

© ЛАЗУКО С.С., 2016

РОЛЬ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ НО-СИНТАЗЫ В МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ У КРЫС, АДАПТИРОВАННЫХ К СТРЕССУ

ЛАЗУКО С.С.

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

Вестник ВГМУ. – 2016. – Том 15, №2. – С. 34-43.

THE ROLE OF THE INDUCIBLE NO-SYNTHASE IN THE REGULATION MECHANISMS OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE BK_{Ca} -CHANNELS IN THE CORONARY VESSELS OF RATS ADAPTED TO STRESS

LAZUKO S.S.

Educational Establishment «Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University», Vitebsk, Republic of Belarus
Vestnik VGMU. 2016;15(2):34-43.

Резюме.

Цель – изучить влияние индуцибелной NO-синтазы (iNOS) на функциональную активность кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости (BK_{Ca} -каналов) гладкомышечных клеток коронарных сосудов крыс в процессе формирования адаптации к стрессу.

Эксперименты выполнены на 134 белых беспородных крысах-самках массой 200-250 г. Адаптацию проводили иммобилизацией животных в вертикальном положении в пластиковом пенале, заполненном водой ($t=23\pm2^{\circ}\text{C}$) до уровня шеи, в течение 8 суток. Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда исследовали на препаратах сердец крыс, изолированных по методу Лангендорфа и перфузируемых в условиях постоянной объемной скорости коронарного потока (10 мл/мин) раствором Кребса-Хензелайта стандартного состава. Блокаду iNOS осуществляли S-метилизотиомочевиной (S-MT, 10^{-6}M). Для изучения роли BK_{Ca} -каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда в перфузионный раствор добавляли блокатор BK_{Ca} -каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) в концентрации 1 мМ. Вклад BK_{Ca} -каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца определяли по величине вазоконстрикторного эффекта ТЭА, т.е. по величине прироста коронарного перфузионного давления. Концентрацию iNOS и эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), стабильных продуктов деградации NO (NO^2/NO^3), определяли иммуноферментным и спектрофотометрическим методами, соответственно.

Установлено, что добавление в перфузионный раствор S-MT не приводит к изменению тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда как в контрольной, так и в группе адаптированных животных. Коронароконстрикторный эффект ТЭА у адаптированных животных выражен в той же степени, что и в контроле. При совместной блокаде BK_{Ca} -каналов и iNOS в группе адаптированных животных отмечается увеличение коронарного перфузионного давления на 30% по сравнению с контрольными показателями в этих же условиях. Характерное для адаптации увеличение концентрации NO^2/NO^3 наблюдается на фоне снижения концентрации в сыворотке крови iNOS и повышения eNOS.

Заключение. При адаптации к стрессу наблюдается увеличение функциональной активности BK_{Ca} -каналов, которое проявляется лишь после блокады iNOS, что указывает на выраженную зависимость их активности от NO, продукируемого данным ферментом.

Ключевые слова: BK_{Ca} -каналы, адаптация, индуцибелная NO-синтаза.

Abstract.

To investigate the influence of the inducible NO-synthase (iNOS) on the functional activity of potassium ion channels activated by calcium with high conduction (BK_{Ca} -channels) in the smooth muscle cells of the coronary vessels of rats in the process of the formation of adaptation to stress.

Experiments were carried out on 134 female white mongrel rats weighing 200-250 g. Adaptation to stress was reproduced by upright immobilization of rats in the plastic box filled with water ($t=23\pm2^{\circ}\text{C}$) up to the level of the neck during 8 days. Coronary vessels' tone and myocardial contractility were investigated on isolated by Langendorff's method rats' hearts perfused at the constant coronary flow (10 ml/min) with the standard composition of Krebs-Henseleit solution. The blockade of iNOS was realized with S-methylisothiourea (S-MT, 10^{-6} M). Tetraethylammonium (TEA), a blocker of BK_{Ca} -channels, was added to the perfusion solution (1 mM) to evaluate the role of these channels in the regulation of the coronary blood flow and myocardial contractility. The contribution of BK_{Ca} -channels to the regulation of coronary vessels' tone was assessed by TEA-mediated vasoconstriction effect, i.e. the increment of the coronary perfusion pressure. The concentration of iNOS, endothelial NO-synthase (eNOS) and stable products of NO degradation ($\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$) were detected with immunoenzyme assay and spectrophotometric methods, accordingly.

It has been established that the addition of S-MT to the perfusion solution doesn't lead to any changes of the coronary vessels' tone and myocardial contractility both in the control group and in the group of the «adapted to stress». Animals coronary constrictor effect of TEA in the adapted animals was expressed to the same extend as in the control group. A simultaneous blockade of BK_{Ca} -channels and iNOS results in the increase of coronary perfusion pressure by in the group of adapted animals 30% compared with the control data under the same conditions. A typical for the adaptation elevation of $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ concentration was accompanied by a decrease of iNOS and an increase of eNOS concentration.

Conclusions. The adaptation to stress leads to the functional activation of the BK_{Ca} -channels, which reveals itself only after the blockade of iNOS, thus demonstrating strong dependence of their activity on the iNOS-derived nitric oxide.

Key words: BK_{Ca} -channels, adaptation, inducible NO-synthase.

Умеренный эмоциональный стресс вызывает многовекторный метаболический и кардиоваскулярный ответ, обеспечивающий адаптацию организма к возможным последующим более тяжелым стрессорным воздействиям. Исследования на изолированных сердцах мышей показали, что кардиопротекция, вызванная прекондиционированием, устраняется блокадой кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости (BK_{Ca} -каналы), активатор BK_{Ca} -каналов NS-1619 оказывает кардиопротективный эффект [1]. Эти наблюдения доказывают, что наряду с K_{ATP} -каналами, BK_{Ca} -каналы вовлечены в механизмы защиты сердца от ишемических инсультов [1]. BK_{Ca} -каналы, расположенные в гладкомышечных клетках сосудистой стенки, принимают также участие в регуляции сосудистого тонуса [2]. Нарушение экспрессии гена, кодирующего $\beta 1$ -субъединицу BK_{Ca} -каналов, приводит к его увеличению и развитию артериальной гипертензии [3]. Снижение функциональной активности BK_{Ca} -каналов является одной из причин сосудистых «катастроф» при сахарном диабете [4], а ее увеличение при геморрагическом шоке сопровождается разви-

тием гиперактивности сосудов [5].

Активность BK_{Ca} -каналов может изменяться под влиянием эндогенных сосудорасширяющих веществ [6]. Существует две гипотезы, объясняющие эффект монооксида азота (NO) на BK_{Ca} -каналы. Одна из них связана с активацией NO растворимой гуанилаткиназы с последующим увеличением производства цГМФ и активацией цГМФ-зависимой протеинкиназы, которая увеличивает активность BK_{Ca} -каналов. Существуют данные о прямом влиянии NO на BK_{Ca} -каналы [6]. Можно предположить, что BK_{Ca} -каналы способны изменять свою активность под действием биологически активных веществ, в частности вазоактивных метаболитов эндотелиального происхождения. Менее изучена роль BK_{Ca} -каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов при таких состояниях организма, когда образование вазоактивных метаболитов возрастает, включая адаптацию к стрессу. В ряде исследований было показано, что активность индуцибелной NO-синтазы (iNOS) вносит существенный вклад в формирование эффектов пре-, посткондиционирования и адаптации к факторам среды [7]. Однако роль NO, обра-

зумого *iNOS*, в модуляции функциональной активности BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов недостаточно исследована. В связи с этим целью работы было изучить влияние *iNOS* на функциональную активность кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости гладкомышечных клеток коронарных сосудов крыс в процессе формирования адаптации к стрессу.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 134 полновозрелых беспородных белых крысах-самках массой 200–250 г в осенне-зимний период. Животные содержались в стандартных условиях и имели свободный доступ к воде и пищи. Крысы были распределены на 4 группы: 1 – «контроль»; 2 – «стресс»; 3 – «адаптация»; 4 – «адаптация+стресс». Каждая группа включала 3 подгруппы: 1 – добавление в перфузационный раствор блокатора BK_{Ca} -каналов тетраэтиламмония (ТЭА); 2 – содержание в перфузате блокатора *iNOS* S-метилизотиомочевины (S-MT); 3 – совместное добавление в перфузационный раствор ТЭА и S-MT.

Эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990).

Экспериментальные модели. Адаптация к стрессу: крыс помещали в пластиковый пенал и погружали вертикально в воду ($t=23\pm2^{\circ}\text{C}$) до уровня шеи в первый день на 5 минут, во второй день на 10 минут, в третий день на 15 минут, после двухдневного перерыва процедуру повторяли по той же схеме [8]. Стресс вызывали путем фиксации животных в положении на спине без ограничения подвижности головы в течение 6 часов. По окончании иммобилизации крыс выпускали на 90 минут в клетку, затем брали в эксперимент.

Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах сердца крыс, изолированных по Лангендорфу. Сердца перфузировали раствором Кребса-Хензелайта стандартного состава, насыщенным карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2), в условиях постоянного потока, при объемной скорости коронарного потока (ОСКП), составляющей 10 мл/мин. Использовали установ-

ку для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных IH-SR типа 844/1 (HSE-НА, ФРГ), оборудованную датчиками для измерения аортального и развивающегося внутрижелудочкового давления (РВД) (Isotec pressure transducer). Датчики были соединены с модулями для измерения давления ТАМ-А, HSE-НА. Компьютерную регистрацию и обработку измеряемых показателей осуществляли с помощью программы ACAD (HSE, ФРГ). Сердца сокращались в постоянном ритме с частотой 240 ударов в минуту при подаче импульсов от электростимулятора С тип - 224 (HSE-НА, ФРГ). По истечении 15 минут, необходимых для стабилизации работы сердец, регистрировали РВД при помощи латексного баллончика постоянного объема, находящегося в левом желудочке.

Для изучения роли оксида азота, продуцируемого *iNOS*, в механизмах регуляции тонуса коронарных сосудов в перфузационный раствор добавляли высокоселективный блокатор *iNOS* S-метилизотиомочевину (S-MT, 10^{-6}M , Sigma, USA). Роли BK_{Ca} -каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда исследовали при помощи блокатора ТЭА в концентрации 1 мМ. Вклад BK_{Ca} -каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца определяли по величине вазоконстрикторного эффекта ТЭА, т.е. по величине прироста коронарного перфузационного давления, выраженного в % от исходного уровня.

Иммуноферментный анализ. Концентрацию ферментов *iNOS* и эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), используя тест-системы и реагенты для *iNOS* (Uscn, Life Science Inc. China, Lot L130827587) и eNOS (Cloud-Clone Corp. USA, Uscn, Life Science Inc., Lot L141013209), с помощью фотометра универсального Ф-300 ТП при $\lambda=450$ нм. Содержание *iNOS* в сыворотке крови выражали в нг/мл, eNOS в пг/мл.

Концентрацию стабильных продуктов деградации NO ($\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$) в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса при длине волны 540 нм результат выражали в мкМ [9].

Концентрацию С-реактивного белка в сыворотке крови определяли диагностическим набором C-Reactive Protein (CRP) BioSystems

(Испания), иммунотурбидиметрическим методом по инструкции производителя. Содержание С-реактивного белка выражали в мг/л.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel». Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%; 75%]. О достоверности различий между несвязанными выборками судили по критерию Манна-Уитни (U) и Уилкоксона (W). Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости 5% ($p<0,05$).

Результаты

В сердцах животных, перенесших стресс, коронарное перфузационное давление (КПД) и РВД снижалось в среднем на 23%, по сравнению с контрольными показателями ($p<0,05$) (табл. 1, рис. 1). Добавление в перфузационный раствор блокатора iNOS при перфузии сердец животных, перенесших стресс, приводило к восстановлению тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда до контрольных значений. Введение ТЭА в коронарное русло изолированных сердец крыс, под-

вергнутых иммобилизации, сопровождалось увеличением КПД на 68%, т.е. на 27% меньше, чем в контроле ($p<0,05$) (табл. 1, рис 2), РВД при этом не изменялось. Следовательно, стресс снижал эффективность действия ТЭА в отношении величины КПД, что может быть обусловлено снижением функциональной активности ВК_{Ca}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов. В изолированных сердцах крыс группы «Стресс» на фоне блокады синтеза NO интракоронарное введение ТЭА увеличивало КПД на 88% (табл. 1), развиваемое внутрижелудочковое давление было сопоставимо с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и ВК_{Ca}-каналов (табл. 1).

Таким образом, продолжительный эмоционально-болевой стресс у крыс подавляет активность ВК_{Ca}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов и создает выраженную зависимость их активности от функционирования iNOS.

В сердцах животных, адаптированных к стрессу, КПД и РВД не отличались от таковых в контроле (табл. 1, рис. 1). Добавление в перфузационный раствор S-MT не сопровождалось изменениями КПД и сократительной функции сердца, адаптированных к стрессу животных (табл. 1). Под влиянием ТЭА в группе живот-

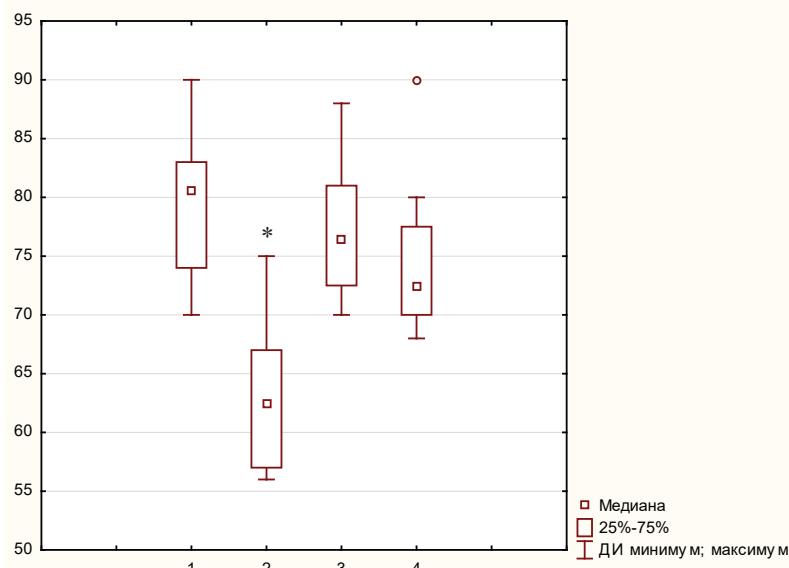


Рисунок 1 – Влияние стресса и адаптации на величину развиваемого внутрижелудочкового давления: по оси абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – «Контроль»; 2 – «Стресс»; 3 – «Адаптация»;

4 – «Адаптация+стресс»; по оси ординат – величина развиваемого внутрижелудочкового давления в мм рт. ст.; [25%-75%] – интерквартильный интервал, ДИ – доверительный интервал;

* - $p<0,05$, по сравнению с группой «Контроль».

Таблица 1 – Влияние стресса и адаптации на изменение коронарного перфузионного давления изолированного сердца крысы

Показатель	Группы экспериментальных животных и условия перфузии миокарда			
	Контроль без блокатора (n=8)	Стресс без блокатора (n=8)	Адаптация без блокатора (n=8)	Адаптация+стресс без блокатора (n=8)
Медиана, %	81,00	64,00 $p_1 < 0,0009$	76,00	79,50
Размах (Min-Max), %	75,00-95,00	55,00-69,00	69,00-86,00	72,00-86,00
95% ДИ для медианы, %	75,73-86,27	59,89-68,11	71,41-80,56	75,40-83,60
25-75 процентиль, %	77,50-85,00	59,00-65,50	74,50-80,25	75,75-80,00
	Контроль с S-метилизотиомочевиной (n=8)	Стресс с S-метилизотиомочевиной (n=8)	Адаптация с S-метилизотиомочевиной (n=8)	Адаптация+стресс с S-метилизотиомочевиной (n=8)
Медиана, %	87,00 $P_2 < 0,0026$	81,00	80,50	80,50
Размах (Min-Max), %	75,00-100,00	65,00-88,00	65,00-96,00	72,00-85,00
95% ДИ для медианы, %	79,63-94,37	75,14-86,86	69,73-91,27	76,86-84,14
25-75 процентиль, %	81,50-95,75	78,50-83,50	66,00-89,75	79,00-83,50
	Контроль с тетраэтиламмонием (n=8)	Стресс с тетраэтиламмонием (n=8)	Адаптация с тетраэтиламмонием (n=8)	Адаптация+стресс с тетраэтиламмонием (n=8)
Медиана, %	160,00 $P_1 < 0,017$	102,50 $P_1 < 0,001; P_2 < 0,017; P_3 < 0,0014$	157,50 $P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$	164,00 $P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$
Размах (Min-Max), %	140,00-179,00	97,00-118,00	135,00-165,00	145,00-187,00
95% ДИ для медианы, %	151,01-168,99	96,11-108,89	148,50-166,49	152,55-175,45
25-75 процентиль, %	155,75-165,00	99,50-111,00	145,00-161,00	157,50-171,50
	Контроль с тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевиной (n=8)	Стресс с тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевиной (n=8)	Адаптация с тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевиной (n=8)	Адаптация+стресс с тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевиной (n=8)
Медиана, %	173,00 $P_1 < 0,0015$	159,00 $P_1 < 0,0014; P_2 < 0,0015$	176,00 $P_1 < 0,001; P_2 < 0,001; P_3 < 0,011$	178,00 $P_1 < 0,001; P_2 < 0,001; P_3 < 0,011$
Размах (Min-Max), %	139,00-181,00	121,00-163,00	146,00-187,00	174,00-195,00
95% ДИ для медианы, %	158,56-187,44	146,66-171,34	162,68-189,32	172,16-183,84
25-75 процентиль, %	147,25-177,50	142,50-159,25	155,50-185,00	175,75-181,00

Примечание: p_1 – по сравнению с контрольной группой животных без блокатора; p_2 - по сравнению с той же группой, но без блокатора; p_3 – по сравнению с группой «контроль», содержащей тетраэтиламмоний. n – количество животных в группе.

ных «Адаптация» КПД увеличивалось на 98%, РВД не изменялось, и было выражено в той же степени, что и в контроле (рис. 2). Совместное

интракоронарное введение S-MT и ТЭА сопровождалось увеличением КПД на 117% ($p<0,05$, по сравнению с контрольными показателями

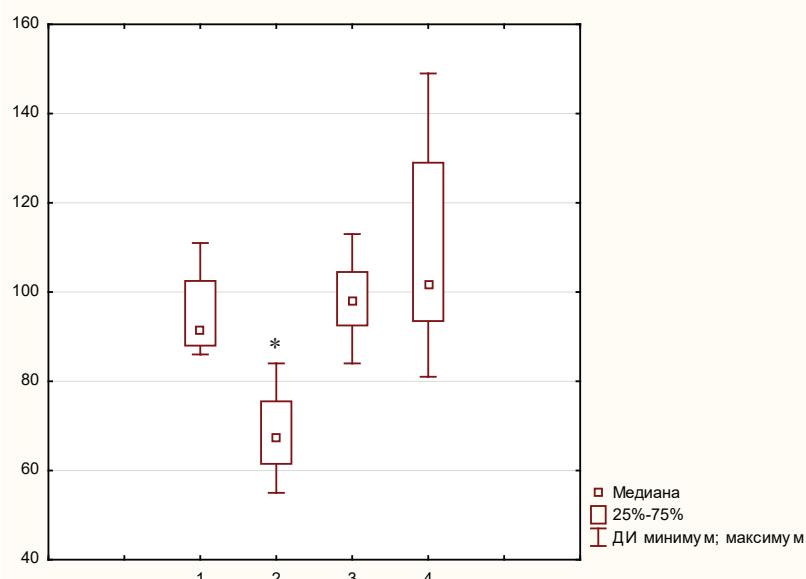


Рисунок 2 – Влияние блокады ВКСа-каналов тетраэтиламмонием (ТЭА) на изменение величины коронарного перфузионного давления у экспериментальных животных: по оси абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – «Контроль+ТЭА»; 2 – «Стресс+ТЭА»; 3 – «Адаптация+ТЭА»; 4 – «Адаптация+стресс+ТЭА»; по оси ординат – величина коронарного перфузионного давления, выраженная в %; [25%-75%] – интерквартильный интервал, ДИ – доверительный интервал;
* - $p<0,05$, по сравнению с группой «Контроль +ТЭА».

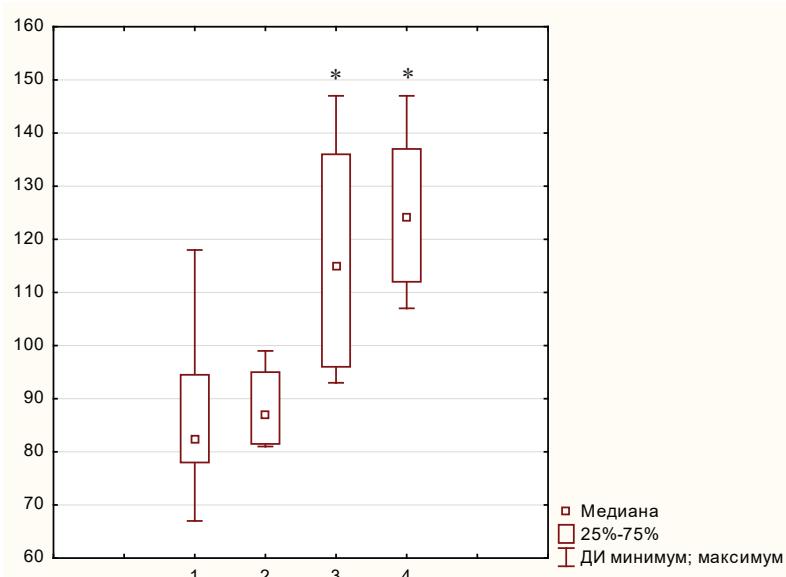


Рисунок 3 – Влияние совместной блокады ВК_{Ca}-каналов тетраэтиламмонием (ТЭА) и iNOS – S-метилизотиомочевиной (S-MT) на изменение величины коронарного перфузионного давления у экспериментальных животных: по оси абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – «Контроль+S-MT+ТЭА»; 2 – «Стресс+ S-MT+ТЭА»; 3 – «Адаптация +S-MT+ТЭА»; 4 – «Адаптация+стресс+ S-MT+ТЭА»; по оси ординат – величина коронарного перфузионного давления, выраженная в %; [25%-75%] – интерквартильный интервал, ДИ – доверительный интервал;
* - $p<0,05$, по сравнению с группой «Контроль+S-MT+ТЭА».

при совместной блокаде iNOS и BK_{Ca}-каналов (рис. 3), сократительная функция миокарда при этом не изменялась. Следовательно, блокада iNOS увеличила функциональную активность BK_{Ca}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов у крыс, адаптированных к стрессу.

В группе животных «Адаптация+стресс», КПД и РВД не отличались от показателей, выявленных в сердцах контрольных животных. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора S-MT не оказывало влияния на изменение КПД и сократительной функции миокарда в группе животных «адаптация+стресс» (табл. 1). Добавление в перфузионный раствор ТЭА сопровождалось изменением КПД и РВД в равной степени, что и в контрольной группе животных (табл. 1, рис. 2). В группе животных «Адаптация+стресс» при совместной блокаде iNOS и BK_{Ca}-каналов наблюдалось увеличение КПД на 125% (p<0,05, по сравнению с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и BK_{Ca}-каналов (рис. 3). В отношении сократительной функции миокарда коронароконстрикторный эффект ТЭА, был выражен в той же степени, что без добавления в перфузионный раствор блокатора S-MT. Исходя из вышеприведённых фактов можно заключить, что

адаптация к стрессу предупредила постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, а также вызываемое стрессом снижение функциональной активности BK_{Ca}-каналов.

Методом ИФА установлено, что в группе животных, перенесших стресс, концентрация eNOS в сыворотке крови снижалась на 54%, а индуцильной возрастала в 8 раз. В группе «адаптация» и «адаптация+стресс» содержание фермента eNOS увеличивалось в одинаковой степени в 1,3 раза, а концентрация iNOS не отличалась от контрольных показателей.

Концентрация NO²/NO³ в сыворотке крови крыс группы «стресс» и «адаптация» увеличивалась на 41 и 20% (p<0,05) (табл. 2) соответственно, по сравнению с контрольными значениями. В группе «адаптация+стресс» концентрация NO²/NO³ была такой же, как в контроле.

В группе «стресс» концентрация С-реактивного белка увеличивалась в 2 раза, по сравнению с контрольными показателями (p<0,05), напротив, в группах «адаптация» и «адаптация+стресс» концентрация С-реактивного белка не отличалась от показателей группы «контроль» (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние адаптации на концентрацию NO²/NO³ и С-реактивного белка в сыворотке крови экспериментальных животных

Группа	Показатель	NO ² /NO ³ , мкМ	С-реактивный белок, мг/л
Контроль (n=9)	Медиана, %	24,2	0,21
	Размах (Min-Max), %	18,0-31,10	0,06-0,25
	95% ДИ для медианы, %	21,11-27,29	0,13-0,29
	25-75 процентиль, %	21,60-26,70	0,07-0,23
Стресс (n=9)	Медиана, %	33,06 p<0,01	0,36 p<0,04
	Размах (Min-Max), %	22,44-44,94	0,12-0,48
	95% ДИ для медианы, %	26,55-39,58	0,24-0,39
	25-75 процентиль, %	29,94-43,06	0,24-0,39
Адаптация (n=9)	Медиана, %	31,81 p<0,0001	0,05
	Размах (Min-Max), %	26,81-35,56	0,03-0,26
	95% ДИ для медианы, %	31,81-29,52	0,01-0,11
	25-75 процентиль, %	29,31-33,69	0,04-0,06
Адаптация+стресс(n=9)	Медиана, %	23,5	0,20
	Размах (Min-Max), %	19,60-27,50	0,05-0,60
	95% ДИ для медианы, %	21,55-25,45	0,05-0,35
	25-75 процентиль, %	21,60-24,30	0,18-0,22

Примечание: p – по сравнению с группой «контроль»; n-количество животных в группе.

Обсуждение

Адаптация к стрессу предупредила постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов и снижение сократительной функции миокарда, а также вызванное иммобилизационным стрессом снижение эффективности действия тетраэтиламмония на тонус коронарных сосудов. После адаптации к стрессу блокада iNOS приводила к повышению активности BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов. Этот факт наводит на мысль о том, что NO, образуемый iNOS при адаптации к стрессу, ограничивает, но в отличие от иммобилизации не нарушает функциональную активность BK_{Ca} -каналов.

Обнаружение двукратного увеличения содержания С-реактивного белка в крови крыс группы «стресс» отражает развитие в этих условиях системного воспаления низкой интенсивности [10]. Системное воспаление низкой интенсивности в наших исследованиях сопровождается снижением концентрации eNOS на 54%, что может свидетельствовать о разобщении данного фермента [11], в результате чего eNOS, помимо NO, может производить супероксидный радикал или другие активные формы кислорода с последующим уменьшением биодоступности NO при стрессе [11].

Адаптация к стрессу так же, как и иммобилизация, сопровождается усилением продукции NO [12], но, в отличие от стресса, низкой концентрацией фермента iNOS, и увеличенной концентрацией фермента eNOS, а также отсутствием системного воспаления низкой интенсивности. К основным механизмам адаптации можно отнести ограничение постстрессорной активации перекисного окисления липидов мембран [13], гиперпродукции монооксида азота и усиление его депонирования в эндотелии и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов [14], увеличение образования белков теплового шока, сохранение функции ионных насосов, а также регуляцию редокс-состояния клеток [6, 15]. Регуляция редокс-состояния клеток приводит к изменению их фенотипических свойств и, тем самым, предотвращает нарушение функции калиевых каналов при адаптации к стрессу. В качестве одного из механизмов, лежащих в основе контроля постстрессорной активности iNOS при адаптации, можно рассматривать и формиро-

вание так называемых «аггресом» (aggresome) [16]. Формирование «аггресом», включающих белок iNOS, происходит в цитозоле, там же локализуется и индуцибелная NO-синтаза. Образуемый ею NO оказывает прямое влияние на механизм сокращения миофиламентов гладкомышечных клеток коронарных сосудов и кардиомиоцитов. Клетки, в которых iNOS располагается преимущественно в составе «аггресом», продуцируют монооксид азота в значительно меньших концентрациях. Таким образом, формирование агресом в цитозоле можно рассматривать как механизм ограничения постстрессорной гиперпродукции NO индуцибелной NO-синтазой [17].

Заключение

Полученные экспериментальные данные позволяют констатировать, что активация индуцибелной NO-синтазы в результате адаптации к стрессу, вероятно, играет важную роль в поддержании адекватной биодоступности NO, участвующего в механизмах локальной регуляции тонуса сосудов сердца. Усиленная продукция эндотелием NO (и, возможно, других веществ эндотелиального происхождения) при адаптации к стрессу по механизму обратной связи подавляет, но не нарушает базальную активность BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов. Следовательно, активность BK_{Ca} -каналов на фоне повышенного образования NO индуцибелной NO-синтазой в условиях адаптации к стрессу создает условия для осуществления полноценного адаптационного ответа и является проявлением нормальных взаимоотношений систем локальной регуляции тонуса сосудов сердца. При этом скрытая активация BK_{Ca} -каналов при адаптации имеет биологическую целесообразность и может лежать в основе ограничения избыточного поступления внутрь сосудистых гладкомышечных клеток ионов кальция и предупреждения коронаропатии при последующем стрессе.

Литература

1. Opening of Ca^{2+} -activated K^+ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice / X. Wang [et al.] // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004 Nov. – Vol. 287, N 5. – P. H2070–H2077.

2. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone / J. Ledoux [et al.] // Physiology. – 2006 Feb. – Vol. 21. – P. 69–78.
3. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells / E. A. Ko [et al.] // J. Smooth Muscle Res. – 2008 Apr. – Vol. 44, N 2. – P. 65–81.
4. The BK channel beta1 subunit gene is associated with human baroreflex and blood pressure regulation / M. Gollasch [et al.] // J. Hypertens. – 2002 May. – Vol. 20, N 5. – P. 927–933.
5. Potassium channel contributions to afferent arteriolar tone in normal and diabetic rat kidney / C. M. Troncoso Brindeiro [et al.] // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2008 Jul. – Vol. 295, N 1. – P. F171–178.
6. Clapp, L. H. Stoking up BKCa channels in hemorrhagic shock: which channel subunit is really fueling the fire? / L. H. Clapp, N. O. Nelson // Cir. Res. – 2007 Aug. – Vol. 101, N 5. – P. 436–438.
7. Kyle, D. B. The regulation of BK channel activity by pre- and post-translational modifications / D. B. Kyle, A. P. Braun / Front. Physiol. – 2014 Aug. – Vol. 5. – P. 316.
8. Chronic stress adaptiation of the nitric oxide synthases and IL-1 β levels in brain structures and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity induced by homotypic stress / A. Gadek-Michalska [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2015 Jun. – Vol. 66, N 3. – P. 427–440.
9. Вовлечен ли оксид азота в адаптационную защиту органов от стрессорных повреждений? / Е. Б. Маленюк [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 126, № 9. – С. 274–277.
10. Восстановление NO²/NO³- цинковой пылью в присутствии амиачного комплекса сульфата меди / И. С. Веремей [и др.] // 40 лет фармацевтическому фа-культету : сб. науч. тр. – Витебск, 1999. – С. 274–276.
11. Involvement of the endothelin and nitric oxide systems in the pathogenesis of renal ischemic damage in an experimental diabetic model / N. Abu-Saleh [et al.] // Life Sci. – 2012 Oct. – Vol. 91, N 13/14. – P. 669–675.
12. Kietadisorn, R. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities / R. Kietadisorn, R. P. Juni, A. L. Moens // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2012 Mar. – Vol. 302, N 5. – P. E481–E495.
13. Normobaric, intermittent hypoxia conditioning is cardio- and vasoprotective in rats / E. B. Manukhina [et al.] // Exp. Biol. Med. – 2013 Dec. – Vol. 238, N 12. – P. 1413–1420.
14. Meerzon, Ф. З. Постстрессорная активация синтеза нуклеиновых кислот и белков и ее роль в адаптационных реакциях организма / Ф. З. Meerzon, В. И. Павлова, Г. Т. Сухих // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1982. – № 5. – С. 3–17.
15. Депонирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе / Е. Б. Манухина [и др.] // Изв. РАН. Сер. биол. – 2002. – № 5. – С. 585–596.
16. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells / I. Yu. Malyshev [et al.] // FEBS Lett. – 1996 Aug. – Vol. 391, N 1/2. – P. 21–23.
17. The physiologic aggresome mediates cellular inactivation of iNOS / L. Pandit [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2009 Jan. – Vol. 106, N 4. – P. 1211–1215.
18. Wang, T. Inducible nitric oxide synthase aggresome formation is mediated by nitric oxide / T. Wang, Y. Xia // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012 Sep. – Vol. 426, N 3. – P. 386–389.

Поступила 04.03.2016 г.

Принята в печать 15.04.2016 г.

References

1. Wang X, Yin C, Xi L, Kukreja RC. Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Nov;287(5):H2070-7.
2. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. Physiology. 2006 Feb;21:69–78.
3. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. J Smooth Muscle Res. 2008 Apr;44(2):65–81.
4. Gollasch M, Tank J, Luft FC, Jordan J, Maass P, Krasko C, Sharma AM, Busjahn A, Bähring S. The BK channel beta1 subunit gene is associated with human baroreflex and blood pressure regulation. J Hypertens. 2002 May;20(5):927–33.
5. Troncoso Brindeiro CM, Fallet RW, Lane PH, Carmines PK. Potassium channel contributions to afferent arteriolar tone in normal and diabetic rat kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Jul;295(1):F171–8.
6. Clapp LH, Orie NN. Stoking up BKCa channels in hemorrhagic shock: which channel subunit is really fueling the fire? Circ Res. 2007 Aug;101(5):436–8.
7. Kyle BD, Braun AP. The regulation of BK channel activity by pre- and post-translational modifications. Front Physiol. 2014 Aug;5:316.
8. Gadek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Bugajski J. Chronic stress adaptiation of the nitric oxide synthases and IL-1 β levels in brain structures and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity induced by homotypic stress. J Physiol Pharmacol. 2015 Jun;66(3):427–40.
9. Malenjuk EB, Aymasheva NP, Manukhina EB, Mikoyan VD, Kubrina LN, Vanin AF, Larionov NP, Malyshev IYu. Vovlechen li oksid azota v adaptatsionnuiu zashchitu organov ot stressornykh povrezhdenii? [Whether nitrogen oxide is involved in adaptive protection of organs from the stressorish of damages?]. Biul. Ekspерим. Biologii i Meditsiny. 1998;126(9):274–7.
10. Veremey IS, Solodkov AP, Deyun GV, Golman VI. Vosstanovlenie NO²/NO³- tsinkovoi pyl'iu v

prisutstvii ammiachnogo kompleksa sul'fata medi [Restoration of NO²/NO³-zinc dust in the presence of an ammoniacal complex of copper sulfate]. V: 40 let farmatsevticheskому fakul'tetu: sb nauch tr. Vitebsk, RB; 1999. P. 274-6.

11. Abu-Saleh N, Ovcharenko E, Awad H, Goltsman I, Khamaisi M, Hoffman A, Heyman SN, Winaver J, Abassi Z. Involvement of the endothelin and nitric oxide systems in the pathogenesis of renal ischemic damage in an experimental diabetic model. *Life Sci.* 2012 Oct;91(13-14):669-75.
12. Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Mar;302(5):E481-95.
13. Manukhina EB, Belkina LM, Terekhina OL, Abramochkin DV, Smirnova EA, Budanova OP, Mallet RT, Downey HF. Normobaric, intermittent hypoxia conditioning is cardio- and vasoprotective in rats. *Exp Biol Med.* 2013 Dec;238(12):1413-20.
14. Meerson FZ, Pavlova VI, Sukhikh GT. Poststressornaia aktivatsiia sinteza nukleinovykh kislot i belkov i ee rol' v adaptatsionnykh reaktsiakh organizma [Poststress activation of synthesis of nucleic acids and proteins and its role in adaptive reactions of an organism]. *Patol Fiziol i Eksperim Terapiia.* 1982;(5):3-17.
15. Manukhina EB, Smirin BV, Malyshev IYu, Stoclet J-C, Muller B, Solodkov AP, Shebeko VI, Vanin AF. Deponirovanie oksida azota v serdechno-sosudistoi sisteme [Deposition of nitrogen oxide in cardiovascular system]. *Izv RAN Ser Biol.* 2002;(5):585-96.
16. Malyshev IYu, Malugin AV, Golubeva LYu, Zenina TA, Manukhina EB, Mikoyan VD, Vanin AF. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett.* 1996 Aug;391(1-2):21-3.
17. Pandit L, Kolodziejska KE, Zeng S, Eissa NT. The physiologic aggresome mediates cellular inactivation of iNOS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jan;106(4):1211-5.
18. Wang T, Xia Y. Inducible nitric oxide synthase aggresome formation is mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Sep;426(3):386-9.

Received 04.03.2016

Accept 15.04.2016

Сведения об авторах:

Лазуко С.С. – к.б.н., доцент, заведующая кафедрой нормальной физиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра нормальной физиологии. E-mail: lazuko71@mail.ru – Лазуко Светлана Степановна.