

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ NO-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА СОСУДОВ СЕРДЦА КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ДЕЙСТВИЕ СТРЕССОРОВ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

БЕЛЯЕВА Л.Е., ФЕДЧЕНКО А.Н., ЛАЗУКО С.С., ЛИГЕЦКАЯ И.В., ОРЕХОВА Н.И.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2017. – Том 16, №2. – С. 58-69.

THE PECULIARITIES OF DISORDERS OF NO-DEPENDENT MECHANISMS REGULATING CORONARY VESSELS TONE OF RATS WHICH FELT THE STRESSORS EFFECT IN THE PRENATAL PERIOD

BELYAEVA L.E., FEDCHENKO A.N., LAZUKO S.S., LIGETSKAYA I.V., OREKHOVA N.I.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2017;16(2):58-69.

Резюме.

Цель: изучить роль оксида азота, образуемого эндотелиоцитарной и индуцибельной NO-синтазой, в механизмах снижения тонуса сосудов сердца и нарушения сократительной активности миокарда у половозрелых крыс, матери которых перенесли действие стрессоров на организм во время беременности.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на изолированных по методу Лангендорфа сердцах (n=121) белых беспородных 3-месячных крыс, матери которых подвергались хроническому стрессу во время беременности. Сердца, сокращающиеся в изометрическом режиме в условиях постоянного потока, перфузировали раствором Кребса-Хензелята стандартного состава а) в условиях интактной NO-синтазы; б) при добавлении в раствор не-селективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира N- ω -нитро-L-аргинина (L-NAME, 60 мкМ); в) при введении в перфузионный раствор селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины (S-MT, 10 мкМ). Исследовали изменения коронарного перфузионного давления (КПД), развиваемого внутрижелудочкового давления (РВД), а также скорости сокращения и расслабления миокарда в условиях ингибирования различных изоформ NO-синтаз.

Результаты. Под влиянием как L-NAME, так и S-MT в сердцах самцов, перенесших пренатальный стресс, сниженные значения КПД статистически значимо повышались. Несмотря на то, что снижения КПД в изолированных сердцах самок после пренатального стресса обнаружено не было, используемые ингибиторы NO-синтазы не вызвали статистически значимого повышения КПД в изолированных сердцах самок, матери которых подвергались действию стрессоров во время беременности. Более того, значения КПД, зарегистрированные в сердцах самок группы «потомство-стресс» в условиях введения L-NAME в перфузионный раствор, оказались на 16,6-27,8% меньше, чем в изолированных сердцах самок контрольного потомства при использовании этого ингибитора NO-синтазы. Ни L-NAME, ни S-MT не восстанавливали сниженные после пренатального стресса РВД, а также скорость сокращения и расслабления миокарда.

Закключение. Характер образования оксида азота эндотелиоцитарной и индуцибельной NO-синтазой в коронарных сосудах половозрелых самок и самцов, матери которых перенесли хронический стресс во время беременности, существенно отличается. Гиперпродукция оксида азота является важной причиной снижения базального тонуса сосудов изолированных сердец 3-месячных самцов, матери которых подвергались действию стрессоров во время беременности. Избыточное образование NO в миокарде крыс, перенесших пренатальный стресс, не является основной причиной снижения сократительной функции сердца у этих животных.

Ключевые слова: пренатальный стресс, коронарные сосуды, оксид азота, эндотелиоцитарная NO-синтаза, индуцибельная NO-синтаза.

Abstract.

Objectives. To investigate the role of nitric oxide produced by the endotheliocytic and inducible NO-synthase in the mechanisms of decreasing coronary vessels tone and disorders of the myocardium contractility in mature rats whose mothers felt the stressors effect during their pregnancy.

Material and methods. The experiments were performed on the isolated by Langendorff method hearts (n=121) of white mongrel 3-month rats whose mothers were exposed to chronic stress during their pregnancy. The hearts contracting in isometrical mode in the conditions of the constant coronary flow, were perfused with standard Krebs-Henseleit solution a) on intact NO-synthase activity; b) on adding a non-selective inhibitor of NO-synthase of N- ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 60 mcM) to the solution; c) on adding selective inhibitor of inducible NO-synthase of S-methylisothiourea (S-MT, 10 mcM) to the perfused solution. Changes in coronary perfusion pressure (CPP), developed intraventricular pressure (DIP) and the velocity of contraction and relaxation of the myocardium during inhibition of different isoforms of NO-synthases were investigated.

Results. Under the influence of both L-NAME and S-MT decreased values of CPP increased statistically significantly in the hearts of males that underwent prenatal stress. Despite the fact that there was no reduction of CPP in the isolated hearts of females after prenatal stress, the applied inhibitors of NO-synthase did not cause any statistically significant increase of CPP in the isolated hearts of females whose mothers were exposed to the stressors effect during pregnancy. Moreover, the values of CPP registered in the hearts of the females of the group "the offspring-stress" after the introduction of L-NAME into the perfusion solution turned out to be by 16,6-27,8 % lower than those in the isolated hearts of the control female offspring after using this NO-synthase inhibitor. Neither L-NAME nor S-MT restored reduced after prenatal stress DIP, as well as the velocity of contraction and relaxation of the myocardium.

Conclusions. The character of nitric oxide formation by the endotheliocytic and inducible NO-synthase is significantly different in the coronary vessels of mature females and males whose mothers underwent chronic stress during pregnancy. Hyperproduction of nitric oxide is an important cause of the reduction of basal vascular tone of the isolated hearts of 3-month males whose mothers experienced the stressors effect during pregnancy. The excessive formation of NO in the myocardium of rats exposed to prenatal stress, is not the main cause of decreased contractile function of the heart in these animals.

Key words: prenatal stress, coronary vessels, nitric oxide, endotheliocytic NO-synthase, inducible NO-synthase.

Воздействие различных стрессоров на организм во время беременности способствует развитию структурных и функциональных отклонений сердечно-сосудистой системы у потомства, что создает предпосылки для высокой уязвимости сердца и кровеносных сосудов к действию патогенов и программирует развитие различных заболеваний сердечно-сосудистой системы в постнатальной жизни [1]. Так, интересные результаты были получены в ходе масштабного эпидемиологического исследования в Германии, целью которого была оценка распространенности заболеваний сердечно-сосудистой системы в популяции лиц (n=50 940) в возрасте до 40 лет, матери которых за год до наступления беременности или во время беременности перенесли психоэмоциональный стресс вследствие гибели кровных родственников, супругов или лишения родительских прав. Пренатальный стресс увеличивал риск развития заболеваний сердца и артериальной гипертензии у таких индивидуумов, причем распространенность заболеваний сердечно-сосудистой системы была несколько выше среди женщин, но не среди мужчин, матери которых перенесли стресс не-

задолго до возникновения беременности или в ходе её [2]. Более того, риск развития этих заболеваний особенно возрастал в случаях, когда смерть близкого родственника беременной женщины была непредсказуемой, внезапной. Именно непредсказуемость развития дистресса у некоторых беременных побуждает, во-первых, исследовать механизмы программирования заболеваний сердечно-сосудистой системы у их детей и, во-вторых, проводить поиск способов минимизации последствий пренатального стресса в тех случаях, когда предотвратить его невозможно. В этом смысле экспериментальные исследования на животных особенно актуальны, так как большая плодовитость и меньшая продолжительность жизни экспериментальных животных, по сравнению с таковыми у человека, позволяют получить значительное количество данных в течение сравнительно короткого промежутка времени.

Ранее нами было показано, что действие стрессоров на организм беременных крыс оставляет специфические «следы», выявляемые в изолированных сердцах их 3-месячного потомства. Эти «следы» характеризовались снижением ба-

зального тонуса сосудов сердца, нарушением их ауторегуляторной способности, снижением давления, развиваемого миокардом левого желудочка, а также признаками его систолической и диастолической дисфункции [3]. Известно, что базальный тонус коронарных сосудов изолированного сердца определяется структурными и функциональными свойствами сосудистой стенки и, главным образом, – состоянием сосудистых гладкомышечных клеток, которое изменяется под влиянием вазоконстрикторов и вазодилататоров [4]. Оксид азота, наряду с фактором гиперполяризации и простаглинном, являются основными вазодилататорами эндотелиоцитарного происхождения, способными ослаблять базальный тонус сосудов сердца [5]. Метаболиты, образующиеся в миокарде в условиях его гиперфункции, также способны снижать тонус сосудов сердца [6]. Характер образования оксида азота в коронарных артериях половозрелого потомства, матери которых подвергались «хроническому непредсказуемому стрессу» во время беременности, неизвестен, так же, как и вклад этого оксида азота в механизмы нарушения тонуса сосудов сердца и его сократительной активности. Цель работы – изучить роль оксида азота, образуемого различными изоформами NO-синтазы, в механизмах снижения тонуса сосудов сердца и нарушения сократительной активности миокарда у половозрелых крыс, матери которых перенесли действие стрессоров на организм во время беременности.

Материал и методы

Эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990). После наступления беременности у 4-месячных крыс, первым днем наступления которой считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке, методом случайного выбора формировали две группы, одна из которых была необходима для рождения контрольного потомства. Беременных крыс второй группы подвергали нескольким видам стрессорных воздействий в виде лишения

пищи в течение суток, 20-минутной иммобилизации в воде ($t=23\pm 2^\circ\text{C}$) в пластиковом пенале, а также обеспечивая контакт с экскрементами *Felis* в течение одних суток по описанной ранее методике [3]. После рождения потомства за ним наблюдали в течение 3 месяцев, а затем внутрибрюшинно вводили крысам гепарин (500 ЕД/кг) и нембутал (60 мг/кг), и на препаратах изолированных по методу Лангендорфа сердец крыс ($n=121$) исследовали тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда с использованием установки для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных ИH-SR типа 844/1 (HSE-НА, ФРГ), оборудованную датчиками для измерения аортального и развиваемого внутрижелудочкового давления (Isotec pressure transducer). Датчики были соединены с модулями для измерения давления ТАМ-А, HSE-НА. Изолированные сердца крыс сокращались в постоянном ритме с частотой 240 в минуту при подаче импульсов от электростимулятора С типа – 224 (HSE-НА, ФРГ) при объемной скорости коронарного потока (ОСКП), составлявшей 6, 8, 10 и 15 мл/мин., в изометрическом режиме (с латексным баллончиком, введенным в полость левого желудочка). Компьютерную регистрацию и обработку измеряемых показателей осуществляли с помощью программы АСAD (HSE, ФРГ). По истечении 15 мин., необходимых для стабилизации работы сердец, регистрировали коронарное перфузионное давление (КПД), а также силовые и скоростные показатели его работы: развиваемое внутрижелудочковое давление (РВД), скорость сокращения и расслабления миокарда левого желудочка.

В первой серии экспериментов сердца перфузировали раствором Кребса-Хензелята стандартного состава, насыщенным карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2); во второй серии опытов в перфузионный раствор добавляли неселективный ингибитор NO-синтазы - метиловый эфир N- ω -нитро-L-аргинина (L-NAME) в концентрации 60 мкМ; в третьей серии экспериментов в перфузионный раствор добавляли селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы (iNOS) S-метилизотиомочевину (S-MT) в дозе 10 мкМ.

Статистическую обработку цифровых данных, представленных в виде Ме (15%; 85%), проводили с помощью программы «Statistica 10.0», с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия цифровых показателей считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты

В первой серии экспериментов при перфузии изолированных сердец крыс раствором Кребса-Хензлелайта стандартного состава было установлено, что ступенчатое увеличение ОСКП от 6 до 15 мл/мин. сопровождалось приростом КПД во всех группах (рис. 1а, 1б, 2а, 2б). Однако в сердцах самцов группы «потомство-стресс» КПД оказалось сниженным на 13,5 и 30,7% при ОСКП 10 и 15 мл/мин., по сравнению со значениями КПД, выявленными в группе «потомство-контроль» соответствующего пола. В сердцах самцов группы «потомство-стресс» также выявляли сниженное РВД при всех уровнях ОСКП в среднем на 38,5%, по сравнению с таковым, обнаруженным в сердцах самцов группы «потомство-контроль». Скорость как сокращения, так и расслабления миокарда левого желудочка (dLVPdp max и dLVPdp min) самцов, перенесших пренатальный стресс, оказалась сниженной примерно в одинаковой степени – на 35,6 и 38,6%, соответственно, по сравнению с аналогичными показателями в сердцах самцов группы «потомство-контроль» при ОСКП 8 мл/мин. (табл. 1). Это свидетельствует о снижении миогенного тонуса сосудов сердца и нарушении его сократительной функции у 3-месячных самцов, матери которых подвергались действию стрессоров во время беременности.

В то же время, величины КПД, зарегистрированные при перфузии сердец самок группы «потомство-стресс», не отличались от соответствующих значений, обнаруженных в сердцах самок группы «потомство-контроль» при всех уровнях ОСКП. При этом РВД в сердцах самок, матери которых подвергались действию стрессоров во время беременности, оказались сниженными в среднем на 26,5% при ОСКП 8-15 мл/мин., по сравнению с величинами РВД, зарегистрированными в сердцах самок контрольного потомства (табл. 2). Скорость сокращения и расслабления миокарда сердец самок, матери которых подвергались действию стрессоров во время беременности, не отличалась от показателей сократительной функции миокарда, выявленных в сердцах самок контрольного потомства. Следовательно, базальный тонус сосудов сердца самок, перенесших пренатальный стресс, не изменялся, но у этих животных снижалась сократительная функция изолированного сердца.

Во второй серии экспериментов в перфу-

зионный раствор добавляли L-NAME, неселективный ингибитор NO-синтазы, pIC50 которого для индуцибельной и эндотелиоцитарной NO-синтазы составляет 4,3 и 5,6, соответственно [7]. В условиях применения L-NAME КПД, регистрируемое в сердцах самцов группы «потомство-контроль» статистически значимо увеличивалось при всех уровнях ОСКП, причем в среднем прирост составил 36,3% (сравнение с показателями, зарегистрированными в сердцах контрольного потомства с интактной NO-синтазой, рис. 1а). Давление, развиваемое миокардом левого желудочка в изолированных сердцах контрольного потомства-самцов, напротив, уменьшалось при всех уровнях ОСКП в среднем на 37,8%, по сравнению с РВД, зарегистрированным в сердцах контрольного потомства без использования L-NAME (табл. 1). Под влиянием этого ингибитора скорость сокращения и расслабления миокарда изолированных сердец крыс-самцов группы «потомство-контроль» статистически значимо уменьшалась при ОСКП, составлявшей 8, 10 и 15 мл/мин. (табл. 1). Сходный характер изменений КПД и РВД был выявлен и при добавлении L-NAME в раствор при перфузии сердец самок контрольного потомства: прирост КПД составил в среднем 35,8% (рис. 2а), а падение РВД – 27,9% в среднем, по сравнению с показателями, полученными при перфузии сердец-самок группы «потомство-контроль» в условиях интактной NO-синтазы (табл. 2). Снижение скорости сокращения и расслабления миокарда под влиянием L-NAME в этих сердцах было статистически незначимым. Эти результаты указывают на важную роль базальной продукции NO в механизмах поддержания тонуса сосудов сердца и его сократительной активности в контроле.

Ингибирование NO-синтазы с помощью L-NAME в изолированных сердцах самцов группы «потомство-стресс» также сопровождалось статистически значимым приростом КПД, по сравнению со значениями, зарегистрированными в сердцах самцов этой же группы в условиях сохраненной активности NO-синтазы, при всех изучаемых уровнях ОСКП (рис. 1а). Однако, при ОСКП 10 и 15 мл/мин., КПД под влиянием L-NAME все же был на 25,8 и 29,0% ниже, соответственно, по сравнению с величинами КПД, зарегистрированными в сердцах самцов контрольного потомства с введением этого же ингибитора (рис. 1а). Сниженные показатели РВД, а также dLVPdp max и dLVPdp min в сердцах самцов, ма-

Таблица 1 – Показатели сократительной способности миокарда изолированного сердца крыс-самцов, перенесших пренатальный стресс, в условиях интактной и ингибированной NO-синтазы

	ОСКП, мл/мин	к ♂ (n=10)	с ♂ (n=11)	к ♂ L-NAME (n=10)	с ♂ L-NAME (n=10)	к ♂ S-MT (n=10)	с ♂ S-MT (n=10)
РВД, мм рт.ст.	6	50,40 (35,60; 69,40)	32,10* (22,50; 45,60)	30,20* (21,40; 34,10)	32,25* (28,40; 38,20)	55,60 (47,10; 65,90)	33,60* (18,10; 63,00)
	8	75,80 (53,30; 97,10)	42,90* (35,70; 55,30)	43,40* (35,40; 57,50)	41,10* (37,00; 56,60)	76,30 (58,30; 94,70)	43,60* ^S (38,30; 45,00)
	10	86,70 (70,70; 108,80)	53,20* (47,40; 73,00)	55,35* (48,40; 80,30)	52,40* (42,40; 63,20)	90,75 (70,00; 123,50)	55,60* ^S (49,70; 84,60)
	15	115,05 (99,00; 135,80)	74,00* (66,80; 107,80)	78,10* (64,20; 93,40)	72,30* (58,30; 81,80)	116,85 (95,10; 155,00)	83,40* ^S (70,90; 90,50)
dIVPdp max, мм рт.ст.	6	1010,00 (740,00; 1511,00)	1002,00 (718,00; 1480,00)	833,00 (740,00; 1018,00)	937,00 (848,00; 1141,00)	1130,00 (769,00; 1697,00)	984,50 (771,00; 1403,00)
	8	1835,00 (1230,00; 2375,00)	1141,00* (949,00; 1588,00)	894,00* (864,00; 1419,00)	1332,00 (1079,00; 1480,00)	1688,50 (1108,00; 2406,00)	1249,00* (1110,00; 1357,00)
	10	2205,00 (1479,00; 3025,00)	1419,00 (1280,00; 2976,00)	1210,00* (1002,00; 1650,00)	1516,50* (1095,00; 1665,00)	2163,50 (1576,00; 3207,00)	1527,00* ^S (1326,00; 1943,00)
	15	2613,50 (1555,00; 3567,00)	1820 (1604,00; 3514,00)	1916,50* (1342,00; 2483,00)	1690,00* (1465,00; 2113,00)	2483,00 (1983,00; 4210,00)	2043,00* ^S (1774,00; 2246,00)
dIVPdp min, мм рт.ст.	6	655,00 (555,00; 956,00)	586,00 (540,00; 941,00)	640,50 (465,00; 802,00)	577,50 (467,00; 796,00)	786,50 (525,00; 987,00)	626,00 (386,00; 817,00)
	8	1079,50 (756,00; 1388,00)	663,00* (586,00; 1079,00)	759,00* (654,00; 1064,00)	714,00* (601,00; 961,00)	1236,00 (617,00; 1357,00)	748,00* (571,00; 894,00)
	10	1318,00 (963,00; 1866,00)	833,00 (756,00; 2020,00)	952,50* (862,00; 1396,00)	879,00* (725,00; 1234,00)	1226,00 (864,00; 2113,00)	979,00* (768,00; 1143,00)
	15	1734,50 (1370,00; 2005,00)	1172,00 (1091,00; 2020,00)	1276,50* (987,00; 1659,00)	1141,00* (848,00; 1372,00)	1522,50 (1187,00; 2483,00)	1218,00* ^S (925,00; 1480,00)

Примечания: * – p<0,05 – сравнение с группой «контроль»; S – p< 0,05 сравнение с группой «контроль + SMT»; к – группа «контроль»; с – группа «стресс»; ♂ – самцы; ♀ – самки; S-MT – введение S-метилизотиомочевины в перфузионный раствор; L-NAME – введение метилового эфира N-ω-нитро-L-аргинина в перфузионный раствор.

тери которых подвергались действию стрессоров во время беременности, под влиянием L-NAME не восстанавливались при всех изучаемых уровнях ОСКП (табл. 1). По-видимому, гиперпродукция NO в миокарде самцов, перенесших пренатальный стресс, не наблюдалось.

Прирост КПД в сердцах самок группы «потомство-стресс» под действием L-NAME был статистически не значимым. Более того, КПД в этих сердцах было меньше, чем в сердцах самок-контрольного потомства при использовании этого ингибитора NO-синтазы на 16,6-27,8% при

Таблица 2 – Показатели сократительной способности миокарда изолированного сердца крыс-самок, перенесших пренатальный стресс, в условиях интактной и ингибированной NO-синтазы

	ОСКП, мл/мин	к ♀ (n=10)	с ♀ (n=10)	к ♀ L-NAME (n=10)	с ♀ L-NAME (n=10)	к ♀ S-MT (n=10)	с ♀ S-MT (n=10)
РВД, мм рт.ст.	6	48,60 (30,70; 58,00)	36,70 (29,10; 44,90)	29,00* (25,00; 36,30)	35,40* (23,90; 39,80)	44,20 (28,50; 50,80)	36,40 (28,90; 41,40)
	8	72,30 (66,20; 73,40)	49,15* (39,00; 58,40)	57,90* (41,40; 70,30)	54,70* (38,00; 64,00)	68,30 (53,20; 80,10)	47,50 (41,90; 76,30)
	10	89,40 (80,90; 98,10)	69,65* (47,10; 92,30)	70,00* (43,90; 74,50)	70,00* (52,70; 79,40)	83,20 (58,70; 94,60)	55,40* ^s (42,50; 82,40)
	15	109,50 (94,30; 125,00)	81,80* (64,10; 109,00)	77,00* (59,20; 78,30)	90,00* (65,70; 100,00)	100,65 (89,00; 106,90)	69,30* ^s (54,50; 91,40)
dIVPdp max, мм рт.ст.	6	948,50 (555,00; 1804,00)	946,50 (864,00; 1912,00)	940,50 (598,00; 1064,00)	802,00 (632,00; 1110,00)	880,50 (786,00; 964,00)	940,50 (571,00; 1172,00)
	8	1226,00 (586,00; 2113,00)	1187,50 (956,00; 2020,00)	1172,00 (764,00; 1403,00)	1087,00 (864,00; 1712,00)	1085,00 (956,00; 1542,00)	1162,00 (910,00; 1635,00)
	10	1557,50 (833,00; 2406,00)	1603,50 (1249,00; 2344,00)	1203,00 (875,00; 1658,00)	1303,00 (1095,00; 2020,00)	1322,00 (1079,00; 1573,00)	1404,50 (1126,00; 1897,00)
	15	1642,00 (879,00; 3069,00)	1819,50 (1588,00; 2606,00)	1423,50 (942,00; 1728,00)	1735,00 (1295,00; 2529,00)	1387,50 (1218,00; 1626,00)	1627,00 (1162,00; 2298,00)
dIVPdp min, мм рт.ст.	6	539,50 (401,00; 1018,00)	655,50 (609,00; 895,00)	609,00 (446,00; 848,00)	555,50 [#] (447,00; 678,00)	632,50 (403,00; 771,00)	602,50 (447,00; 740,00)
	8	821,00 (493,00; 1434,00)	894,50 (586,00; 1164,00)	783,50 (571,00; 1127,00)	725,00 (601,00; 1095,00)	738,00 (632,00; 1110,00)	752,00 (555,00; 1033,00)
	10	1195,00 (540,00; 1604,00)	1118,00 (833,00; 1635,00)	948,50 (740,00; 1295,00)	879,00 (771,00; 1296,00)	848,00 (725,00; 1264,00)	892,50 (725,00; 1172,00)
	15	1164,00 (524,00; 1881,00)	1233,50 (971,00; 1681,00)	1071,50 (844,00; 1364,00)	1095,00 (864,00; 1218,00)	1098,00 (1002,00; 1326,00)	1128,50 (989,00; 1207,00)

Примечание: * – p<0,05 сравнение с группой потомство-контроль; # – p<0,05 – сравнение с группой «стресс»; S – p<0,05 сравнение с группой потомство-контроль+SMT; к – группа «контроль»; с – группа «стресс»; ♂ – самцы; ♀ – самки; S-MT – введение S-метилэтилэтиомочевины в перфузионный раствор; L-NAME – введение метилового эфира N-ω-нитро-L-аргинина в перфузионный раствор.

ОСКП, составлявшей 8, 10 и 15 мл/мин. (рис. 2а). Эти данные требуют осмысления, т.к., несмотря на отсутствие снижения базального тонуса коронарных сосудов у самок, перенесших пренатальный стресс, сократительный ответ сосудов

изолированного сердца на L-NAME оказался сниженным. Сниженные показатели РВД в сердцах самок группы «потомство-стресс» под влиянием L-NAME не восстанавливались до контрольных значений, а скорость сокращения и расслабления

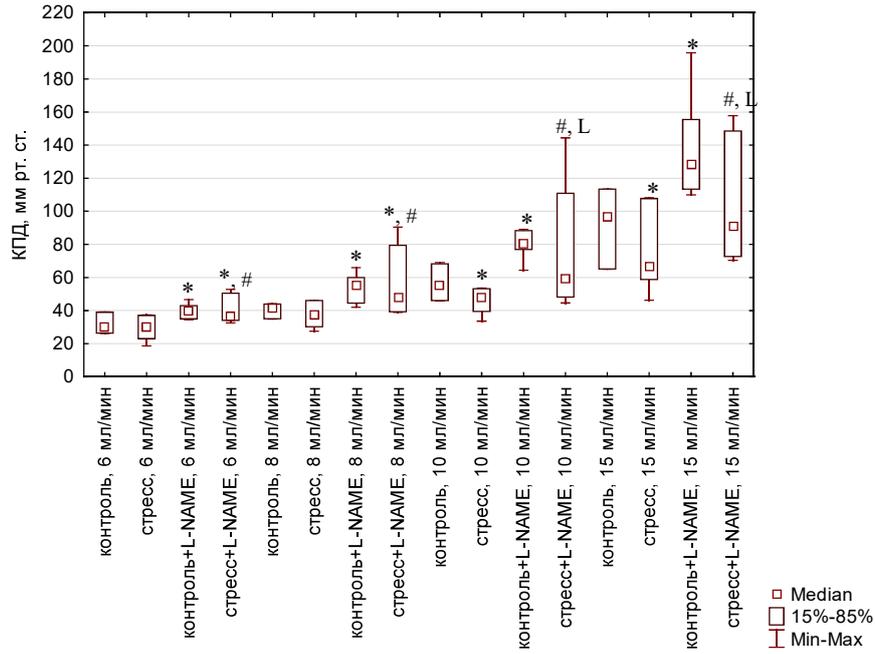


Рисунок 1а – Величины КПД, зарегистрированные в изолированных сердцах потомства-самцов в условиях применения L-NAME, мм рт. ст.: * – $p < 0,05$ сравнение с группой «потомство-контроль» при соответствующем уровне ОСКП; # – $p < 0,05$ сравнение с группой «потомство-стресс» при соответствующем уровне ОСКП; L – $p < 0,05$ сравнение с группой «потомство-контроль+L-NAME» при соответствующем уровне ОСКП.

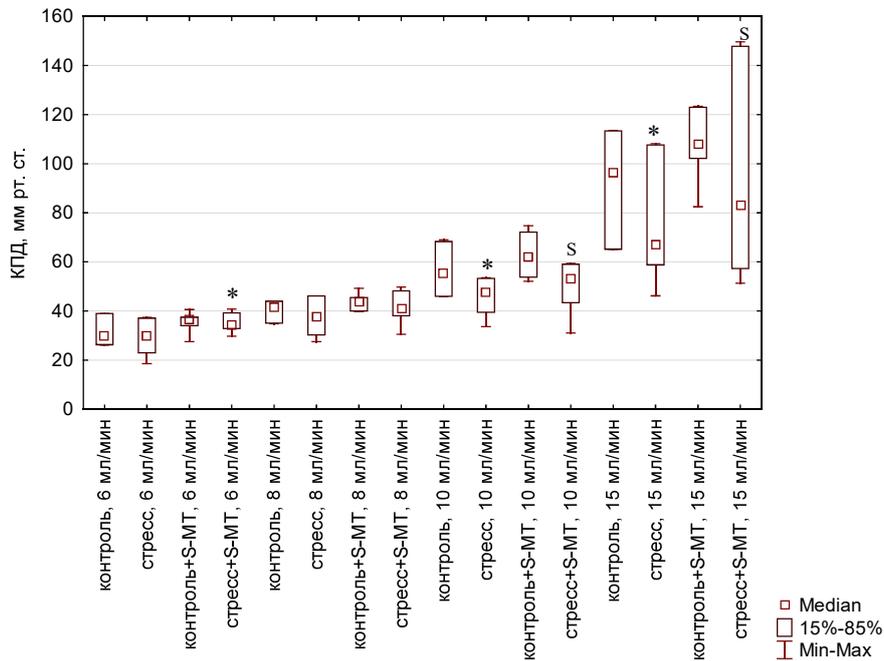


Рисунок 1б – Величины КПД, зарегистрированные в изолированных сердцах потомства-самцов в условиях применения S-MT, мм рт. ст.: * – $p < 0,05$ сравнение с группой «потомство-контроль» при соответствующем уровне ОСКП; S – $p < 0,05$ сравнение с группой «потомство-контроль+SMT» при соответствующем уровне ОСКП.

миокарда статистически значимо не изменялась и не отличалась от контрольных цифр (табл. 2). Вероятно, снижение РВД в сердцах крыс-самок, перенесших пренатальный стресс, не было обу-

словлено гиперпродукцией NO в миокарде.

В третьей серии экспериментов для изучения роли оксида азота, синтезируемого индуцибельной NO-синтазой, в механизмах нарушения

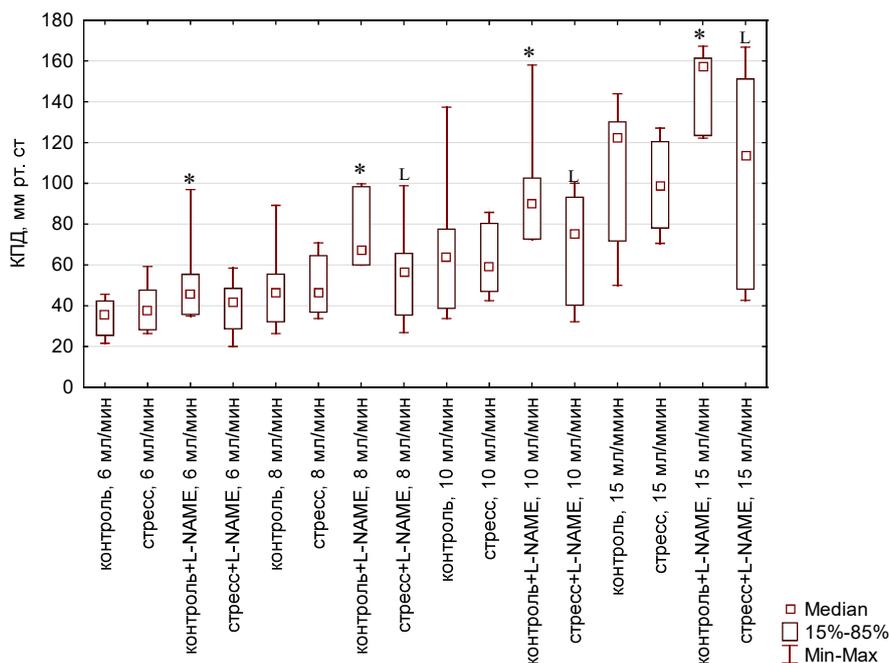


Рисунок 2а – Влияние ингибитора NO-синтазы L-NAME на величины КПД, зарегистрированные в изолированных сердцах потомства-самок, мм рт. ст.: * – $p < 0,05$ сравнение с группой «потомство-контроль» при соответствующем уровне ОСКП; L – $p < 0,05$ сравнение с группой «потомство-контроль+L-NAME» при соответствующем уровне ОСКП.

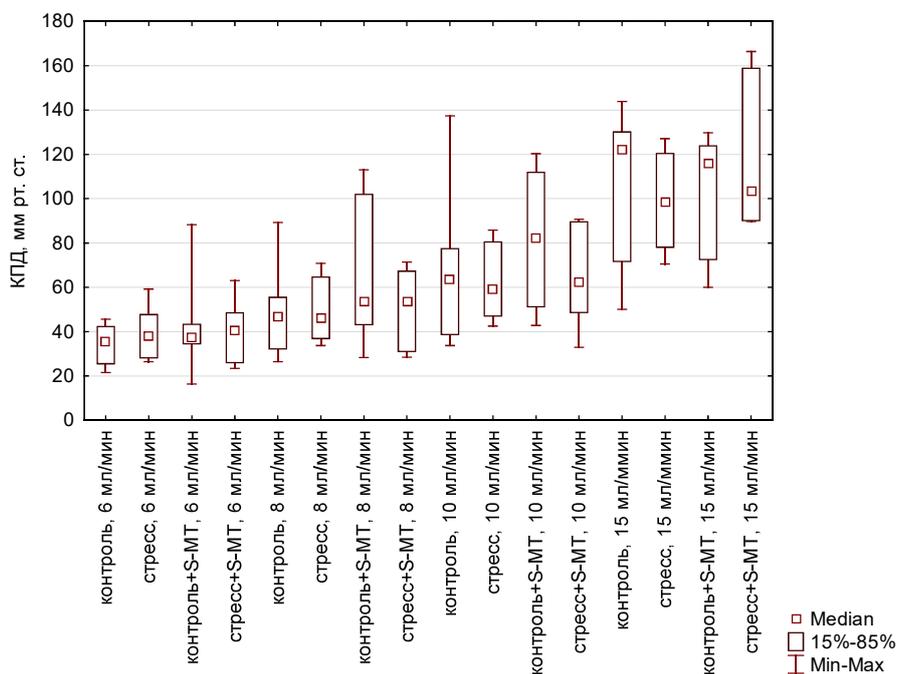


Рисунок 2б – Влияние ингибитора NO-синтазы S-MT на величины КПД, зарегистрированные в изолированных сердцах потомства-самок, мм рт. ст.

тонуса сосудов сердца и его сократительной активности у половозрелого потомства крыс, перенесших действие стрессоров во время беременности, в перфузионный раствор добавляли селективный

ингибитор iNOS S-метилизотиомочевину. В этих условиях в сердцах контрольного потомства как самцов, так и самок все изучаемые показатели (КПД, РВД а также dLVPdp max и dLVPdp min)

не изменялись при всех уровнях ОСКП, по сравнению с показателями, зарегистрированными в сердцах группы «потомство-контроль» соответствующего пола с интактной iNOS (рис. 16, 26, табл. 1, 2). Следовательно, в клетках коронарных сосудов и миокарда изолированных сердец контрольного потомства индуцибельная NO-синтаза не была активирована.

Ингибирование iNOS в сердцах самцов группы «потомство-стресс» привело к повышению КПД таким образом, что при ОСКП 8, 10 и 15 мл/мин. этот показатель статистически не отличался от значений КПД в сердцах самцов группы «потомство-контроль» с интактной NO-синтазой, а при ОСКП 6 мл/мин. даже превышал соответствующую величину на 15,7%. Эти данные свидетельствуют о важном вкладе избыточной продукции NO индуцибельной NO-синтазой в механизмы снижения базального тонуса сосудов сердца у самцов, матери которых подвергались действию стрессоров во время беременности. В то же время, сниженные величины РВД, зарегистрированные в сердцах самцов группы «потомство-стресс» под влиянием S-MT не восстанавливались, так же, как и не возрастала сниженная скорость сокращения и расслабления миокарда (табл. 1). Следовательно, гиперпродукция NO iNOS в миокарде не была причиной нарушения сократительной функции миокарда у самцов, перенесших действие стрессоров в пренатальном периоде.

В сердцах самок группы «потомство-стресс» ингибирование iNOS не сопровождалось статистически значимым увеличением КПД при всех уровнях ОСКП (рис. 26). Под влиянием S-MT в сердцах самок, матери которых подвергались действию стрессоров во время беременности, не происходило восстановления сниженного РВД, а скорость сокращения и расслабления миокарда существенно не изменялась и не отличалась от таковой, зарегистрированной в сердцах крыс-самок, перенесших действие пренатального стресса, с интактной iNOS. Следовательно, избыточного образования оксида азота индуцибельной NO-синтазой в коронарных сосудах и миокарде самок, перенесших пренатальный стресс, не было.

Обсуждение

Изменение продукции оксида азота различными изоформами NO-синтазы является одним из

проявлений дисфункции эндотелия кровеносных сосудов [8], которая может программироваться ещё в пренатальном периоде [9]. Исследований, в ходе которых изучалась эндотелийзависимая вазодилатация кровеносных сосудов потомства, перенесшего пренатальный стресс, сравнительно немного, причем в качестве объекта чаще всего использовалась мезентериальная артерия, но не коронарные артерии. Например, показано, что 3-кратное введение беременным крысам липополисахарида приводит к снижению выраженности расслабления колец мезентериальных артерий, выделенных из организмов их половозрелого потомства, в ответ на ацетилхолин и нитропруссид, причем в клетках мезентериальной артерии уменьшается экспрессия эндотелиоцитарной NO-синтазы (eNOS) и растворимой гуанилатциклазы [10]. Снижение экспрессии eNOS в мезентериальной артерии потомства обнаружено также после белкового голодания беременных крыс [11]. Комбинированный стресс (в виде 3-кратной в течение дня иммобилизации крыс в пластиковых пеналах по 30 мин. с 15-й по 21-й дни беременности при ярком освещении) приводит к повышению сократительного ответа изолированных из организма половозрелого потомства мезентериальных артерий на нейропептид Y и на электрическую стимуляцию [12], что создает предпосылки для развития спазма этих артерий у потомства, перенесшего пренатальный стресс, при развитии стрессовых ситуаций в постнатальной жизни.

Нами получены данные, указывающие на развитие дисфункции эндотелия коронарных сосудов у половозрелого потомства крыс, перенесших «хронический непредсказуемый стресс» во время беременности, причем проявления этой дисфункции имеют специфический характер у потомства-самцов и самок. Поскольку как L-NAME, так и S-MT значительно повышали сниженные значения КПД в изолированных сердцах 3-месячных самцов, перенесших пренатальный стресс, можно полагать, что важной причиной снижения миогенного тонуса коронарных сосудов самцов в этих условиях была гиперпродукция NO эндотелиоцитарной, но, главным образом – индуцибельной NO-синтазой. Кстати, в клетках микроглии крыс, перенесших пренатальный стресс, отмечается стимуляция этого фермента [13]. Повышение активности iNOS в коронарных сосудах способствует не только нарушению механизмов регуляции тонуса сосудов

сердца, но также способствует развитию атеросклероза [14], поэтому обнаруженный нами факт может рассматриваться в качестве важного механизма, объясняющего программирование заболеваний сердечно-сосудистой системы у организмов, перенесших пренатальный стресс. В сердцах потомства-самок, перенесших пренатальный стресс, снижения базального тонуса коронарных сосудов выявлено не было. Введение L-NAME вызывало незначительный коронароконстрикторный эффект (даже меньший, чем в контроле), а S-MT вообще не приводил к статистически значимым изменениям КПД. Эти данные являются косвенным подтверждением «скрытого» дефицита оксида азота, вырабатываемого эндотелиоцитарной NO-синтазой коронарных сосудов самок, перенесших пренатальный стресс. Гипотетически, этот факт можно объяснить действием нескольких механизмов или их сочетанием: (1) нарушением образования оксида азота эндотелиоцитарной NO-синтазой в результате снижения экспрессии eNOS, нарушения ее компартиментализации в кавеолах или снижения активности этого фермента вследствие дефицита субстратов и/или кофакторов NO-синтазной реакции; (2) разобщением eNOS с образованием этим ферментом супероксидного радикала или пероксинитрита; (3) снижением активности гуанилатциклазы или нарушением цГМФ-независимых механизмов действия NO; (4) уменьшением биодоступности оксида азота из-за его инактивации активными формами кислорода; (5) изменениями «молекулярных мишеней» для NO. Кроме того, нельзя исключить возможности поддержания адекватного базального тонуса сосудов сердца у самок, матери которых перенесли действие стрессоров во время беременности, другими альтернативными механизмами (повышенным образованием и действием фактора гиперполяризации, простациклина, изменением образования и действия эндотелина-1, изменением образования и действия метаболитов в сокращающемся миокарде, модификацией работы ионных каналов, изменением структурных свойств коронарных артерий и др.). Сходные данные, указывающие на возможное изменение активности eNOS в коронарных артериях половозрелых крыс-самок, матерям которых во время беременности вводили кокаин, были получены D. Xiao и соавторами [15]. Однако наши предположения требуют проведения дальнейших исследований.

Отсутствие увеличения сниженных по-

казателей сократительной функции миокарда в изолированных сердцах самок и самцов, перенесших пренатальный стресс, в условиях ингибирования eNOS и iNOS свидетельствует о том, что гиперпродукция оксида азота в миокарде не была основной причиной снижения сократительной функции миокарда у этих экспериментальных животных.

Заключение

Результаты исследования, выполненного нами, позволяют сделать следующие выводы:

1. Характер образования оксида азота эндотелиоцитарной и индуцибельной NO-синтазой в коронарных сосудах половозрелых самок и самцов, матери которых перенесли хронический стресс во время беременности, существенно отличается.

2. Гиперпродукция оксида азота является важной причиной снижения базального тонуса сосудов изолированных сердец 3-месячных самцов, матери которых подвергались действию стрессоров во время беременности.

3. Избыточное образование NO в миокарде крыс, перенесших пренатальный стресс, не является основной причиной снижения сократительной функции сердца у этих животных.

Исследование выполнено в рамках задания темы ГПНИ Республики Беларусь 2.29 на 2016-2017 гг. «Оценить отдаленные последствия пренатального стресса на тонус коронарных сосудов и обоснование способов предупреждения выявленных нарушений».

Литература

1. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease / P. D. Gluckman [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2008 Jul. – Vol. 359, N 1. – P. 61–73.
2. Prenatal exposure to maternal stress following bereavement and cardiovascular disease: A nationwide population-based and sibling-matched cohort study / O. Plana-Ripoll [et al.] // Eur. J. Prevent. Cardiol. – 2016 Jul. – Vol. 23, N 10. – P. 1018–1028.
3. Половые особенности нарушений тонуса сосудов сердца и его сократительной активности у потомства крыс, перенесших хронический стресс во время беременности / Л. Е. Беляева [и др.] // Вестн. ВГМУ. – 2016. – Т. 15, № 5. – С. 44–51.
4. Endothelial regulation of coronary microvascular tone under physiological and pathophysiological conditions / W. M. Chilian [et al.] // Eur. Heart. J. – 1993 Nov. – N 14, suppl. I. – P. 55–59.

5. Fleming, I. Paracrine functions of the coronary vascular endothelium / I. Fleming, J. Bauersachs, R. Busse // *Mol. Cell. Biochem.* – 1996 Apr. – Vol. 157, N 1/2. – P. 137–145.
6. Feigl, O. Coronary physiology / O. Feigl // *Physiol. Rev.* – 1983 Jan. – Vol. 63, N 1. – P. 1–205.
7. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes / R. Boer [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2000 Nov. – Vol. 58, N 5. – P. 1026–1034.
8. Endothelial dysfunction in coronary artery disease / T. F. Lüscher [et al.] // *Annu. Rev. Med.* – 1993. – Vol. 44. – P. 395–418.
9. Louey, S. The prenatal environment and later cardiovascular disease / S. Louey, K. L. Thornburg // *Early. Hum. Dev.* – 2005 Sep. – Vol. 81, N 9. – P. 745–751.
10. Prenatal lipopolysaccharide exposure causes mesenteric vascular dysfunction through the nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate pathway in offspring / X. Wang [et al.] // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2015 Sep. – Vol. 86. – P. 322–330.
11. Atorvastatin restores endothelial function in offspring of protein-restricted rats in a cholesterol-independent manner / C. Torrens [et al.] // *Hypertension.* – 2009 Apr. – Vol. 53, N 4. – P. 661–667.
12. Prenatal stress in the rat results in increased blood pressure responsiveness to stress and enhanced arterial reactivity to neuropeptide Y in adulthood / N. Igosheva [et al.] // *J. Physiol.* – 2007 Jul. – Vol. 582, pt. 2. – P. 665–674.
13. Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells / J. Ślusarczyk [et al.] // *Front. Cell. Neurosci.* – 2015 Mar. – Vol. 9. – P. 82.
14. Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice / T. Miyoshi [et al.] // *Life Sci.* – 2006 Jul. – Vol. 79, N 6. – P. 525–531.
15. Xiao, D. Prenatal cocaine exposure causes sex-dependent impairment in the myogenic reactivity of coronary arteries in adult offspring / D. Xiao, S. Yang, L. Zhang // *Hypertension.* – 2009 Nov. – Vol. 54, N 5. – P. 1123–1128.

Поступила 23.02.2017 г.

Принята в печать 04.04.2017 г.

References

1. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med.* 2008 Jul;359(1):61-73. doi: 10.1056/NEJMra0708473.
2. Plana-Ripoll O, Liu X, Momen NC, Parner E, Olsen J, Li J. Prenatal exposure to maternal stress following bereavement and cardiovascular disease: A nationwide population-based and sibling-matched cohort study. *Eur J Prev Cardiol.* 2016 Jul;23(10):1018-28. doi: 10.1177/2047487315585294.
3. Belyaeva LE, Fedchenko AN, Lazuko SS, Ligetskaya IV, Orekhova NI. Sexual disorders of vascular tone of the heart and its contractile activity in offspring of rats with chronic stress during pregnancy. *Vestn VGMU.* 2016;15(5):44-51. (In Russ.)
4. Chilian WM, Kuo L, DeFily DV, Jones CJ, Davis MJ. Endothelial regulation of coronary microvascular tone under physiological and pathophysiological conditions. *Eur Heart J.* 1993 Nov;14 Suppl I:55-9.
5. Fleming I, Bauersachs J, Busse R. Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Mol Cell Biochem.* 1996 Apr;157(1-2):137-45.
6. Feigl O. Coronary physiology. *Physiol Rev.* 1983 Jan;63(1):1-205.
7. Boer R, Ulrich WR, Klein T, Mirau B, Haas S, Baur I. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol Pharmacol.* 2000 Nov;58(5):1026-34.
8. Lüscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu Rev Med.* 1993;44:395-418. doi: 10.1146/annurev.me.44.020193.002143
9. Louey S, Thornburg KL. The prenatal environment and later cardiovascular disease. *Early Hum Dev.* 2005 Sep;81(9):745-51. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2005.07.001
10. Wang X, Wang J, Luo H, Chen C, Pei F, Cai Y, et al. Prenatal lipopolysaccharide exposure causes mesenteric vascular dysfunction through the nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate pathway in offspring. *Free Radic Biol Med.* 2015 Sep;86:322-30. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.040.
11. Torrens C, Kelsall CJ, Hopkins LA, Anthony FW, Curzen NP, Hanson MA. Atorvastatin restores endothelial function in offspring of protein-restricted rats in a cholesterol-independent manner. *Hypertension.* 2009 Apr;53(4):661-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.122820
12. Igosheva N, Taylor PD, Poston L, Glover V. Prenatal stress in the rat results in increased blood pressure responsiveness to stress and enhanced arterial reactivity to neuropeptide Y in adulthood. *J Physiol.* 2007 Jul;582(Pt 2):665-74. doi: 10.1113/jphysiol.2007.130252
13. Ślusarczyk J, Trojan E, Głombik K, Budziszewska B, Kubera M, Lasoń W, et al. Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells. *Front Cell Neurosci.* 2015 Mar;9:82. doi: 10.3389/fncel.2015.00082
14. Miyoshi T, Li Y, Sih DM, Wang X, Laubach VE, Matsumoto AH, et al. Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci.* 2006 Jul 4;79(6):525-31. doi: 10.1016/j.lfs.2006.01.043
15. Xiao D, Yang S, Zhang L. Prenatal cocaine exposure causes sex-dependent impairment in the myogenic reactivity of coronary arteries in adult offspring. *Hypertension.* 2009 Nov;54(5):1123-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138024

Submitted 23.02.2017

Accepted 04.04.2017

Сведения об авторах:

Беляева Л.Е. – к.м.н., доцент, зав. кафедрой патологической физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Федченко А.Н. – м.м.н., преподаватель кафедры патологической физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Лазуко С.С. - к.б.н., доцент, зав. кафедрой нормальной физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Лигецкая И.В. – м.б.н., ассистент кафедры патологической физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Орехова Н.И. – магистрант кафедры патологической физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Belyaeva L.E. – Candidate of Medical Sciences, associate professor, head of the Chair of Pathologic Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Fedchenko A.N. – Master of Medical Sciences, teacher of the Chair of Pathologic Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Lazuko S.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, head of the Chair of Normal Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Ligetskaya I.V. – Master of Biological Sciences, teacher of the Chair of Pathologic Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Orekhova N.I. – MSc (Medicine) student of the Chair of Pathologic Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра патологической физиологии. E-mail: lyudm.belyaeva2013@yandex.by – Беляева Людмила Евгеньевна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210023, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Pathologic Physiology. E-mail: lyudm.belyaeva2013@yandex.by – Lyudmila E. Belyaeva.