

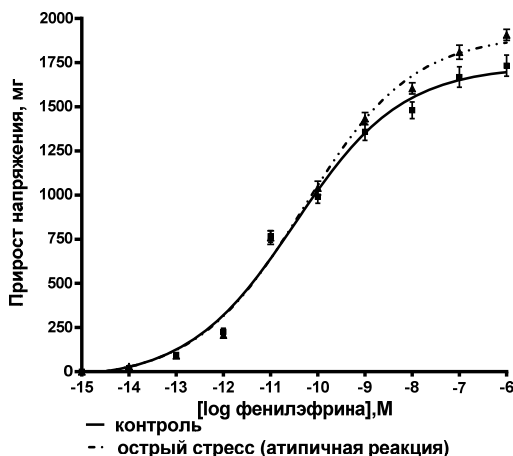


Рис. 4.6. Влияние острого иммобилизационного стресса на изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс, перенесших 60-минутный иммобилизационный стресс (атипичный тип реагирования)

По оси абсцисс отрицательный логарифм концентрации фенилэфрина, по оси ординат прирост сокращения изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном увеличении концентрации фенилэфрина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «острый стресс» атипичный тип реагирования.

Сокращение гладкой мышцы начиналась при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост, как и в контроле на 41% от исходного напряжения), достигая максимума при  $10^{-6}$  М (прирост на 103%). Чувствительность аортальных сосудов к фенилэфрину в этой подгруппе животных не отличалась от контроля ( $EC_{50} = 5,08 \times 10^{-11}$  М, табл. 4.3).

#### 4.4. Влияние S-метилизотиомочевины на изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс

Добавление в перфузионный раствор ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины в первой подгруппе (классический тип реагирования) устраняло влияние острого стресса на сократительную реакцию, вызываемую фенилэфрином. У животных этой группы сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 35% от исходного напряжения), достигая максимума при  $10^{-6}$  М (прирост 84%, в подгруппе животных «острый стресс» классический тип реагирования прирост 57%, рис. 4.7).

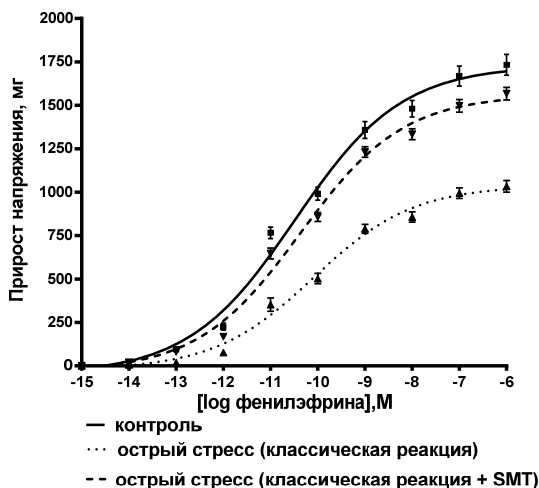


Рис. 4.7. Влияние S-метилизотиомочевины на стресс-индуцированные изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс, перенесших 60-минутный иммобилизационный стресс (классический тип реагирования)

*Примечание:* по оси абсцисс –  $\log$  концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «острый стресс» классический тип реагирования; ▼ – острый стресс классический тип реагирования + SMT.

Добавление в перфузионный раствор ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины в первой подгруппе увеличивало чувствительность изолированного кольца аорты к фенилэфрину (в первой подгруппе «острый стресс» без SMT  $EC_{50}$  составляла  $8,18 \times 10^{-11}$  М, в этой же подгруппе «острый стресс» + SMT  $EC_{50} = 4,28 \times 10^{-11}$  М, табл. 4.4).

Таблица 4.4

Влияние S-метилизотиомочевины на чувствительность к фенилэфрину изолированного кольца аорты крыс, перенесших 60-минутную иммобилизацию

Группа	$EC_{50}$ , М	CI 95% $EC_{50}$ , М
Контроль (n = 8)	$3,32 \times 10^{-11}$	$2,66 - 4,14 \times 10^{-11}$
Контроль + SMT (n = 7)	$3,81 \times 10^{-11}$	$3,08 - 4,71 \times 10^{-11}$
Острый стресс (1-я подгруппа, n = 7)	$8,81 \times 10^{-11}$	$6,55 \times 10^{-11} - 1,02 \times 10^{-10}$
Острый стресс+ SMT (1-я подгруппа, n = 11)	$4,28 \times 10^{-11}$	$3,58 - 5,12 \times 10^{-11}$
Острый стресс (2-я подгруппа, n = 7)	$5,08 \times 10^{-11}$	$4,06 - 6,37 \times 10^{-11}$
Острый стресс+ SMT (2-я подгруппа, n = 7)	$2,89 \times 10^{-11}$	$2,29 - 3,64 \times 10^{-11}$

Во второй подгруппе животных, перенесших острый стресс, блокатор индуцибельной NO-синтазы также усилил ответ аорты на фенилэфрин, но это усиление было значительно меньше, чем в первой подгруппе стрессированных крыс (рис. 4.8).

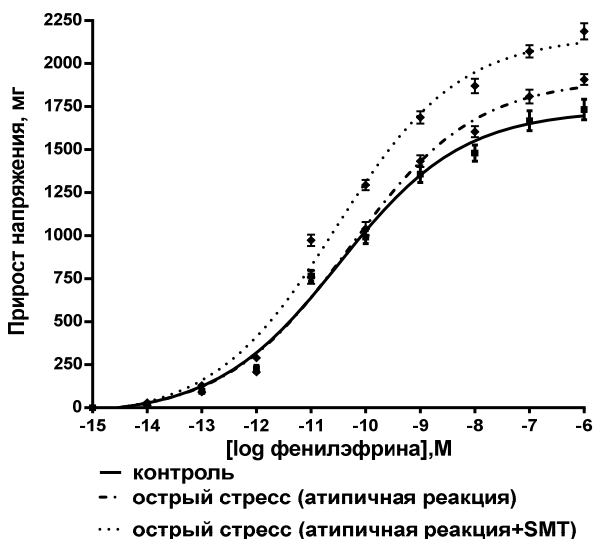


Рис. 4.8. Влияние S-метилизотиомочевины на стресс-индуцированные изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс, перенесших 60-минутный иммобилизационный стресс (атипичный тип реагирования)

*Примечание:* по оси абсцисс –  $\log$  концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «острый стресс» классический тип реагирования; ◆ – острый стресс атипичный тип реагирования + SMT.

Анализ первого типа реакции позволяет заключить, что усиление вызываемой ацетилхолином дилатации изолированного кольца аорты, которое блокировалась селективным ингибитором индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевинной, обусловлено увеличением образования монооксида азота, синтезируемого индуцибельной NO-синтазой. Данное предположение подтверждается и тем, что после 60-минутного ограничения подвижности крыс обнаруживалось уменьшение сократительной реакции гладкомышечных клеток аорты в ответ на воздействие фенилэфрина и их чувствительности к нему, которые после обработки колец аорты S-метилизотиомочевинной восстанавливались.



Особый интерес вызывает «атипичная» реакция кольца аорты крыс, перенесших 60-минутную иммобилизацию, на ацетилхолин и фенилэфрин. При этом типе реагирования дилататорная реакция кольца аорты стрессированных крыс на ацетилхолин не изменялась, а констрикторная на фенилэфрин усиливалась по сравнению с контролем. После обработки этих колец аорты S-метилизотиомочевинной вызываемая ацетилхолином дилататорная реакция увеличилась и стала характерной для стрессированных животных, у которых активность индуцибельной NO-синтазы не была ингибирована. В то же время констрикторный ответ кольца аорты на фенилэфрин под влиянием S-метилизотиомочевины возрастал в значительно меньшей степени, чем у крыс «классическим» типом реагирования. Подобный тип реагирования свидетельствует о том, что в клетках аорты этой подгруппы крыс, перенесших 60-минутную иммобилизацию, также появляется индуцибельная NO-синтаза, однако она не производит характерного для нее большого количества NO. Более того S-метилизотиомочевина усиливает образование NO и, как следствие, вызываемую ацетилхолином эндотелий-зависимую дилатацию аорты крыс, перенесших иммобилизацию. Подобное возможно лишь в том случае, если у вновь образовавшейся индуцибельной NO-синтазы субъединицы разобщены и такой фермент вместо NO производит либо только, либо в значительной степени супероксидрадикал, который связываясь с NO, синтезирующимся эндотелиальной NO-синтазой, уменьшает его биодоступность. Наступающее после ингибирования индуцибельной NO-синтазы усиление вызываемой ацетилхолином эндотелий-зависимой дилатации аорты стрессированных крыс, скорее всего, может быть связано с угнетением ее супероксид продуцирующей активности. В этом случае он соединяется с NO, синтезирующимся конститутивной синтазой монооксида азота (eNOS), и уменьшает его биологическую доступность. Наступающее после ингибирования iNOS усиление вызываемой ацетилхолином эндотелийзависимой дилатация аорты стрессированных крыс может быть обусловлено как стресс-индуцированным повышением активности eNOS, так и увеличением биодоступности синтезируемого ею NO. Это, по-видимому, сопровождается повышением активности eNOS и увеличением биодоступности синтезируемого ею NO.

Таким образом, при кратковременном остром стрессе в клетках аорты крыс образуется индуцибельная NO-синтаза, которая может быть в одном случае источником большого количества NO (сопряженное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы), а в другом – супероксидного анион-радикала, подавляющего его биодоступность (разобщенное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы). Учитывая тот факт, что изменения сосудистой реактивности при кратковременном стрессе скорее носят приспособительный характер, все же необходимо констатировать, что NO, синтезируемый индуцибельной NO-синтазой, при этом состоянии может иметь не только протекторное значение, но и быть началом появления агрессивных веществ, повреждающих различные элементы клеток стенки сосуда.

Полученные результаты позволяют заключить, что после 60-минутного иммобилизационного стресса, наблюдаются реакции изолированного кольца аорты на ацетилхолин и фенилэфрин двух типов. Первый – «классический» тип реагирования, выражается в усилении индуцируемой ацетилхолином дилатации изолированного кольца аорты и в уменьшении ее ответа на  $\alpha_1$ -адренергический стимулятор фенилэфрин. Второй – «атипичный» тип реагирования, проявляется уменьшением ответа изолированного кольца аорты на ацетилхолин и усилением реакции на фенилэфрин. Оба типа реакции изолированного кольца аорты на ацетилхолин и фенилэфрин могут быть устранены применением высокоселективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины, однако при разном типе реакции данный блокатор действовал разнонаправленно. Установлено, что в первой подгруппе животных – «классический» тип реагирования, при добавлении в перфузионный раствор ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины эндотелийзависимая дилатация и чувствительность гладкомышечных клеток аорты к ацетилхолину становилась такой же, как в контроле. Сократительная активность изолированной аорты животных этой подгруппы достоверно увеличивалась под влиянием высокоселективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины. Инкубирование сегмента аорты с S-метилизотиомочевинной у животных второй подгруппы с атипичной реакцией на стресс сопровождалось существенным усилением вызываемого ацетилхолином расслабления

гладкомышечных клеток аорты, возрастанием ее чувствительности к ацетилхолину, а также усилением сократительного ответа аорты на фенилэфрин. Однако возрастание сократительного ответа аорты на фенилэфрин у животных с атипичным типом реагирования было значительно меньше, чем в первой подгруппе стрессированных крыс с классическим типом реагирования [23; 24].

В практическом отношении острый стресс, а также прогрессирующее гипоксии и состояние хронической ишемии может приводить к истощению субстрата NO–L-аргинина и снижению синтеза NO, что, в свою очередь, ведет к нарушению тонуса сосудов, развитию системных заболеваний (атеросклероз) и сердечно-сосудистых патологий. Поэтому, на этой стадии процесса важно своевременное применение NO–доноров. В качестве таких препаратов в медицине давно применяются: нитропруссид натрия, нитроглицерин, никотиновая кислота и некоторые другие. В эксперименте на животных было показано, что эти препараты улучшают ретинальное и хориоидальное кровоснабжение. Для реализации своего действия они образуют промежуточные соединения (S–нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа–ДНКЖ), которые оказывают необходимое действие и создают депо NO в клетках [25; 26].

### Список использованной литературы к главе 4

1. Pare, W.P. Restraint stress in biomedical research: a review / W.P. Pare, G.B. Glavin // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 1986. – Vol. 10(3). – P. 339–370. – doi: 10.1016/0149-7634(86)90017-5.
2. Verbitsky, A. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment / A. Verbitsky, D. Dopfel, N. Zhang // *Transl. Psychiatry.* – 2020. – Vol. 10. – P. 132. – doi: 10.1038/s41398-020-0806-x
3. Gameiro, G.N. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress / G.N. Gameiro [et al.] *Physiol. Behav.* – 2006. – Vol. 87. Issue 4. – P. 643–649. – doi: 10.1016/j.physbeh.2005.12.007 (2006).
4. Mitra, R. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdale / R. Mitra [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 9371–9376.
5. Kedia, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice / S. Kedia, S. Chattarji // *J. Neurosci. Methods.* – 2014. – Vol. 233. – P. 150–154. – doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.06.012

6. Hegde, P. et al. Stress-induced changes in sleep and associated neuronal activity in rat hippocampus and amygdala / P. Hegde [et al.] // *Neuroscience*. – 2008. – Vol. 153. – P. 20–30.

7. Andero, R. et al. Amygdala-dependent fear is regulated by Oprl1 in mice and humans with PTSD / R. Andero [et al.] // *Sci. Transl. Med.* 2013. – Vol 5. Issue 188. – P. 188ra73. – doi: 10.1126/scitranslmed.3005656

8. Armario, A.A single exposure to severe stressors causes long-term desensitization of the physiological response to homotopic stressor / A. Armario [et al.] // *Stress*. – 2004. – Vol. 7. – P. 157. – doi:10.1080/10253890400010721

9. Şahin, Z. An evaluation of the effects of two chronic immobilization stress protocols On depression/anxiety-related behavior in male rats / Z. Şahin [et al.] // *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.* – 2019. – Vol. 10, doi :10.31067/0.2019.186

10. Bali, A. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison / A. Bali, A.S. Jaggi // *Eur. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 746. – P. 282–292.

11. Fuentes, S. Sex-dependent impact of early-life stress and adult immobilization in the attribution of incentive salience in rats / S. Fuentes [et al.] // *PLoS ONE*. – 2018. – doi :10.1371/journal.pone.0190044

12. Yehuda, R., Yang, R.K., Buchsbaum, M.S. & Golier, J.A. Alterations in cortisol negative feedback inhibition as examined using the ACTH response to cortisol administration in PTSD / R. Yehuda [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2006. – Vol. 31. Issue 4. – P. 447–451. – doi: 10.1016/j.psyneuen.2005.10.007

13. Zaba, M. Identification and characterization of HPA-axis reactivity endophenotypes in a cohort of female PTSD patients / M. Zaba [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. –2015. – Vol. 55. – P. 102–115.

14. Gagliano, H. Sex differences in the long-lasting effects of a single exposure to immobilization stress in rats / H. Gagliano, R. Nadal, A. Armario // *Horm. Behav.* – 2014. – Vol. 66. – P. 793–801.

15. Buynitsky, T. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments / T. Buynitsky, D. I. Mostofsky // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2009. – Vol. 33. Issue 7. – P. 1089–1098. – doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.05.004

16. Wiegert, O. Timing is essential for rapid effects of corticosterone on synaptic potentiation in the mouse hippocampus / O. Wiegert, M. Joels, H. Krugers // *Learn. Mem.* – 2006. – Vol. 13(2). – P. 110–113.

17. Reul J.M. Chandramohan Y. Epigenetic mechanisms in stress-related memory formation / J.M. Reul, Y. Chandramohan // *Psychoneuroendocrinology*. – 2007. – Vol. 32 (Suppl 1). – P. S21–525.

18. Uwaya, A., Lee, H., Park, J. et al. Acute immobilization stress following contextual fear conditioning reduces fear memory: timing is essential / A. Uwaya [et al.] // *Behav. Brain. Funct.* – 2016. – Vol. 12 (8). – doi: 10.1186/s12993-016-0092-1

19. Прокудина Е.С. Морфофункциональные аспекты повреждения сердца при иммобилизационном стрессе у крыс / Е.С. Прокудина [и др.] // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2019. – Т. 105. №2. – С. 248–257.

20. Топчиева Л.В. Содержание метаболитов оксида азота и уровень транскриптов генов NOS2 и NOS3 у пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией / Л.В. Топчиева, О.В. Балан, В.А. Корнева [и др.] // *Известия РАН. Серия биологическая*. – 2020. – №3. – С. 259–265.

21. Лазуко С.С. Регуляция  $K_{ATP}$ - и  $ВК_{Ca}$ -каналов коронарных сосудов, зависящая от iNOS, в условиях сахарного диабета / С.С. Лазуко // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2017. – Т. 16 (1). – С. 57–64. – doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-1-57-64

22. Солодков А.П. Изменения эндотелийзависимой дилатации и  $\alpha_1$ -адренореактивности аорты крыс, вызванные ингибированием индуцируемой NO-синтазы после ограничения двигательной активности / А.П. Солодков, Н.М. Яцковская // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2013. – Т. 99. №7. – С. 859–868.

23. Чиркин А.А. Тонус кровеносных сосудов и окислительный стресс / А.А. Чиркин, Н.М. Яцковская // *Новости медико-биологических наук*. – 2020. – Т. 20. №3. – С. 170–180.

24. Дзугкоев С.Г. Участие биохимических систем в патогенезе эндотелиальной дисфункции / С.Г. Дзугкоев, Ф.С. Дзугкоева, О.И. Маргиева [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2019. – №2 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28713> (дата обращения: 29.10.2022).

25. Малышев И.Ю. Стресс, адаптация и оксид азота / И.Ю. Малышев, Е.Б. Манухина // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63. Вып. 7. – С. 992–1006.

## ГЛАВА 5. ХРОНИЧЕСКИЙ ИММОБИЛИЗАЦИОННЫЙ СТРЕСС И ТОНУС ПЕРФУЗИРУЕМОГО ФРАГМЕНТА АОРТЫ

Реакция на стресс – это естественная реакция организма на потенциально опасные раздражители, которая повышает шансы на выживание. Стойкая активация реакции на хронический стресс может вызывать изменения гомеостатических механизмов. Иммобилизационный стресс – простой и удобный способ вызвать как психологическое, так и физическое напряжение. После 60-дневного иммобилизационного хронического стресса у крыс найдено изменение массы различных органов, значительное снижение потребления пищи и массы тела на фоне повышения в сыворотке крови активности АсАТ, АлАТ, глюкозы, МДА, холестерина, триглицеридов, ЛПНП [1]. Хронический стресс влияет на высвобождение кортикостерона, на рецепторную киназу рецептора тропомиозина В (TRKB) и связанные с ними внутриклеточные каскады: TRKB-PI3K-AKT, MEK- MAPK / ERK и пути фосфолипазы C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) [2]. С этим может быть связано изменение соотношения процессов вазоконстрикции и вазодилатации при хроническом иммобилизационном стрессе. Хронический иммобилизационный стресс увеличивает окислительный стресс, активирует апоптоз и вызывает гистологические повреждения тканей; ресвератрол может значительно минимизировать гистологическое повреждение некоторых тканей [3]. Хронический перемежающийся стресс иммобилизации снижает чувствительность клеток к гормональным влияниям, например, клеток Лейдига к гонадотропинам [4]. Показано, что предшествующее воздействие хронического стресса блокировало некоторые эффекты острого стресса, вызванного углекислым газом на корковую активность [5]. Иммобилизационный стресс индуцировал провоспалительные и потенциальные эффекты ремоделирования в толстой кишке за счет снижения экспрессии белка TJ. Это исследование может быть полезным справочным материалом для лечения, направленного на регулирование воздействия стресса на воспалительную дисфункцию тканей [6].

Понятие стресса подразумевает изменения в балансе физиологических систем или в гомеостазе, которые могут привести к развитию заболеваний. В настоящее время термин «гомеостаз» заме-

нен концепцией аллостаза, которая является более гибкой и представляет собой сложный физиологический процесс, с помощью которого живые системы адаптируются к изменениям в окружающей среде. Главным ответом на стресс является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и симпатoadреналовой системы. Последствия хронического физического и психического стресса были исследованы в клинических условиях и на экспериментальных моделях. В ряде исследований было установлено, что физический стресс может существенно влиять на гемодинамику, пластичность артерии и пульсовое давление. Активация вегетативной нервной системы, следующая за стрессом, повышает жесткость артерий, что связано с увеличением концентрации катехоламинов и ангиотензина II в крови. Установлено, что мягкий физический хронический стресс может быть причиной атеросклероза. Также было показано, что после иммобилизационно-холодового стресса сократительная реакция аорты крыс на норадреналин, ангиотензин II и вазопрессин значительно снижается. Накоплены данные свидетельствующие, что хронический социальный стресс может значительно снизить активность NO-синтазы в аорте, повышает артериальное давление и сопровождается обширным субклеточным повреждением клеток в аорте [7–10]. Хотя воздействие различных стрессоров на животных во многом сходно из-за активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой систем, центральные процессы, посредством которых генерируется ответ в любое время на любой конкретный стрессор, весьма специфичны. При повторении действия любого стрессора на организм возможно нарастание негативного действия или развитие адаптационных процессов, так называемое тренирующее действие раздражителя умеренной силы [11; 12]. В настоящее время для объективной оценки выявленных физиологических механизмов регуляции сосудистого тонуса при стрессе наибольший интерес представляют метаболомные исследования, а также анализ реакций, зависящих от состояния ферментативных систем, ответственных за продукцию оксида азота в эндотелии сосудов [13–15].

### 5.1. Действие хронического иммобилизационного стресса на динамику относительной массы стресс-реагирующих органов

В данном разделе монографии представлены данные о влиянии хронического иммобилизационного стресса различной продолжительности на изменения относительной массы стресс-реагирующих органов у белых крыс и постстрессорные изменения эндотелий-зависимой вазодилатации и вазоконстрикции изолированного кольца аорты крыс.

Для эксперимента были отобраны, взрослые самки белых беспородных крыс с массой тела от 190 до 270 граммов. Подопытные животные были разделены на 5 групп. Первая группа: контрольные животные, которых содержали в стандартных лабораторных условиях без воздействия стрессоров. Хронический иммобилизационный стресс изучали в четырех группах экспериментальных животных, у которых моделировали иммобилизационный хронический стресс продолжительностью 60 минут ежедневно в течение 5, 7, 10 и 13 суток. Хронический иммобилизационный стресс воспроизводили путем иммобилизации животных в пластиковых пеналах длиной 16,5 см и внутренним диаметром 5,5 см, обеспечивающих неподвижность животных, без ограничения доступа воздуха. Все эксперименты проводились с 10:00 до 12:00, чтобы свести к минимуму влияние циркадной изменчивости. В конце эксперимента крыс декапировали и определяли относительную массу надпочечников, селезенки и тимуса (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Динамика изменения относительной массы стресс-реагирующих органов у крыс на фоне перенесенного хронического стресса различной продолжительности

Группа крыс	Масса органа по отношению к контрольной группе, %		
	Надпочечник	Селезенка	Тимус
Контроль	100	100	100
Стресс, 5 суток	123,6	85,1	89,8
Стресс, 7 суток	131,6	80,8	84,1
Стресс, 10 суток	152,6	74,9	72,7
Стресс, 13 суток	140,4	83,3	77,1

*Примечание:* в каждой группе было по 8 животных.



Воздействие хронического иммобилизационного стресса в течение часа на протяжении 10 дней привело к увеличению относительной массы надпочечников и уменьшению относительной массы селезенки и тимуса. Максимальные изменения выявлены при хроническом иммобилизационном стрессе продолжительностью 10 суток. Однако при хроническом иммобилизационном стрессе продолжительностью 13 суток выявлены изменения относительной массы органов в сторону нормализации. Учитывая, что относительная масса стресс-реагирующих органов, является интегральной величиной реакции органа на воздействие, можно с высоким уровнем достоверности предположить, что при 10-суточном иммобилизационном стрессе проявляются максимальные изменения при действии данного вида стрессора. В последующие сроки налицо формирование изменений адаптационного характера, обеспечивающие восстановление относительной массы стресс-реагирующих органов. В связи с этим 10-суточная иммобилизация животных по 60 минут ежедневно является, вероятно, адекватной моделью хронического стресса у крыс.

Анализ массы стресс-реагирующих органов позволил сделать вывод, что стресс-реакция наиболее выражена при ежедневном часовом 10-дневном воздействии иммобилизационного стресса. Поэтому исследование влияния хронического иммобилизационного стресса на изменения эндотелий-зависимой вазодилатации и вазоконстрикции изолированного кольца аорты крыс осуществляли на данной группе экспериментальных животных.

### **5.2. Эндотелий-зависимая вазоконстрикция и вазодилатация изолированного кольца аорты крыс**

Исходное напряжение кольца аорты в контрольной группе животных составляло  $1830 \pm 21,1$  мг, в группе животных, перенесших ежедневную часовую десятидневную иммобилизацию  $1830 \pm 11,8$  мг. Таким образом, исходные условия при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина не различались в контрольной и экспериментальной группах животных.

Сократительный ответ кольца аорты на фенилэфрин ( $10^{-6}$  М) в среднем у интактных животных достигал значения  $3497 \pm 75,5$  мг, в экспериментальной группе животных  $3435 \pm 120$  мг. Статистически достоверных различий между этими величинами, характеризующими ответ кольца аорты на действие фенилэфрина не выявлено.

В контрольной группе животных после добавления ацетилхолина дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $10^{-7}$  М и составляла 23% (рис. 5.1). При этом максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 59%.

У животных, перенесших ежедневную часовую 10-дневную иммобилизацию, дилатация изолированного кольца аорты начиналась при концентрации ацетилхолина в ванночке  $10^{-7}$  М и составила 27%. При этом максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 51%, что было меньше, чем в контроле на 8% ( $p < 0,05$ , рис. 5.1).

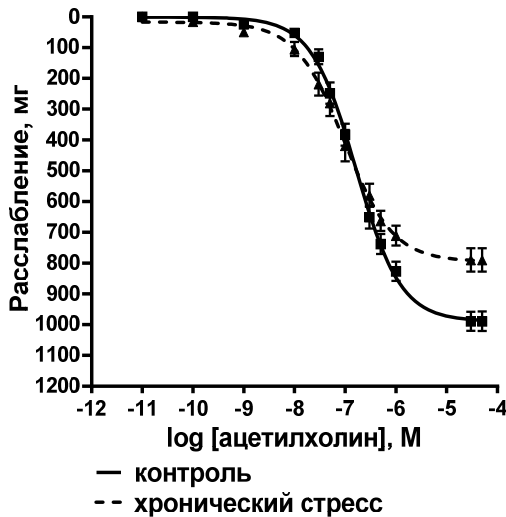


Рис. 5.1. Влияние хронического иммобилизационного стресса на изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина

*Примечание:* по оси абсцисс – log концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «хронический стресс», ежедневная часовая иммобилизация в течение 10 дней.

При этом у животных экспериментальной группы, перенесших часовую ежедневную иммобилизацию в течение десяти дней, наблюдалось увеличение чувствительности гладкомышечных клеток изолированного кольца аорты к ацетилхолину.  $EC_{50}$  составила при остром стрессе –  $9,69 \times 10^{-8}M$ , тогда как в контроле –  $1,64 \times 10^{-7}M$ ,  $p < 0,05$  (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Влияние хронического иммобилизационного стресса на чувствительность к ацетилхолину

Группа	$EC_{50}$ , M	CI 95% $EC_{50}$ , M
Контроль (n=10)	$1,64 \times 10^{-7}$	$1,38 - 1,94 \times 10^{-7}$
Хронический стресс (n=10)	$9,69 \times 10^{-8}$	$7,34 \times 10^{-8} - 1,28 \times 10^{-7}$

*Примечание:*  $EC_{50}$ , M – молярная концентрация ацетилхолина, вызывающая 50% ответную реакцию изолированных аортальных колец. CI 95%  $EC_{50}$ , M – 95-процентный доверительный интервал концентрации ацетилхолина.

### 5.3. Влияние S-метилизотиомочевины на стресс-индуцированные изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс

Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины в контрольной группе животных не оказало влияния на выраженность эндотелий-зависимой дилатации кольца аорты.

У животных, перенесших ежедневный 60-минутный стресс в течение десяти дней, инкубирование сегмента аорты с S-метилизотиомочевинной устраняло влияние хронического иммобилизационного стресса. Дилатация изолированного кольца аорты становилась такой же, как в контроле. Она начиналась при концентрации ацетилхолина  $10^{-7}M$ , а ее максимум достигался при концентрации ацетилхолина  $3 \times 10^{-5}M$  и составлял 61% (в контроле 59%) (рис. 5.2).

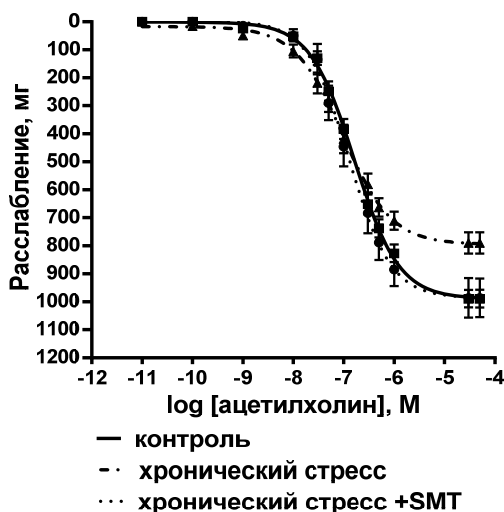


Рис. 5.2. Влияние S-метилизотиомочевины на стресс-индуцированные изменения эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты крыс, перенесших хронический иммобилизационный стресс

*Примечание:* по оси абсцисс – log концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «хронический стресс», ежедневная часовая иммобилизация в течение 10 дней; ● – «хронический стресс» + SMT, ежедневная часовая иммобилизация в течение 10 дней.

Чувствительность гладкомышечных клеток аорты животных этой подгруппы также возвращалась к контрольным величинам и составила  $1,29 \times 10^{-7}$  М, (у этих же животных без S-метилизотиомочевины  $EC_{50}$  было  $9,69 \times 10^{-8}$  М, табл. 5.3).

### 5.4. Сократительная активность изолированного кольца аорты крыс

Увеличение концентрации  $\alpha_1$ -адреностимулятора фенилэфрина в органной ванночке от  $10^{-15}$  до  $10^{-3}$  М приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крысы (рис. 5.3). У животных контрольной группы увеличение напряжения изолированного кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 42% от исходного напряжения), а при концентрации  $10^{-6}$  М ответная реакция возросла на 94% и достигала максимального значения.

У животных этой группы, перенесших хронический стресс, сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 29% от исходного напряжения), достигая максимума при  $10^{-6}$  М (прирост 77%, рис. 5.3).

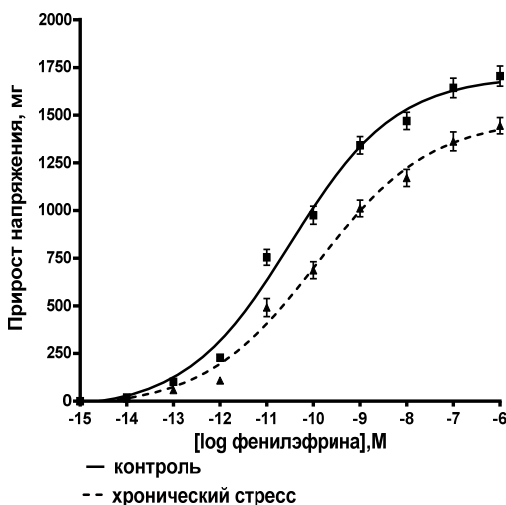


Рис. 5.3. Влияние хронического иммобилизационного стресса на изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс, перенесших ежедневную 60-минутную иммобилизацию в течение 10 дней

По оси абсцисс отрицательный логарифм концентрации фенилэфрина, по оси ординат прирост сокращения изолированного кольца

аорты крыс при кумулятивном увеличении концентрации фенилэфрина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «хронический стресс», ежедневная часовая иммобилизация в течение 10 дней.

Следовательно, в этой группе животных реакция на фенилэфрин была выражена более слабо по сравнению с контролем. После перенесенного десяти дневного иммобилизационного стресса в данной группе животных чувствительность аортальных сосудов к фенилэфрину оказалась сниженной по сравнению с контролем (в группе контрольных животных  $EC_{50}$  составляла  $3,32 \times 10^{-11}$  М, в группе животных, перенесших хронический стресс  $EC_{50} = 1,203 \times 10^{-10}$  М, табл. 5.3).

Таблица 5.3

Влияние хронического иммобилизационного стресса на чувствительность к фенилэфрину

Группа	$EC_{50}$ , М	СІ 95% $EC_{50}$ , М
Контроль (n = 10)	$3,32 \times 10^{-11}$	$2,66 - 4,14 \times 10^{-11}$
Хронический стресс (n=10)	$1,203 \times 10^{-10}$	$7,11 \times 10^{-11} - 2,04 \times 10^{-10}$

### 5.5. Влияние S-метилизотиомочевина на изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс

Добавление в перфузионный раствор ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевина в данной группе устраняло влияние хронического стресса на сократительную реакцию, вызываемую фенилэфрином. У животных этой группы сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 37% от исходного напряжения), достигая максимума при  $10^{-6}$  М (прирост 99%, рис. 5.4).

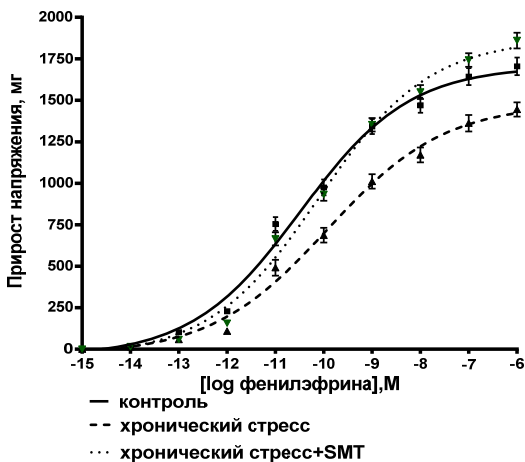


Рис. 5.4. Влияние S-метилизотиомочевины на стресс-индуцированные изменения сократительной активности изолированного кольца аорты крыс, перенесших хронический иммобилизационный стресс

*Примечание:* по оси абсцисс –  $\log$  концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – дельта расслабления в мг, в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина; ■ – группа «контроль»; ▲ – «хронический стресс», ежедневная часовая иммобилизация в течение 10 дней; ▼ – «хронический стресс» + SMT, ежедневная часовая иммобилизация в течение 10 дней.

Добавление в перфузионный раствор ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины в группе животных, перенесших хронический стресс, увеличивало чувствительность изолированного кольца аорты к фенилэфрину (в данной группе «хронический стресс» без SMT  $EC_{50}$  составляла  $1,203 \times 10^{-10}$  М, в этой же подгруппе «хронический стресс» + SMT  $EC_{50} = 7,96 \times 10^{-11}$  М, табл. 5.4).

Таблица 5.4

Влияние S-метилизотиомочевины на чувствительность к фенилэфрину изолированного кольца аорты крыс, перенесших хроническую иммобилизацию

Группа	EC50, М	CI 95% EC50, М
Контроль (n = 10)	$3,32 \times 10^{-11}$	$2,66 - 4,14 \times 10^{-11}$
Хронический стресс (n = 10)	$1,203 \times 10^{-10}$	$7,11 \times 10^{-11} - 2,04 \times 10^{-10}$
Хронический стресс +SMT (n = 10)	$7,96 \times 10^{-11}$	$5,53 \times 10^{-11} - 1,15 \times 10^{-10}$

Полученные результаты позволяют заключить, что после ежедневной 60-минутной иммобилизации в течение 10 дней, наблюдаются изменение реакции изолированного кольца аорты на фенилэфрин по сравнению с интактными животными. При кумулятивном добавлении фенилэфрина тип реагирования, проявляется уменьшением ответа изолированного кольца аорты на фенилэфрин и снижением чувствительности гладкомышечных клеток аорты к фенилэфрину. Оба типа реакции изолированного кольца аорты на ацетилхолин и фенилэфрин могут быть устранены применением высокоселективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины. Установлено, что в группе животных, перенесших хронический стресс, при добавлении в перфузионный раствор ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины эндотелий зависимая дилатация и чувствительность гладкомышечных клеток аорты к ацетилхолину становилась такой же, как в контроле. Инкубирование сегмента аорты с S-метилизотиомочевинной у экспериментальных животных сопровождалось усилением вызываемого фенилэфрина сокращения гладкомышечных клеток аорты, а также повышением ее чувствительности к фенилэфрину [16, 17].

### Список использованной литературы к главе 5

1. Nayanatara, A.K. Effect of chronic immobilization stress on some selected physiological, biochemical and lipid parameters in wistar albino rats / A.K. Nayanatara, Y. Tripathi, H.S. Nagaraja [et al.] // Res. J. Pharm., Biol. and Chem. Sci. – 2012. – Vol. 3 (1). – P. 34–42.
2. Brivio, P. Chronic restraint stress inhibits the response to a second hit in adult male rats: a role for BDNF signaling / P. Brivio [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21(17). – 6261; doi: 10.3390/ijms21176261



3. Bitgul, G. Protective Effects of Resveratrol against Chronic Immobilization Stress on Testis / G. Bitgul, I. Tekmen, D. Keles [et al.] // *ISRN Urol.* – 2013. – №78720. – doi: 10.1155/2013/278720

4. Charpenet, G. Effects of Chronic Intermittent Immobilization Stress on Rat Testicular Androgenic Function / G. Charpenet [et al.] // *Endocrinology.* – 1981. – Vol. 109. Issue 4. – P. 1254–1258. – <https://doi.org/10.1210/endo-109-4-1254>

5. Rahman, M.M. Chronic immobilization stress occludes in vivo cortical activation in an animal model of panic induced by carbon dioxide inhalation / M.M. Rahman [et al.] // *Front. Behav. Neurosci.* – 2014. – <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00311F>.

6. Machorro-Rojas, N. Impact of chronic immobilization stress on parameters of colonic homeostasis in BALB/c mice / N. Machorro-Rojas [et al.] // *Molecular Medicine Reports.* – 2019. – Vol. 20. Issue 3. – P. 2083–2090. – <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10437>

7. Djordjevic, J. Distinct and combined effects of acute immobilization and chronic isolation stress on MAO activity and antioxidative protection in the heart of normotensive and spontaneously hypertensive rats / J. Djordjevic, N. Jasic, P. Vujovic [et al.] // *J. Animal Physiol. Animal Nutr.* – 2012. – Vol. 96. Issue 1. – P. 5865. – doi:10.1111/j.1439-0396.2010.01122.x

8. Stojkov, N.J. Repeated immobilization stress disturbed steroidogenic machinery and stimulated the expression of cAMP signaling elements and adrenergic receptors in Leydig cells / N.J. Stojkov, M.M. Janjic, M.M. Bjelic [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 2012. – Vol. 302. Issue 10. – P. E1239-E1251. – doi: 10.1152/ajpendo.00554.2011

9. Bruce S. McEwen *Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain* / B.S. McEwen // *Physiological Rev.* – 2007. – Vol. 87. Issue 3. – P. 873–904. – doi: 10.1152/physrev.00041.2006

10. Chung, Ick-Mo. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/type I receptor pathway / Ick-Mo Chung, Young-Myeong Kim, Mi-Hyun Yoo [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2010. – Vol. 213. Issue 1. – P. 109–114. – doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.08.052

11. McDougall, Stuart J. Restraint Stress. Differential Cardiovascular Responses in Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats / S.J. McDougall, R.E. Widdop [et al.] // *Hypertension.* – 2000. – Vol. 35. – P. 126–129. – doi: 10.1161/01.HYP.35.1.126

12. Hinterdobler, J. Acute mental stress drives vascular inflammation and promotes plaque destabilization in mouse atherosclerosis / Julia Hinterdobler, Simin Schott, Hong Jin [et al.] // *European Heart Journal*. – 2021. – Vol. 42. Issue 39. – P. 4077–4088. – doi: 10.1093/eurheartj/ehab371

13. Teague, C.R. Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague-Dawley rats / C.R. Teague, F.S. Dhabhar, R.H. Barton [et al.] // *J. Proteome Res.* 2007, 6, 6, 2080–2093. – doi: 10.1021/pr060412s

14. Han, K. Neurovascular Coupling under Chronic Stress Is Modified by Altered GABAergic Interneuron Activity / K. Han, J. Min, M. Lee [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2019. – Vol. 39 (50). – P. 10081-10095. – Doi: 10.1523/JNEUROSCI.1357-19.2019

15. Carda, A.P.P. Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress / A.P.P. Carda, K.C. Marchi, E. Rizzi [et al.] // *Intern. J. Biol. Stress*. – 2015. – Vol. 18. Issue 2. – doi: 10.3109/10253890.2015.1014790

16. Солодков А.П. Изменения эндотелийзависимой дилатации и  $\alpha_1$ -адренореактивности аорты крыс, вызванные ингибированием индуцируемой NO-синтазы после ограничения двигательной активности / А.П. Солодков, Н.М. Яцковская // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2013. – Т. 99. №7. – С. 859–868.

17. Чиркин А.А. Тонус кровеносных сосудов и окислительный стресс / А.А. Чиркин, Н.М. Яцковская // *Новости медико-биологических наук*. – 2020. – Т. 20. №3. – С. 170–180.

### Заключение

Суммируя результаты представленных в монографии экспериментальных исследований, следует отметить, что содержание диеновых конъюгатов и ТБК-положительных веществ в миокарде крыс достоверно увеличивалось при остром и хроническом стрессе. Однократная и десятикратная иммобилизации крыс не оказали влияния на активность процесса перекисного окисления липидов, но величина антиоксидантной активности оказалась сниженной на 16,4% только при остром стрессе. Содержание суммы нитратов и нитритов в сыворотке крови стрессированных животных повышалось в 1,35 раза при остром стрессе и 1,68 раза – при хроническом стрессе. При остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы, мочевины, ХС ЛПНП и уменьшается концентрация триглицеридов и общего белка. Повышенное содержание глюкозы в сыворотке крови сохраняется при хроническом стрессе. Выявлено статистически достоверное увеличение активности АлАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Предварительное внутрибрюшинное введение параквата приводило к снижению ответа на кумулятивное добавление фенилэфрина животных и реакция кольца аорты на действие  $\alpha_1$ -адреностимулятора была менее выражена по сравнению с контролем. Выявлено, что предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* обеспечила более сильную реакцию на фенилэфрин. Анализ полученных результатов, показал, что внутрибрюшинное введение параквата животным, вероятно, снижало чувствительность аорты к действию  $\alpha_1$ -адреностимулятора, а предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* повышала ее чувствительность к фенилэфрину. Внутрибрюшинное введение параквата не приводило к изменению эндотелий зависимой вазодилатации, так как реакция изолированного кольца аорты крыс на кумулятивное добавление в перфузионный раствор ацетилхолина практически не отличалась у животных этой группы по сравнению с контролем. В группе животных, у которых изолированный фрагмент аорты был обработан паракватом *in vitro*, введение параквата, не изменяло базальное напряжение сосудов, но значительно снижало вазодилататорный ответ изолированного кольца аорты

при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина по сравнению с контрольной группой животных. После 60-минутного иммобилизационного стресса, наблюдаются реакции изолированного кольца аорты на ацетилхолин и фенилэфрин двух типов. Первый – «классический» тип реагирования, выражается в усилении индуцируемой ацетилхолином дилатации изолированного кольца аорты и в уменьшении ее ответа на  $\alpha_1$ -адренергический стимулятор фенилэфрин. Второй – «атипичный» тип реагирования, проявляется уменьшением ответа изолированного кольца аорты на ацетилхолин и усилением реакции на фенилэфрин. Оба типа реакции изолированного кольца аорты на ацетилхолин и фенилэфрин могут быть устранены применением высокоселективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины. При «классическом» типе реагирования, при добавлении в перфузионный раствор ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины эндотелийзависимая дилатация и чувствительность гладкомышечных клеток аорты к ацетилхолину становилась такой же, как в контроле, но сократительная активность изолированной аорты животных этой подгруппы достоверно увеличивалась. При «атипичном» типе реагирования инкубирование сегмента аорты с S-метилизотиомочевинной сопровождалось существенным усилением вызываемого ацетилхолином расслабления гладкомышечных клеток аорты, возрастанием ее чувствительности к ацетилхолину, а также усилением сократительного ответа аорты на фенилэфрин. Однако возрастание сократительного ответа аорты на фенилэфрин у животных с атипичным типом реагирования было значительно меньше, чем в подгруппе стрессированных крыс с классическим типом реагирования. При хроническом иммобилизационном стрессе установлено усиление индуцируемой ацетилхолином дилатации изолированного кольца аорты и повышение чувствительности аорты к ацетилхолину. При этом возрастание дилататорного ответа аорты на ацетилхолин превышало аналогичный ответ контрольных животных при более высоких дозах ацетилхолина. При кумулятивном добавлении фенилэфрина тип реагирования, проявляется уменьшением ответа изолированного кольца аорты на фенилэфрин и снижением чувствительности гладкомы-

шечных клеток аорты к фенилэфрину. Оба типа реакции изолированного кольца аорты на ацетилхолин и фенилэфрин устранялись введением S-метилизотиомочевины.

Анализ полученных данных показал, что при хроническом иммобилизационном стрессе по сравнению с острым стрессом у крыс, по всей видимости, регистрируются изменения адаптационного характера, связанные с нормализацией уровней кортикостерона, тироксина, ТБК-позитивных веществ, антиокислительной активности, содержания мочевины, триглицеридов, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, общего белка и отношений глюкоза/триглицериды и ХС ЛПНП/ХС ЛПВП. При исследовании тонуса колец аорты установлено повышение вазодилататорного эффекта и снижение вазоконстрикторного эффекта при однократной иммобилизации животных, а после 10-кратной иммобилизации крыс выявлено синхронное снижение вазодилататорного и вазоконстрикторного эффектов. Аналогичное действие было выявлено при воспроизведении окислительного стресса у крыс введением параквата.

Хорошо известно, что защитные реакции организма при продолжающемся или повторяющемся действии стрессора проходит через три стадии. В первой стадии – реакции тревоги – происходит активизация всех систем организма. Во второй стадии – стадии резистентности – организм адаптируется к продолжающемуся действию стрессора. Третья стадия – стадия истощения, наступает при длительном воздействии стрессора [1–6].

Адаптация, наблюдается у многих организмов и определяется снижением реакции на повторяющиеся раздражители. С точки зрения эволюции адаптация приносит пользу организму, позволяя сохранять метаболические ресурсы организма при многократном действии стрессоров [7]. Двумя ветвями нейроэндокринной стрессовой системы позвоночных являются симпатическая нервная система и ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники (ГГН). Обе ветви исходят из гипоталамуса и сходятся в надпочечниках, работая вместе для поддержания гомеостаза путем организации системной физиологической адаптации. Симпатическая нервная система обеспечивает немедленную реакцию на стресс, способствуя быстрому высвобождению адреналина и норадреналина из мозгового вещества надпочечников. Ось ГГН обеспечивает продолжительный ответ, критически важный для адаптации к стрессу. Эти системы явля-

ются частью физиологической сети, в рамках которой метаболические, вегетативные и иммунные системы обеспечивают дополнительными важными медиаторами адаптации. Для реализации адаптационных процессов через метаболизм требуется также совместная работа генома ядер и биоэнергетики митохондрий клеток. В этих условиях для поддержки гомеостаза организма функционируют многоуровневые петли обратных связей [8; 9].

Для подтверждения актуальности проведенной работы приведем два крупных исследования, результаты которых опубликованы в 2022 году. В первом исследовании лабораторных мышей подвергли хроническому мягкому стрессу (CMS) в течение одной, двух и четырех недель соответственно. Результаты показали, что двухнедельная процедура CMS оказала адаптивное воздействие на поведение и когнитивные способности с большим количеством ГАМК-ергических нейронов и VGluT1-положительных нейронов, увеличение экспрессии белка p-GluN2B, рилина и syn-PSD-95 в гиппокампе. Более длительное воздействие CMS (4 недели) снижало активность животных и вызывала когнитивные нарушения, снижение количества ГАМК-ергических нейронов, гиперактивность VGluT1- положительных нейронов, увеличивало соотношение p-GluN2B и уменьшала экспрессию рилина, syn-PSD-95 в гиппокампе. Эти данные свидетельствуют о том, что умеренная продолжительность стресса, вероятно, способствует поведенческой адаптации и пространственной памяти за счет поддержания ГАМК-ергических и глутаматергических нейронов, сохранение баланса, а также стимулирования экспрессии белков, связанных с синаптической пластичностью в головном мозге [10].

Во втором исследовании авторы сравнили метаболические эффекты трех видов стресса: 1) острый иммобилизационный стресс лабораторных мышей (иммобилизация в специальных клетках 1 час); 2) хронический стресс с повторяющейся иммобилизацией в клетках (по 1 часу 3 недели); 3) хронический «непредсказуемый» стресс (подопытных мышей два раза в день подвергали воздействию различных психогенных стрессоров – избегание воды, чередование света и темноты, принудительное плавание, наклонные клетки, изоляция, скученность, тряска, удерживание, электрошок, запах крысиных фекалий и др. в случайном порядке 3 недели) (табл. 1) [11].

Таблица 1

Суммарное влияние острого иммобилизационного (AS) стресса, хронического повторяющегося иммобилизационного (CRS) стресса и хронического переменного (CVS) стресса на некоторые метаболические маркеры и маркеры стресса [11]

	Body weight gain	Food intake	Energy expenditure	Locomotion	Respiratory exchange ratio	Anxiety
AS	0	0	↑	↑	↓	ND
CRS	↓	↑	↑	↓	↓	0
CVS	↓	↓	↑	↓	↑	↑

*Примечание:* Body weight – масса тела, Food intake – потребление пищи, Energy expenditure – расход энергии, Locomotion – подвижность, Respiratory exchange ratio – коэффициент дыхательного обмена, Anxiety – тревожность; ↑ – повышение, ↓ – снижение, 0 – нет изменений, ND – не определяли.

Некоторые детали полученных данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Эффекты трех типов стресса в эксперименте на мышах

Стресс	Жир тела	Масса надпочечников	Масса тимуса	Кортикостерон
AS	0	0	0	↑
CRS	0	↑	0	↑
CVS	↓	↑	0	↑

Источником энергии у мышей группы «острый стресс» явилось повышенное окисление жиров, а не углеводов, хотя уровень глюкозы в плазме был также повышен. Авторы обнаружили большую разницу в использовании субстрата при однократной и многократной иммобилизации. При хроническом стрессе жир являлся преобладающим источником энергии, тогда как у мышей, не подвергавшихся стрессу, наблюдается смешанное использование углеводов и жира. Авторы не нашли существенных различий между концентрацией кортикостерона, массой надпочечников и тимуса у мышей с иммобилизационным и непредсказуемым стрессом. Сравнение энергетических и поведенческих изменений, наблюдаемых у мышей с хроническим стрессом, указывает на то, что иммобилизация мышей вызывает преимущественно метаболические изменения, тогда как непредсказуемый стресс - психосоматические нарушения [11].

В одном из ранних обзоров об окислительном стрессе и тоне сосудов было подытожено, что эндотелий регулирует гомеостаз сосудов посредством местного образования медиаторов, которые модулируют сосудистый тонус, адгезию тромбоцитов, воспаление, фибринолиз и рост сосудов. Нарушение функции сосудов способствует патогенезу атеросклероза и острым коронарным синдромам. Накапливаются доказательства того, что увеличение образования активных метаболитов кислорода и развитие окислительного стресса способствуют развитию проатерогенных механизмов, сосудистой дисфункции и атеротромбогенезу [12].

Затем накопились данные о том, что эндотелий регулирует гомеостаз сосудов посредством местного образования медиаторов, которые модулируют сосудистый тонус, адгезию тромбоцитов, воспаление, фибринолиз и рост сосудов. Нарушение функции сосудов способствует патогенезу атеросклероза и острым коронарным синдромам. Эти процессы оказались связанными с развитием окислительного стресса [13].

Далее последовали фундаментальные и клинические исследования, которые продемонстрировали то, что патофизиология гипертензии включает сложное взаимодействие множества сосудистых эффекторов, включая активацию симпатической нервной системы, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и медиаторов воспаления. Последующее вазоконстрикция и воспаление приводят к ре-



моделированию сосудистой стенки и, наконец, к образованию атеросклеротических поражений как признака запущенного заболевания. Окислительный стресс и эндотелиальная дисфункция постоянно наблюдаются у пациентов с гипертонией, но новые данные свидетельствуют о том, что они также играют причинную роль в молекулярных процессах, ведущих к гипертонии. Активные метаболиты кислорода могут напрямую изменять функцию сосудов или вызывать изменения сосудистого тонуса с помощью нескольких механизмов, включая изменение биодоступности оксида азота (NO) или передачу сигналов. Ферменты, продуцирующие АМК, участвующие в повышенном оксидативном стрессе сосудов, наблюдаемом при гипертонии, включают НАДФН-оксидазу, ксантинооксидазу, митохондриальную дыхательную цепь и несвязанную эндотелиальную NO-синтазу [14]. В детальном обзоре Touyz, R.M. и соавторов (2020 г.) было сформулировано, что гипертония обычно связана с сосудистой дисфункцией, ремоделированием сердечно-сосудистой системы, дисфункцией почек и стимуляцией симпатической нервной системы. Новые данные показывают, что иммунная система также важна, поскольку активированные иммунные клетки мигрируют и накапливаются в тканях, вызывая воспаление, фиброз и повреждение органов-мишеней. Общим для этих процессов является окислительный стресс, определяемый как дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, что приводит к нарушению системы внутриклеточной биосигнализации и повреждениям на молекулярном уровне. Физиологически активные метаболиты кислорода действуют как сигнальные молекулы и влияют на функцию клеток посредством строго регулируемой редокс-чувствительной передачи сигнала. При гипертонии окислительный стресс способствует посттрансляционной модификации (окислению и фосфорилированию) белков и нарушению передачи сигналов с последующим повреждением клеток и тканей. Многие ферментные системы генерируют АМК, но НАДФН-оксидазы (Nox) являются основными источниками в клетках сердца, сосудов, почек и иммунной системы. Экспрессия и активность Nox увеличиваются при гипертонии и являются основными системами, ответственными за окислительный стресс при сердечно-сосудистых заболеваниях. Авторы предложили объеди-

няющую концепцию, согласно которой окислительный стресс является общим медиатором, лежащим в основе патофизиологических процессов при артериальной гипертензии (рис. 1) [14].

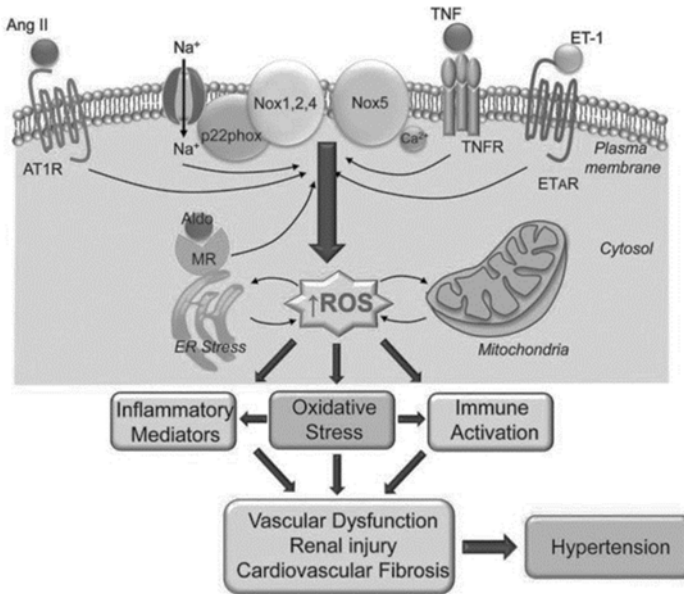


Рис. 1. Окислительный стресс как объединяющий фактор гипертензии

*Примечание:* факторы, вызывающие гипотензию, например, ангиотензин II (Ang II), эндотелин-1 (ET-1), альдостерон (Aldo) и соль (Na), индуцируют активацию НАДФН-оксидаз (Noxs), которые генерируют активные метаболиты кислорода (ROS), которые влияют на несколько систем, вовлеченных в патофизиологию гипертензии. AT1R, рецептор ангиотензина II типа 1, ER, эндоплазматический ретикулум, ETAR, рецептор эндотелина-1 типа A; MR, рецептор минералокортикоидов; TNF, фактор некроза опухоли; TNFR, рецептор фактора некроза опухоли.

Итак, окислительный стресс является объединяющим механизмом в мозаике факторов, регулирующих тонус сосудов. Поскольку окислительный стресс влияет на множество сигнальных молекул и путей во многих клетках, тканях, органах и системах, он представ-

ляет собой общий молекулярный механизм, объединяющий многофакторную мозаику, лежащую в основе заболеваний, связанных с тонусом сосудов, например, артериальной гипертензии. Нарушение эндотелий-зависимой вазорелаксации, усиление сужения сосудов, ремоделирование и воспаление сосудов, снижение растяжимости и повышенная жесткость являются характерными чертами малых и крупных артерий при гипертонии и составляют сосудистый фенотип, или «васкулопатию» гипертонии [15–17].

Тонус сосудов зависит от функциональных (сокращение-расслабление) и структурных изменений стенки сосудов (ремоделирование). Эти процессы определяются сложным взаимодействием между сосудистыми клетками (эндотелием, VSMC, адвентициальными фибробластами) и циркулирующими элементами, включая вазоактивные агенты (Ang II, ET-1, альдостерон, дофамин, катехоламины, простаноиды), факторами роста (эпидермальный фактор роста [EGF], инсулиноподобный фактор роста 1 [IGF-1], фактор роста тромбоцитов [PDGF]), половые гормоны, микроРНК, экзосомы и эндотелиальные клетки-предшественники [18].

Среди множества циркулирующих вазоактивных факторов, вовлеченных в патофизиологию гипертонии, особенно важны Ang II и ET-1 [19–21]. Они являются мощными вазоконстрикторами, митогенными и провоспалительными пептидами, которые служат важнейшими регуляторами сердечно-сосудистой системы. Активация их соответствующих сосудистых рецепторов, связанных с G-белками, приводит к активации Nox и увеличению выработки реактивных кислородных радикалов. Если процесс неконтролируемый, то возникает окислительный стресс, что стимулирует сосудистые сигнальные пути, такие как MAPK, PKC, фосфолипаза C, клеточный Src и Rho-киназа (рис. 2) [14].

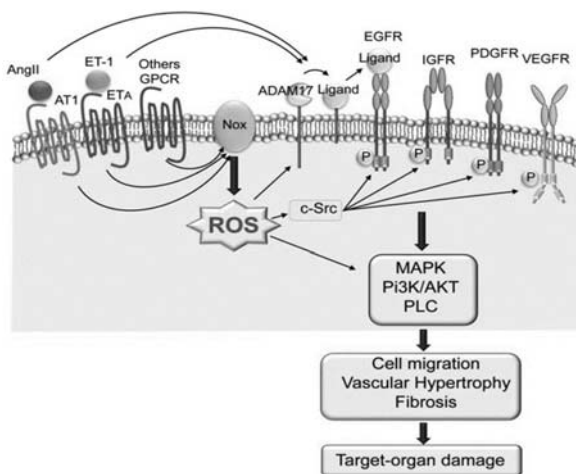


Рис. 2. Трансактивация рецепторов факторов роста (СКФ) ангиотензином II (Ang II) и эндотелином-1 (ET-1) через их рецепторы, связанные с G-белком (GPCR)

На рис. 2 показан механизм стимуляции реактивными метаболитами кислорода НАДФН-оксидазу (Nox), а также активации сигнальных путей АМК, которые влияют на сердечно-сосудистые процессы, что приводит к повреждению органов-мишеней, связанных с гипертонией. Повышенная биодоступность АМК в сосудах, индуцированная Ang II, ET-1 и другими вазоактивными пептидами, также вызывает активацию каналов  $Ca^{2+}$ , что приводит к накоплению внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , который, в свою очередь, активирует  $Ca^{2+}$ -чувствительные изоформы Nox в сосудистой сети, особенно Nox5, способствуя усилению окислительной сигнализации и повреждению сосудов [14; 15].

В 2021 году в журнале *Antioxidants* была представлена подборка 15 статей и обзоров, которые суммируют современные представления об окислительном стрессе и тоне сосудов [22]. Научный редактор этого сборника профессор G. Zalba отметил, что низкая концентрация активных метаболитов кислорода, особенно супероксидного анион-радикала и перекиси водорода, важна для физиологических клеточных процессов, модулируя несколько сигнальных путей. Напротив, окислительный стресс, возникающий в результате

дисбаланса из-за перепроизводства АМК и/или ослабления эндогенной антиоксидантной защиты, вовлечен в сосудистые заболевания, включая гипертонию и атеросклероз, и в основные факторы риска инсульта, инфаркта миокарда и сердечной недостаточности. Среди других эффектов оксидативный стресс изменяет экспрессию генов, вызывает эндотелиальную дисфункцию, способствует ремоделированию внеклеточного матрикса и обостряет воспалительные и стареющие сосудистые процессы. Ферменты, вырабатывающие оксиданты сосудов, включают НАДФН-оксидазы, ксантиноксидазы, липоксигеназы, митохондриальные оксидазы и синтазы оксида азота. «Мы до сих пор не до конца понимаем основные механизмы окислительного стресса и патологических эффектов, которые через увеличение производства АМК оказывают негативное влияние на сердечно-сосудистую систему» – отметил редактор. Выявление этих первопричин необходимо для улучшения лечения таких болезней. В этом специальном выпуске уделено внимание новым механизмам окислительного стресса, его влиянию на воспаление и дисфункцию сосудов, идентификации основных ферментов, генерирующих АМК, с особым вниманием к семейству НАДФН-оксидазы и митохондриям, а также потенциальной пользе воздействия на эти специфические источники окислительного воздействия. Главные сосудистые ферменты, вырабатывающие оксиданты, включают НАДФН-оксидазы, ксантиноксидазы, липоксигеназы, митохондриальные оксидазы и синтазы оксида азота (NOS). Но, как отметил редактор, мы до сих пор не до конца понимаем лежащие в основе механизмы окислительного стресса и патологические эффекты, связанные с тонусом сосудов. Все вышеизложенное определяет актуальность исследования, материалы которого изложены в данной монографии

### Список использованной литературы к разделу «Заключение»

1. Goldstone, B. The general practitioner and the general adaptation syndrome / B. Goldstone // S. Afr. Med. J. – 1952. – Vol. 26. – P. 88–92, 106–109.
2. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессу: механизмы и защитные перекрестные эффекты / Ф.З. Меерсон // Нур. med. j. – 1993. – №4. – С. 23–30.
3. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика / Ф.З. Меерсон. – М.: Наука, 1981. – 278 с.

4. Апчел В.Я. Исторические аспекты изучения проблемы стресса / В.Я. Апчел, В.М. Лымаренко, Н.В. Павлова, О.В. Леонтьев // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2012. – №4 (40). – С. 255–260.

5. Парахонский А.П. Стресс как механизм адаптации, её нарушения и их фармакологическая коррекция / А.П. Парахонский // «Наука и образование». Матер. IV Междунар. конф. – М.: Перо, 2015. – С. 32–37.

6. Szabo, S. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief “Letter” to the Editor # of Nature / S. Szabo, Y. Tache, A. Somogyi // Stress (Amsterdam, Netherlands). – 2012. – Vol. 15 (5). – P. 472–478. – Doi:10.3109/10253890.2012.710919

7. Yurkevicius, B.R. Human cold habituation: Physiology, timeline, and modifiers / Yurkevicius B.R., Alba B.K., Seeley A.D. [et al.] // Temperature. – 2022. – Vol. 9. Issue 2. – P. 122–157. – <https://doi.org/10.1080/23328940.2021.1903145>

8. Coffman J.A. Chronic stress, physiological adaptation and developmental programming of the neuroendocrine stress system / J.A. Coffman // Future Neurology. – 2020. – Vol. 15. №1. – Review Open Access. – <https://doi.org/10.2217/fnl-2019-0014>

9. McEwen, B.S. Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease / B.S. McEwen, P.J. Gianaros // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1186. – P. 190–222. – doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x

10. Lin, L. A moderate duration of stress promotes behavioral adaptation and spatial memory in young C57BL/6J mice. / L. Lin, J. Zhang, X. Dai [et al.] // Brain Sci. – 2022. – Vol. 12. – P. 1081. – <https://doi.org/10.3390/brainsci12081081>

11. Winkler, Z. The metabolic stress response: Adaptation to acute-, repeated- and chronic challenges in mice / Z. Winkler, K. Horváth, B. Juhász [et al.] // iScience. – Vol. 25. Issue 8, 19 August 2022, 104693. – doi: 10.1016/j.isci.2022.104963

12. Nedeljkovic, Z.S. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction / Z.S. Nedeljkovic, N. Gokce, J. Loscalzo // Postgrad. Med. J. – 2003. – Vol. 79. – P. 195–200.

13. Schulz, E. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension / E. Schulz, T. Gori, T. Münzel // *Hypertens. Res.* – 2011. – Vol. 34. – P. 665–673. – doi: 10.1038/hr.2011.39

14. Touyz, R.M. Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension / R.M. Touyz [et al.] // *Canadian J. Card.* – 2020. – Vol. 36. Issue 5. – H. 659–670. – <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.081>.

15. Touyz, R.M. Redox stress defines the small artery vasculopathy of hypertension: how do we bridge the bench-to-bedside gap? / Touyz R.M. [et al.] // *Circ. Res.* – 2017. – Vol. 120 (1). – P. 1721–1723. – <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310672>

16. Cat, A.N.D.A.C. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature / A.N.D. Cat [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. – Vol. 10 (1). – P. 1110–1120. – [https://doi: 10.1089/ars.2012.4641](https://doi.org/10.1089/ars.2012.4641).

17. Montezano, A.C. Angiotensin II and vascular injury / A.C. Montezano [et al.] // *Current hypertension reports.* – 2014. – T. 16. №6. – C. 431–440.

18. Masi, S. Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation / S. Masi, M. Uliana, A. Viridis // *Vascul. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 115 (1). – P. 13–17. – doi: 10.1016/j.vph.2019.01.004.

19. Rautureau, Y. Endothelin in hypertension: an update / Y. Rautureau, E.L. Schiffrin // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2012. – Vol. 21 (2). – P. 128–36. – doi: 10.1097/MNH.0b013e32834f0092.

20. Touyz, R.M. Vascular smooth muscle contraction in hypertension / R.M. Touyz. [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2018. – Vol. 114 (4). – P. 529–539. – doi: 10.1093/cvr/cvy023. 1 (2018), pp. 529-539

21. Camargo, L.L. Vascular Nox (NADPH oxidase) compartmentalization, protein hyperoxidation, and endoplasmic reticulum stress response in hypertension / L.L. Camargo al.] // *Hypertension.* – 2018. – Vol. 72 (1). – P. 235–246. – doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10824.

22. Zalba, G. Oxidative stress in vascular pathophysiology: still much to learn / G. Zalba // *Antioxidants.* – 2021. – Vol. 10 (5). – P. 673. – doi.10.3390/antiox10050673

Для заметок



*Научное издание*

Яцковская Наталья Михайловна  
Чиркин Александр Александрович

## **СТРЕСС И ТОНУС СОСУДОВ**

Монография

Чебоксары, 2023 г.

Редактор *профессор А. А. Чиркин*  
Компьютерная верстка *Е. В. Кузнецова*  
Дизайн обложки *Н. В. Фирсова*

Подписано в печать 10.01.2023 г.

Дата выхода издания в свет 13.01.2023 г.

Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.  
Гарнитура Times. Усл. печ. л. 6,51. Заказ К-1078. Тираж 500 экз.

Издательский дом «Среда»  
428005, Чебоксары, Гражданская, 75, офис 12  
+7 (8352) 655-731  
info@phsreda.com  
https://phsreda.com

Отпечатано в Студии печати «Максимум»  
428005, Чебоксары, Гражданская, 75  
+7 (8352) 655-047  
info@maksimum21.ru  
www.maksimum21.ru