

УДК 612.133+612.172.1):615.217.22]:616-092.9

## ЭФФЕКТЫ, СВЯЗАННЫЕ С ВОЗБУЖДЕНИЕМ $\alpha_2$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В КОРОНАРНОМ КРОВООБРАЩЕНИИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА МОРСКОЙ СВИНКИ

В.И. КОЗЛОВСКИЙ<sup>1</sup> (к. м. н.), С. ХЛОПИЦКИ<sup>2</sup> (проф., д. м. н.),  
Р.Е. ГРЫГЛЕВСКИ<sup>2</sup> (проф., д. м. н.)

<sup>1</sup> Гродненский государственный медицинский университет;

<sup>2</sup> Ягеллонский университет (г. Краков, Польша).



**Козловский Валерий Иванович - преподаватель кафедры фармакологии (выступление на симпозиуме «Endothelial dysfunction» в Кракове). Область научных интересов: эндотелиальные NO-зависимые эффекты в коронарном кровообращении.**

*Литературные данные о роли  $\alpha_2$ -адренорецепторов в коронарном кровообращении противоречивы. Целью настоящего исследования было изучение влияния  $\alpha_2$ -адренергического агониста клонидина на тонус коронарных сосудов изолированного сердца морской свинки и оценка роли  $\alpha_2$ -адренорецепторов и эндотелиального оксида азота в эффекте клонидина. Как показали результаты, клонидин в концентрациях  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  М вызывает дозозависимое снижение величины коронарного потока изолированного сердца морской свинки, связанное с возбуждением  $\alpha_2$ -адренорецепторов. В присутствии ингибитора синтазы оксида азота L-NAME ( $10^{-4}$  М) было отмечено усиление сосудосуживающего эффекта клонидина. Исходя из полученных результатов, мы сделали вывод, что преобладающим эффектом возбуждения  $\alpha_2$ -адренорецепторов в коронарных сосудах является сужение сосудов, однако, вероятно, в коронарных сосудах присутствуют два типа  $\alpha_2$ -адренорецепторов: гладкомышечные  $\alpha_2$ -адренорецепторы отвечают за вазоконстрикцию, в то же время эндотелиальные  $\alpha_2$ -адренорецепторы опосредуют вазодилатацию, зависимую от эндотелиального оксида азота.*

**Ключевые слова:** клонидин,  $\alpha_2$ -адренорецепторы, коронарное кровообращение, вазоконстрикция, вазодилатация, эндотелий, оксид азота.

*The data about the effects of clonidine in coronary circulation are conflicting. The aim of our study was to study the influence of  $\alpha_2$ -adrenergic agonist clonidine in the coronary circulation of the isolated guinea pig heart. We have found that clonidine at the concentrations of  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M induced dose-dependent coronary vasoconstrictor effect, which was mediated via  $\alpha_2$ -adrenoceptors. The inhibitor of nitric oxide synthase L-NAME ( $10^{-4}$  M) increased coronary vasoconstrictor effect of clonidine. We have come to the conclusion that vasoconstriction is the predominant effect of  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists in coronary circulation, but two types of  $\alpha_2$ -adrenoceptors seem to exist in coronary arteries: smooth muscle  $\alpha_2$ -adrenoceptors are responsible for the vasoconstrictor effect whereas endothelial  $\alpha_2$ -adrenoceptors mediate endothelial NO-dependent vasodilator effect.*

**Keywords:** clonidine,  $\alpha_2$ -adrenoceptors, coronary circulation, vasoconstriction, vasodilation, endothelium, nitric oxide.

### Введение

Литературные данные о роли  $\alpha_2$ -адренергических рецепторов в регуляции коронарного кровообращения весьма противоречивы. С одной стороны, обнаружено коронарорасширяющее действие  $\alpha_2$ -адренергического агониста клонидина в изолированных коронарных сосудах свиньи, связанное с влиянием на эндотелиальные  $\alpha_2$ -адренорецепторы,

и опосредованное оксидом азота эндотелиально-го происхождения [1, 3, 14, 18]. Подобные результаты отмечены также в ряде других сосудов: мезентериальных, почечных, сонных, бедренных артериях [2, 7].

С другой стороны, в ряде работ клонидин и другие агонисты  $\alpha_2$ -адренорецепторов оказывали сосудосуживающий эффект, связанный с возбужде-

нием  $\alpha_2$ -адренорецепторов гладких мышц сосудов, в коронарных сосудах обезьяны, собаки [9, 16, 17].

Причина указанных противоречий, как мы предполагаем, состоит в том, что, вероятно, в коронарных сосудах имеются два типа  $\alpha_2$ -адренорецепторов – эндотелиальные и гладкомышечные [8]. Возбуждение эндотелиальных  $\alpha_2$ -адренорецепторов приводит к высвобождению оксида азота и вазодилатации, в то же время возбуждение  $\alpha_2$ -адренорецепторов гладкомышечных клеток сосудов вызывает вазоконстрикцию.

Основные работы, характеризующие роль  $\alpha_2$ -адренорецепторов в коронарном кровообращении, были выполнены на моделях изолированных сосудов. В настоящей работе мы изучили эффекты клонидина с использованием методики, более приближенной к реальным условиям – изолированно сердца морской свинки. Ранее было показано, что в коронарных артериях морской свинки присутствуют оба подтипа  $\alpha$ -адренорецепторов –  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -рецепторы [5]. Целью настоящего исследования было изучить влияние различных концентраций клонидина на коронарный кровоток в изолированном сердце морской свинки, оценить роль  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -адренорецепторов и эндотелиального оксида азота в сосудистых эффектах клонидина.

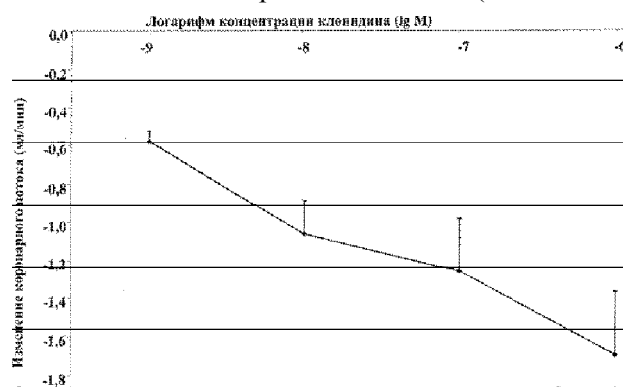
### Материалы и методы

Эксперименты проводились на базе кафедры фармакологии Ягеллонского университета г. Кракова (Польша). Получено разрешение комиссии по этике Ягеллонского университета на проведение экспериментов на животных.

**Модель изолированного сердца морской свинки (метод Лангендорфа).** Детали метода описаны ранее [11]. Морские свинки обоих полов, массой тела 300 – 400 г, наркотизировались пентобарбиталом (30 – 40 мг  $\text{кг}^{-1}$  массы тела). После вскрытия грудной клетки сердца изолировались, промывались в холодном физиологическом растворе, затем коронарное русло изолированного сердца перфузировалось ретроградно через аорту под постоянным перфузионным давлением 60 мм рт.ст. с использованием аппарата Лангендорфа (Hugo Sachs Electronics) раствором следующего состава (mM): NaCl 118,  $\text{CaCl}_2$  2,52,  $\text{MgSO}_4$  1,64,  $\text{NaHCO}_3$  24,88,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,18, глюкоза 5,55, натрия пируват 2,0. Перфузионный раствор оксигенировался смесью 95 %  $\text{O}_2$  + 5 %  $\text{CO}_2$  при 37°C. Сердца стимулировались с частотой 273 импульса в минуту двумя

платиновыми электродами, введенными в правое предсердие. Объем жидкости, протекавший в единицу времени, соответствовал величине коронарного потока. Коронарный поток измерялся с помощью ультразвукового датчика (Hugo Sachs Electronics). Величина коронарного потока записывалась в течение всего эксперимента, а затем анализировалась с помощью специальной программы (PSCF – IGEL, Польша).

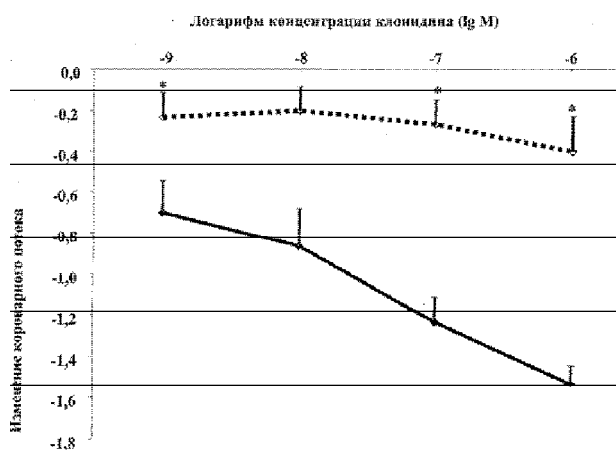
**Протокол экспериментов.** Для изучения влияния клонидина на коронарный поток препарат вводился путём внутрикоронарной инфузии до получения концентраций в диапазоне  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  М. В течение одного эксперимента клонидин вводился дважды: в отсутствие (контрольный ответ) и в присутствии соответствующего фармакологического антагониста. В контрольных опытах (без исполь-



**Рис. 1.** Изменение коронарного потока под действием клонидина в изолированном сердце морской свинки. Представлены контрольные ответы на клонидин ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  М) во всех экспериментах. Результаты представлены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка (для  $n = 12$ ).

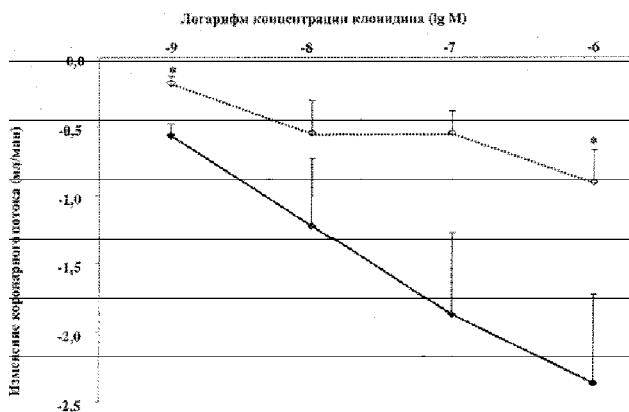
зования фармакологических антагонистов) эффекты клонидина были повторяемы и не изменялись существенно в течение эксперимента. Для оценки роли  $\alpha$ -адренорецепторов и эндотелиального оксида азота использовались следующие фармакологические ингибиторы: неселективный  $\alpha_1/\alpha_2$  адренергический антагонист фентоламин ( $10^{-5}$  М), селективный  $\beta_1$  адренергический антагонист празозин ( $10^{-6}$  М), селективный  $\alpha_2$  адренергический антагонист йохимбин ( $10^{-6}$  М), неселективный ингибитор синтазы оксида азота метиловый эфир L-NG-нитроаргинина (L-NAME,  $10^{-4}$  М). Концентрации использовавшихся ингибиторов, согласно литературным данным, соответствовали общепринятым.

Все использовавшиеся соединения, за исключением празозина, растворялись в дистиллированной воде. Празозин растворялся в смеси диметилсульфоксида (DMSO) и воды (1 : 1).



**Рис. 2.** Влияние фентоламина на коронаросуживающий эффект клонидина.

Представлены ответы на клонидин ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  М) в экспериментах с фентоламином ( $10^{-5}$  М);  
 — ответ без фентоламина; ..... - ответ в присутствии фентоламина. Результаты представлены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка (для  $n = 3$ ).  
 \* - статистически достоверное различие в сравнении с контрольным ответом ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.** Влияние йохимбина на коронаросуживающий эффект клонидина.

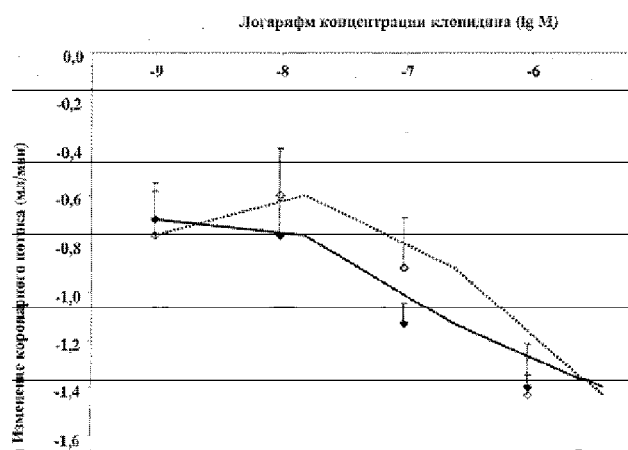
Представлены ответы на клонидин ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  М) в экспериментах с йохимбином ( $10^{-6}$  М);  
 — ответ без йохимбина; ..... - ответ в присутствии йохимбина. Результаты представлены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка (для  $n = 3-4$ );  
 \* - статистически достоверное различие в сравнении с контрольным ответом ( $p < 0,05$ ).

**Статистические методы.** Все показатели были выражены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка. Статистическая значимость оценивалась с помощью спаренного Т-теста. Величина Р меньше 0,05 считалась статистически значимой.

### Результаты и обсуждение

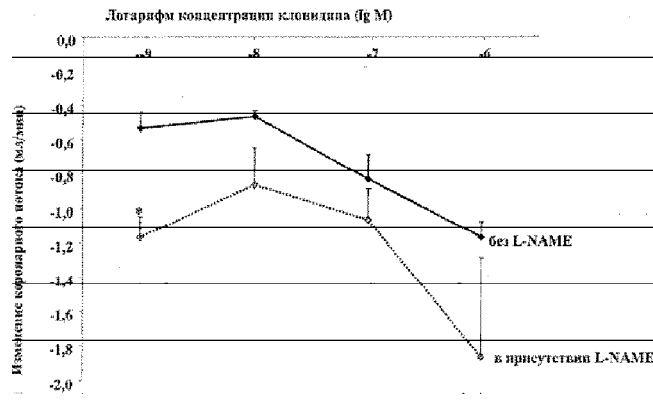
Средний базальный коронарный поток в изолированном сердце морской свинки составлял  $13,51 \pm 0,72$  мл/мин.

Как видно из рис. 1, клонидин в концентрациях  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  М вызывал дозозависимое снижение коронарного потока (величина этого эффекта варьи-



**Рис. 4.** Влияние празозина ( $10^{-6}$  М) на коронаросуживающий эффект клонидина.

Представлены ответы на клонидин ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  М) в экспериментах с празозином;  
 — ответ без празозина; ..... - ответ в присутствии празозина. Результаты представлены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка (для  $n = 3$ ).



**Рис. 5.** Влияние L-NAME ( $10^{-4}$  М) на коронаросуживающий эффект клонидина.

Представлены ответы на клонидин ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  М) в экспериментах с L-NAME;  
 — ответ без L-NAME; ..... - ответ в присутствии L-NAME. Результаты представлены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка (для  $n = 3$ );  
 \* - статистически достоверное различие в сравнении с контрольным ответом ( $p < 0,05$ ).

ровала от  $0,58 \pm 0,06$  мл/мин в концентрации  $10^{-9}$  М до  $1,70 \pm 0,33$  мл/мин в концентрации  $10^{-6}$  М). Коронаросуживающий эффект значительно уменьшался в присутствии неселективного  $\alpha_1/\alpha_2$  адренергического антагониста фентоламина ( $10^{-5}$  М, рис. 2А) и селективного  $\alpha_2$  адренергического антагониста йохимбина ( $10^{-6}$  М, рис. 2Б). В то же время селективный  $\alpha_1$  адренергический антагонист празозин ( $10^{-6}$  М) не оказывал существенного влияния на снижение коронарного кровотока, вызванное клонидином в изолированном сердце морской свинки (рис. 2В).

В присутствии ингибитора синтазы оксида азота L-NAME ( $10^{-4}$  M) наблюдалось некоторое усиление коронаросуживающего действия клонидина в изолированном сердце морской свинки, прежде всего при малых концентрациях клонидина (снижение коронарного кровотока под действием клонидина в концентрации  $10^{-9}$  M составляло  $0,53 \pm 0,09$  мл/мин без L-NAME и  $1,17 \pm 0,12$  мл/мин в присутствии L-NAME, рис. 3).

Как показали результаты экспериментов, клонидин в концентрациях  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M, примерно соответствующих терапевтическим концентрациям клонидина [10], вызывал умеренное снижение коронарного потока в изолированном сердце морской свинки. Коронаросуживающий эффект клонидина, как доказано нами, связан с влиянием на сосудистые  $\alpha_2$ -адренорецепторы. Наши данные соответствуют некоторым экспериментальным данным, полученным на других моделях: коронарных артериях сердечно-лёгочного препарата собаки [9], изолированных коронарных артериях обезьяны [16, 17]. В то же время на изолированных коронарных сосудах человека коронаросуживающий эффект клонидина наблюдать не удалось [16]. Предполагается, что  $\alpha_2$ -адренорецепторы, через которые реализуется вазоконстрикция, находятся на гладкомышечных клетках сосудов [8].

С другой стороны, предполагается, что в коронарных сосудах могут присутствовать эндотелиальные  $\alpha_2$ -адренорецепторы, опосредующие вазодилатацию, механизм которой связан с высвобождением эндотелиального оксида азота. Впервые предположение о существовании эндотелиальных  $\alpha_2$ -адренорецепторов было выдвинуто в 1983 году в работе *Cocks et Angus* [4], которые показали, что в изолированных коронарных артериях свиньи и собаки удаление эндотелия потенцирует вазоконстрикторный эффект норэпинефрина. Позднее на модели изолированных коронарных сосудов свиньи была показана способность клонидина индуцировать вазодилатацию, опосредованную возбуждением  $\alpha_2$ -адренорецепторов и связанную с высвобождением оксида азота [1, 3, 14, 18]. Сосудорасширяющие эффекты, связанные с влиянием на эндотелиальные  $\alpha_2$ -адренорецепторы, обнаружены в некоторых других сосудах: мезентериальных артериях крысы [7], сонных, почечных, бедренных и мезентериальных артериях собаки [2]. Показано, что высвобождение эндотелиального оксида азо-

та, связанное со стимуляцией  $\alpha_2$ -адренорецепторов, способствует антигипертензивному эффекту  $\alpha_2$ -адренергических агонистов клонидина и рилменидина [15]. Сообщается также, что возбуждение центральных  $\alpha_2$ -адренорецепторов приводит к высвобождению оксида азота [6]. Таким образом, есть свидетельства того, что оксид азота имеет определённое значение в механизме развития эффектов  $\alpha_2$ -адренергических агонистов.

Потенцирование сосудосуживающего действия клонидина, наблюдавшееся нами в изолированном сердце морской свинки, позволяет предположить, что эндотелиальные  $\alpha_2$ -адренорецепторы присутствуют в коронарных сосудах. NO-зависимый сосудорасширяющий эффект, связанный с возбуждением эндотелиальных  $\alpha_2$ -адренорецепторов, маскируется вазоконстрикцией, реализуемой через  $\alpha_2$ -адренорецепторы гладких мышц сосудов. На наш взгляд, противоречивые сведения о влиянии  $\alpha_2$ -адренергических агонистов на коронарные сосуды объясняются наличием двух противоположных эффектов, опосредованных эндотелиальными и гладкомышечными  $\alpha_2$ -адренорецепторами. Соотношение между этими рецепторами, вероятно, может различаться у разных видов животных. Усиление сосудосуживающего эффекта клонидина отмечается в основном при малых концентрациях; очевидно, при увеличении концентрации клонидина вазоконстрикция, связанная с гладкомышечными  $\alpha_2$ -адренорецепторами, становится более выраженной и сильнее маскирует сосудорасширяющее влияние. К сожалению, в настоящее время нет соответствующих фармакологических средств, позволяющих дифференцировать сосудистые эффекты, опосредованные эндотелиальными и гладкомышечными  $\alpha_2$ -адренорецепторами. Тем не менее, наличие в коронарных сосудах эндотелиальных  $\alpha_2$ -адренорецепторов, возбуждение которых приводит к генерации эндотелиального оксида азота, может иметь большое значение. Хотя вазодилатация маскируется вазоконстрикцией, реализуемой через гладкомышечные  $\alpha_2$ -адренорецепторы, но, как известно, биологические эффекты оксида азота не ограничиваются только расширением сосудов. Оксид азота также тормозит такие важные для развития сосудистых расстройств процессы, как агрегация тромбоцитов [13], адгезия нейтрофилов [12] и пролиферация гладкомышечных клеток сосудов [19]. В перспективе, возможно, удастся найти более се-

лективные агонисты  $\alpha_2$ -адренорецепторов, лишённые известных побочных эффектов клонидина, которые найдут своё место в лечении патологии коронарных сосудов.

### Выводы

1. Возбуждение  $\alpha_2$ -адренорецепторов в изолированном сердце морской свинки приводит к сужению коронарных сосудов.

2. В присутствии ингибитора синтазы оксида азота L-NAME отмечается потенцирование сосудосуживающего эффекта, связанного с возбуждением  $\alpha_2$ -адренорецепторов.

3. Предположительно, в коронарных сосудах содержатся два подтипа  $\alpha_2$ -адренорецепторов – гладкомышечные  $\alpha_2$ -адренорецепторы, взаимодействие с которыми приводит к сужению сосудов, и эндотелиальные  $\alpha_2$ -адренорецепторы, при возбуждении которых происходит высвобождение эндотелиального оксида азота и расширение сосудов.

### Литература

1. Angus J. A., Cocks T. M., Satoh K. The alpha-adrenoceptors on endothelial cells. // *Fed Proc.* – 1986. – Vol. 45. – P. 2355 – 2359.
2. Angus J. A., Cocks T. M., Satoh K. Alpha-2-adrenoceptors and endothelium-dependent relaxation in canine large arteries // *Br J Pharmacol.* – 1986. – Vol. 88. – P. 767 – 777.
3. Bockman C. S., Jeffries W. B., Abel P. W. Binding and functional characterization of alpha-2-adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1993. – Vol. 267. – P. 1126 – 1133.
4. Cocks T. M., Angus J. A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin // *Nature.* – 1983. – Vol. 30, № 5. – P. 627 – 630.
5. Decker N., Schwarz J. Postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the coronaries of the perfused guinea-pig heart // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1985. – Vol. 232. – P. 251 – 257.
6. Dobrucki L. W., Cabrera C. L., Bohr D. F., Malinski T. Central hypotensive action of clonidine requires nitric oxide // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104 – P. 1884 – 1886.
7. Figueroa X. F., Poblete M. I., Boric M. P., Mendizabal V. E., Adler-Graschinsky E., Huidobro-Toro J. P. // Clonidine-induced nitric oxide-dependent vasorelaxation mediated by endothelial alpha(2)-adrenoceptor activation // *Br J Pharmacol.* – 2001. – Vol. 134. – P. 957 – 968.
8. Gimaraes S., Moura D. Vascular adrenoceptors: an update // *Pharmacol Rev.* – 2001. – Vol. 53. – P. 319 – 356.
9. Katano Y, Nakagawa Y, Shimamoto N, Sakai K, Otorii T, Imai S [Using the isolated atrial preparation of the guinea-pig and the canine heart lung preparation (HLP) supported by a donor, the effects of guanfacine on the heart, coronary circulation and myocardial energy metabolism were studied and compared with those of clonidine (author's transl)] // *Nippon Yakurigaku Zasshi.* – 1980. – Vol. 76. – P. 281-292.
10. Katzung B. G. *Basic & Clinical Pharmacology.* Lange Medical Books/Mcgraw-Hill. – 2001. – P. 37.
11. Kozlovski V. I., Chlopicki S., Gryglewski R. J. Effects of two beta-3 agonists, CGP 12177A and BRL 37344, on coronary flow and contractility in isolated guinea pig heart // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2003. – Vol. 41. – P. 706 – 713.
12. Kubes P., Suzuki M., Granger D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leucocyte adhesion // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 4651 – 4655.
13. Radomski M. W., Palmer R. M. U., Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide, and prostacyclin in platelets // *Br J Pharmacol.* – 1987. – Vol. 92. – P. 181 – 187.
14. Richard V., Tanner F. C., Tschudi M., Lusher T. F. Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries // *Am J Physiol.* – 1990. – Vol. 259. – P. 1433 – 1439.
15. Soares de Moura R. S., Leao M. C., Castro Resende A. C., Moreira C. F., Sena K. M., Silveira S. S., Lima A. F., Nunes F. R., Mesquita Ferreira A. G. Actions of L-NAME and methylene blue on the hypotensive effects of clonidine and rilmenidine in the anesthetized rat // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2000. – Vol. 35. – P. 791 – 795.
16. Toda N. Responsiveness of isolated monkey coronary arteries contracted with alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor agonists to diltiazem // *Eur J Pharmacol.* – 1988. – Vol. 147. – P. 291 – 293.
17. Toda N. Alpha-adrenoceptor subtypes and diltiazem actions in isolated human coronary arteries. // *Am J Physiol.* – 1986. – Vol. 250. – P. 718 – 724.
18. Tschudi M., Richard V., Buhler F. R., Lusher T. F. Importance of endothelium-derived nitric oxide in porcine coronary resistance arteries // *Am J Physiol.* – 1991. – Vol. 260. – P. 13 – 20.
19. Ueno H, Kanellakis P, Agrotis A, Bobik A. Blood flow regulates the development of vascular hypertrophy, smooth muscle cell proliferation, and endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension // *Hypertension.* – 2000. – Vol. 36. – P. 89-96.

### Resume

#### THE EFFECTS OF $\alpha_2$ -ADRENOCEPTORS STIMULATION IN CORONARY CIRCULATION OF THE ISOLATED GUINEA PIG HEART

V. I. Kozlovski, S. Chlopicki, R.-J. Gryglewski.

Vasoconstriction is the predominant effect of  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists in coronary circulation but two types of  $\alpha_2$ -adrenoceptors exist in coronary arteries: smooth muscle  $\alpha_2$ -adrenoceptors are responsible for the vasoconstrictor effect whereas endothelial  $\alpha_2$ -adrenoceptors mediate endothelial NO-dependent vasodilator effect.