

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ NO В ЭФФЕКТАХ АГОНИСТОВ РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПОВ АДРЕНореЦЕПТОРОВ В КОРОНАРНЫХ СОСУДАХ

В. И. Козловский¹, В. В. Зинчук¹, С. Хлопицкий²

Исследована роль NO в эффектах агонистов α_2 , β_1 , β_2 и β_3 адренорецепторов в коронарном русле изолированного сердца мыши, перфузируемого по методу Лангендорфа. Селективный агонист α_2 -адренорецепторов клонидин (10^{-8} – 10^{-6} М) вызывал дозозависимое снижение коронарного потока, что свидетельствует о коронаросуживающих свойствах. Неселективный агонист β_1 -, β_2 -, β_3 -адренорецепторов изопреналин (10^{-8} – 10^{-7} М), напротив, вызвал дозозависимый прирост коронарного потока (коронарорасширяющее действие). Эффекты клонидина и изопреналина не изменялись в присутствии ингибитора NO-синтазы метилового эфира L-N^G-нитроаргинина (L-NAME, $5 \cdot 10^{-4}$ М). Селективный агонист β_3 -адренорецепторов BRL 37344 в высоких концентрациях (10^{-6} – 10^{-5} М) вызывал коронарорасширяющий эффект, который полностью блокировался антагонистом β_1 -, β_2 -адренорецепторов надололом (10^{-5} М). Таким образом, NO не имеет существенного значения в механизмах развития эффектов, опосредованных α_2 -, β_1 и β_2 -адренорецепторами в коронарном русле изолированного сердца мыши. В то же время функциональная активность β_3 -адренорецепторов в данной модели отсутствует.

Ключевые слова: адренорецепторы, окись азота, коронарные сосуды, изолированное сердце

ВВЕДЕНИЕ

Симпато-адреналовая система оказывает сложное влияние на сосуды, которое может проявляться как сужением (через α -адренорецепторы), так и расширением (преимущественно через β -адренорецепторы). В коронарных сосудах влияние симпато-адреналовой системы, как правило, проявляется вазодилатацией, которая способствует увеличению доставки кислорода. Данный эффект является механизмом компенсации повышенной нагрузки на сердце, развивающейся в результате положительного инотропного влияния симпато-адреналовой системы.

Имеется ряд данных о том, что вазодилатация, реализуемая через некоторые подтипы адренорецепторов, может быть опосредована эндотелиальной окисью азота (NO) [1, 4, 5, 13, 14]. Среди этих подтипов следует отметить, прежде всего, α_2 - и β_3 -адренорецепторы.

В 1983 г. Т. М. Cocks и J. A. Angus показали, что сосудосуживающее действие норэпинефрина на изолированных коронарных артериях свиньи и собаки значительно усиливается после удаления сосудистого эндотелия [3], что позволило предположить наличие в

сосудистом эндотелии адренорецепторов (предположительно, один из подтипов α -адренорецепторов), опосредующих сосудорасширяющий эффект. Впоследствии рядом авторов показано, что селективный агонист α_2 -адренорецепторов клонидин вызывает эндотелий-зависимую вазодилатацию [4, 5, 14]. С другой стороны, на некоторых моделях клонидин вызывал сосудосуживающий эффект [9, 10]. Указанные противоречия объясняются наличием двух подтипов α_2 -адренорецепторов: эндотелиальных, опосредующих NO-зависимую вазодилатацию, и гладкомышечных, активация которых ведет к вазоконстрикции.

Известно, что в гладкой мускулатуре сосудов имеются β_2 - и (в меньшей степени) β_1 -адренорецепторы, активация которых ведет к цАМФ-зависимой вазодилатации [8]. Однако отдельные данные свидетельствуют о том, что вазодилатация, вызванная агонистами β_2 -адренорецепторов, может быть частично опосредована активацией эндотелиальной системы L-аргинин — NO [1].

Относительно недавно обнаружено, что в сосудах содержатся также β_3 -адренорецепторы. Показано, что активация данных рецепторов также способствует NO-зависимой вазодилатации [13].

Цель настоящего исследования — изучить роль NO в механизмах развития эффектов, опосредованных α_2 -адренорецепторами, а также основными подтипами β -адренорецепторов в коронарном русле изолирован-

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. М. И. Бушма) Гродненского государственного медицинского университета, Беларусь, 230015, Гродно, ул. Горького, 80. E-mail: ykz45@rambler.ru

² Ягеллонский университет г. Кракова, Poland, 31531, Krakow, Grzegorzka, 16.

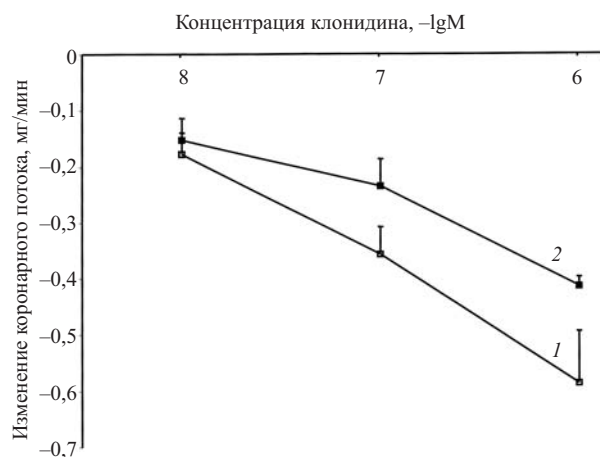


Рис. 1. Влияние L-NAME ($5 \cdot 10^{-4}$ М) на снижение коронарного потока, вызванное клонидином, в изолированном сердце мыши.

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Здесь и на рис. 2: 1 — без L-NAME ($n = 4$), 2 — в присутствии L-NAME ($n = 4$).

ного сердца мыши. В связи с этим мы оценили влияние селективного агониста α_2 -адренорецепторов клонидина, неселективного агониста β -адренорецепторов изопреналина и селективного агониста β_3 -адренорецепторов BRL 37344 на коронарный поток изолированного сердца мыши.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на изолированных сердцах мышей, которые перфузировались под постоянным давлением по методу Лангендорфа. В экспериментах использовали мышей линии C57BL/6 обоих полов массой 20–25 г. Животных наркотизировали тиопентал-натрием (100–120 мг/кг массы тела). После вскрытия грудной клетки сердца изолировали, промывали в холодном физиологическом растворе. Затем коронарное русло изолированного сердца перфузировали ретроградно через аорту под постоянным перфузионным давлением 100 мм. рт. ст. с использованием аппарата Лангендорфа (Hugo Sachs Electronics) раствором Кребса — Ханзелайта следующего состава (mM): NaCl 118; CaCl₂ 2,52; MgSO₄ 1,64; NaHCO₃ 24,88; K₂HPO₄ 1,18; глюкоза 5,55; натрия пируват 2,0. Перфузионный раствор оксигенировали смесью 95 % O₂ + 5 % CO₂ при 37 °С. Сердца стимулировали через два платиновых электрода, введенных в правое предсердие (частота составляла 400 импульсов в минуту). Объем жидкости, протекавший в единицу времени, соответствовал величине коронарного потока. Коронарный поток измеряли с помощью ультразвукового датчика (Hugo Sachs Electronics). Величину коронарного потока записывали в течение всего эксперимента, а затем анализировали с помощью специальной программы (PSCF — IGEL, Польша).

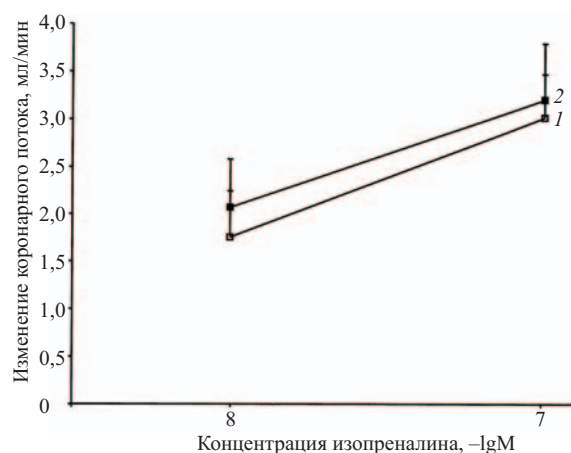


Рис. 2. Влияние L-NAME ($5 \cdot 10^{-4}$ М) на прирост коронарного потока, вызванный изопреналином, в изолированном сердце мыши.

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Обозначения те же, что на рис. 1.

Для оценки роли различных подтипов адренорецепторов в коронарном русле использовали селективный агонист α_2 -адренорецепторов клонидин, неселективный агонист β -адренорецепторов изопреналин и селективный агонист β_3 -адренорецепторов BRL 37344, которые добавляли в перфузионный раствор. Для оценки роли NO в сосудистых реакциях на данные соединения оценивали их эффекты в присутствии ингибитора NO-синтазы метилового эфира L-N^G-нитроаргина (L-NAME, $5 \cdot 10^{-4}$ М). Поскольку имеются данные о том, что BRL 37344 может также вызывать эффекты, опосредованные β_1/β_2 -адренорецепторами [7], мы оценили эффект данного соединения в присутствии антагониста β_1/β_2 -адренорецепторов надолола (10^{-5} М).

Полученные данные статистически обрабатывали методом непараметрической статистики с использованием критерия Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Базальный коронарный поток в экспериментах на изолированном сердце мыши составлял $2,01 \pm 0,22$ ($n = 10$), в присутствии L-NAME коронарный поток составлял $1,82 \pm 0,3$ ($n = 7$, $p > 0,05$).

Клонидин в концентрациях 10^{-8} – 10^{-6} М вызывал дозозависимое снижение коронарного потока в изолированном сердце мыши (рис. 1). Добавление ингибитора NO-синтазы L-NAME ($5 \cdot 10^{-4}$ М) не оказывало существенного влияния на эффект клонидина.

Неселективный агонист $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ -адренорецепторов изопреналин в концентрациях 10^{-8} – 10^{-7} М вызывал дозозависимый прирост коронарного потока (рис. 2). Коронарная вазодилатация, вызванная изопреналином, не изменялась в присутствии L-NAME ($5 \cdot 10^{-4}$ М). В то же время L-NAME в данной концентрации стати-

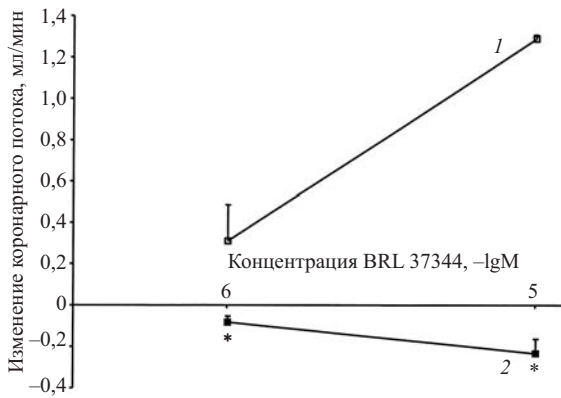


Рис. 3. Влияние надолола (10^{-5} М) на прирост коронарного потока, вызванный BRL 37344, в изолированном сердце мыши.

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. * — статистически достоверное отличие по сравнению с данными без надолола, $p < 0,05$. 1 — без надолола ($n = 3$), 2 — в присутствии надолола ($n = 3$).

стически значимо уменьшал прирост коронарного потока, вызванный брадикинином (10^{-9} М): $2,29 \pm 0,41$ мл/мин без L-NAME и $1,1 \pm 0,39$ мл/мин в присутствии L-NAME ($n = 9$, $p < 0,05$).

Селективный агонист β_3 -рецепторов BRL 37344 в относительно высоких концентрациях (10^{-6} – 10^{-5} М) увеличивал коронарный поток в изолированном сердце мыши (рис. 3). Однако коронарорасширяющий эффект BRL 37344 полностью блокировался антагонистом β_1/β_2 -адренорецепторов надололом, т.е. не был опосредован β_3 -адренорецепторами.

В наших исследованиях показано, что селективный агонист α_2 -адренорецепторов клонидин вызывал в изолированном сердце мыши коронарную вазоконстрикцию, обусловленную, скорее всего, активацией α_2 -адренорецепторов в гладкой мускулатуре коронарных сосудов. Сосудосуживающий эффект клонидина был обнаружен нами ранее также на изолированном сердце морской свинки [2]. В этом же исследовании было показано, что клонидин в высоких концентрациях (10^{-5} М и выше) обладает коронарорасширяющим действием, которое не связано с активацией какого-либо из подтипов адренорецепторов и опосредовано гистаминовыми H_2 -рецепторами. Близкие результаты были получены на коронарных артериях собаки *in vivo* [12]. Известно, что вазодилатация, обусловленная стимуляцией гистаминовых H_2 -рецепторов, не связана с активацией продукции эндотелиального NO [6]. В то же время на изолированных коронарных сосудах свиньи обнаружен NO-зависимый сосудорасширяющий эффект клонидина [14]. Различие с нашими данными может объясняться не только видовыми особенностями, но и особенностями экспериментальных моделей. В исследовании на изолированных сосудах оценивались артерии крупного калибра, в то время как в изолированном сердце, как и *in vivo*, коронарный кровоток определяется преимущественно мелкими сосудами.

На наш взгляд, вазодилатация, вызванная активацией α_2 -адренорецепторов эндотелия, может маскироваться вазоконстрикцией, опосредованной гладкомышечными α_2 -адренорецепторами. В этом случае можно было бы ожидать усиление сосудосуживающей реакции на клонидин при ингибировании NO-синтазы. Однако данный эффект клонидина в изолированном сердце мыши не усиливался на фоне ингибирования NO-синтазы L-NAME, что не подтверждает участие эндотелиального NO в механизме действия клонидина на коронарные сосуды. В связи с этим наличие эндотелиальных α_2 -адренорецепторов в коронарных сосудах сердца мыши представляется сомнительным.

Установлено также, что селективный агонист β_3 -адренорецепторов BRL 37344 вызывал коронарную вазодилатацию в изолированном сердце мыши. Поскольку данное соединение в высоких концентрациях может активировать другие подтипы β -адренорецепторов [7, 11], мы оценили эффект BRL 37344 в условиях блокады β_1/β_2 -адренорецепторов антагонистом данных рецепторов надололом. Отсутствие вазодилатации под действием BRL 37344 в данных условиях позволяет исключить роль β_3 -адренорецепторов в коронарном русле сердца мыши.

Вазодилатация, вызванная неселективным агонистом β -адренорецепторов изопrenalином, не изменялась в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME, что не подтверждает роль других подтипов β -адренорецепторов в активации эндотелиальной системы L-аргинин — NO в коронарных сосудах сердца мыши. Однако не исключено, что в отдельных частях сосудистого русла β_2 -адренорецепторы могут находиться в сосудистом эндотелии, принимая участие в NO-зависимой регуляции сосудистого гомеостаза. В одной из работ на изолированных артериях свиньи показано, что сосудорасширяющий эффект изопrenalина опосредован NO на изолированных феморальных артериях, в то же время на изолированных коронарных артериях он не зависел от NO [15]. Интересно отметить, что вазодилатация, вызванная изопrenalином в данном исследовании, была опосредована разными подтипами адренорецепторов: β_2 -адренорецепторами в феморальных артериях и β_1 -адренорецепторами в коронарных артериях.

Таким образом, наши исследования не подтвердили существенной роли NO в механизме эффектов, опосредованных различными подтипами адренорецепторов в коронарном русле изолированного сердца мыши. Это согласуется с полученными нами ранее данными об отсутствии вклада NO в эффекты агонистов β_2 - и β_3 -адренорецепторов в коронарных сосудах изолированного сердца морской свинки [2, 7]. В то же время наши данные не исключают возможной роли NO в эф-

фектах, опосредованных адренорецепторами в других областях сосудистого русла.

ВЫВОДЫ

1. Активация α_2 -адренорецепторов способствует развитию NO-независимой коронарной вазоконстрикции в изолированном сердце мыши.

2. β_3 -Адренорецепторы не играют существенной роли в регуляции тонуса коронарных сосудов изолированного сердца мыши.

3. Активация β_1/β_2 -адренорецепторов ведет к развитию NO-независимой коронарной вазодилатации в изолированном сердце мыши.

4. NO не имеет существенного значения в механизмах действия агонистов α_2 , β_1 , β_2 и β_3 -адренорецепторов в коронарном русле изолированного сердца мыши.

Настоящая работа выполнена частично благодаря поддержке совместного гранта НАТО с Ягеллонским университетом г. Кракова, Польша (CLG 982766). Авторы выражают глубокую признательность профессору Р. Григлевскому (Краков, Польша) за консультативную помощь в проведении исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Y. Chang, *Am. J. Physiol.*, **272**, 2173 – 2179 (1997).

2. S. Chlopicki, V. I. Kozlovski, and R. J. Gryglewski, *J. Physiol. Pharmacol.*, **54**(4), 511 – 521 (2003).
3. T. M. Cocks and J. A. Angus, *Nature*, **305** (5935), 627 – 630 (1983).
4. X. F. Figueroa, M. I. Poblete, M. P. Boric, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **134**(5), 957 – 968 (2001).
5. D. Hermann, T. Schlereth, T. Vogt, and F. Birklein, *J. Appl. Physiol.*, **99**(6), 2266 – 2270 (2005).
6. M. Kelm, M. Feelisch, T. Krebber, et al., *J. Vasc. Res.*, **30**, 123 – 128 (1998).
7. V. I. Kozlovski, S. Chlopicki, and R. J. Gryglewski, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **41**(5), 706 – 713 (2003).
8. A. Monopoli, A. Conti, A. Forlani, et al., *Pharmacol. Res.*, **27**, 273 – 297 (1993).
9. M. Muszkat, G. G. Sofowora, A. J. Wood, and C. M. Stein, *Hypertension*, **43**(1), 31 – 35 (2004).
10. T. Nakane and S. Chiba, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **10**(6), 651 – 657 (1987).
11. Y. T. Shen, P. Cervoni, T. Claus, and S. F. Vatner, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**(3), 1435 – 1443 (1996).
12. W. Söhngen, M. M. Winbury, and J. M. Kitzen, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12**(6), 689 – 700 (1988).
13. J. N. Trochu, V. Leblais, Y. Rautureau, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 69 – 76 (1999).
14. M. Tschudi, V. Richard, F. R. Bühler, and T. F. Lüscher, *Am. J. Physiol.*, **260**, 13 – 20 (1991).
15. B. Xu and Y. Huang, *Acta Pharmacol. Sin.*, **21**(4), 309 – 312 (2000).

Поступила 14.01.09

STUDYING THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE CORONARY FLOW RESPONSE TO VARIOUS ADRENOCEPTOR AGONISTS

V. I. Kozlovskii¹, V. V. Zinchuk¹, and S. Chlopicki²

¹ Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, Grodno, 230015, Belarus;

² Jagellon University of Cracow, ul. Grzegorzeczka 16, 31531, Krakow, Poland

We have studied the role of NO in coronary flow responses to agonists of alfa-2, beta-1, beta-2 and beta-3 adrenoceptors in the isolated mouse heart perfused according to the Langendorff method. The selective alfa-2 adrenoceptor agonist clonidine (10^{-8} – 10^{-6} M) displayed coronary vasoconstrictor properties as it induced dose-dependent decrease in the coronary flow. On the contrary, the nonselective beta-1/beta2/beta-3 adrenoceptor agonist isoprenaline (10^{-8} – 10^{-7} M) was a coronary vasodilator and caused dose-dependent increase in the coronary flow. The response to clonidine or isoprenaline was not changed by the presence of the NO-synthase inhibitor L-NO-nitroarginine methyl ester (L-NAME, 5×10^{-4} M). The selective beta-3 adrenoceptor agonist BRL 37344 at high concentrations (10^{-6} – 10^{-5} M) produced a coronary vasodilator effect, but this effect was completely blocked by the beta-1/beta-2 adrenoceptor antagonist nadolol (10^{-5} M). It is concluded that NO does not play any significant role in the coronary vascular responses mediated by alfa-2, beta-1, and beta-2 adrenoceptors in the isolated mouse heart. The functionally active beta-3 adrenoceptors seem to be not active in the coronary circulation in the isolated mouse heart.

Key words: Adrenoceptors, nitric oxide, coronary vessels, isolated heart