

УДК 615.225.2:577.175.8:611.018.74:616.132.2–092.9

СРАВНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ЭНДОТЕЛИЙ-ЗАВИСИМЫХ КОРОНАРОРАСШИРЯЮЩИХ ЭФФЕКТОВ АЦЕТИЛХОЛИНА И БРАДИКИНИНА В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ МЫШИ

В.И. Козловский, к.м.н.

Кафедра фармакологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В настоящей работе сравнены вклад NO и простациклина в механизм коронарорасширяющего действия ацетилхолина и брадикинина, а также влияние данных соединений на генерацию простациклина в изолированном сердце мыши. Установлено, что коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином, включает раннюю фазу, опосредованную NO, и позднюю простациклин-зависимую фазу. Коронарорасширяющий эффект брадикинина реализуется в основном через NO. Как ацетилхолин, так и брадикинин (в меньшей степени) стимулируют продукцию простациклина в изолированном сердце мыши.

Ключевые слова: коронарная вазодилатация, изолированное сердце, ацетилхолин, брадикинин, оксид азота, простациклин.

The contribution of NO and prostacyclin to the mechanism of the coronary vasodilator action of acetylcholine and bradykinin as well as the influence of these compounds on generation of prostacyclin in an isolated mouse heart were compared in the present work. It was found out that coronary vasodilatation induced by acetylcholine includes an early phase mediated by NO and a delayed prostacyclin-dependent phase. Coronary vasodilator effect of bradykinin is mediated mainly by NO. Both acetylcholine and bradykinin (to a lesser degree) stimulate production of prostacyclin in an isolated mouse heart.

Key words: coronary vasodilatation, isolated heart, acetylcholine, bradykinin, nitric oxide, prostacyclin.

Введение

Известно, что эндотелий играет важнейшую роль в регуляции сосудистого гомеостаза. Данная роль реализуется через эндотелиальные вазодилататоры. Среди них особое значение имеют оксид азота (NO) и простациклин.

Открытию роли NO как важнейшего сосудорасширяющего фактора эндотелиального происхождения предшествовало наблюдение Furchgott и Zawadzki (1980), которые показали, что ацетилхолин не вызывает вазодилатации на изолированных кольцах аорты кролика, лишённых эндотелия [5]. В последующем в ряде исследований было доказано, что фактором, ответственным за эндотелий-зависимую вазодилатацию под влиянием ацетилхолина, является NO [4, 12, 14, 21].

Ряд данных свидетельствуют о том, что эндогенный вазоактивный пептид брадикинин также может активировать эндотелиальную систему L-аргинин-NO. Сообщалось о роли NO как в сосудорасширяющем эффекте брадикинина [9, 11, 13, 15, 20], так и в некоторых других его эффектах: ингибировании агрегации тромбоцитов [18], стимуляции продукции тканевого активатора плазминогена [2], стимуляции инсулин-зависимого транспорта глюкозы [1].

Сообщается о том, что ацетилхолин и брадикинин могут стимулировать также продукцию эндотелиального простациклина. Так, в исследовании на изолированном сердце кролика было обнаружено, что как ацетилхолин, так и брадикинин увеличивают выброс метаболита простациклина 6-кето-простагландин F_{1α} [13]. Ингибирование циклооксигеназы, ответственной за синтез простациклина, уменьшало вазодилататорный эффект ацетилхолина на изолированных кольцах аорты крысы [24], в почечных артериях собаки [16], в сосудах предплечья человека [10]. Сосудорасширяющая реакция на брадикинин также снижалась в ряде исследований, в частности, в афферентных артериолах почки кролика [25], глазных артериях [7] и мозговых артериолах новорождённых поросят [22], цилиарных артериях свиньи [17], изолированной аорте морской свинки [9], сосудах предплечья человека [23].

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что ацетилхолин и брадикинин могут активировать генерацию не только NO, но и другого важного эндотелиального сосудорасширяющего аутокоида – простациклина.

Целью настоящего исследования было сравнить участие эндотелиальных NO и простациклина в механизме коронарорасширяющего действия ацетилхолина и брадикинина в изолированном сердце мыши. Кроме того, было оценено влияние данных соединений на генерацию простациклина в сердце по содержанию в эффуенте метаболита простациклина 6-кето-простагландин F_{1α}.

Материал и методы исследования

Эксперименты проводились на изолированных сердцах мышей линии C57BL/6 обоих полов массой 20-25 г с использованием метода Лангендорфа [3]. Животные наркотизировались тиопенталом (100-120 мг/кг 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 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 оксигенировался смесью 95 % O₂ + 5 % CO₂ при 37°C. Сердца стимулировались двумя платиновыми электродами, введёнными в правое предсердие с частотой 400 импульсов в минуту. Объём жидкости, протекавший в единицу времени, соответствовал величине коронарного потока. Данный показатель 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).

Сосудорасширяющие эффекты ацетилхолина и брадикинина вызывались путём болюсного введения растворов соединений (в объёме 10 мкл). Роль NO и простацик-

лина оценивались, соответственно, с помощью ингибитора NO-синтазы метилового эфира L-N^G-нитроаргинина (L-NAME, 5·10⁻⁴ М), и ингибитора циклооксигеназы индометацина (5·10⁻⁶ М). Ингибиторы добавлялись в перфузионный раствор. В ходе эксперимента эффект ацетилхолина и брадикинина оценивался дважды: до введения соответствующих антагонистов и в присутствии их. В контрольных экспериментах без использования ингибиторов сосудорасширяющие эффекты ацетилхолина и брадикинина были повторяемы.

Было определено также влияние ацетилхолина и брадикинина на продукцию простаглицлина путём измерения содержания в эффуенте из сердец 6-кето-простаглицлана F_{1α} с помощью набора энзимов для иммуноферментного анализа (Cayman Chemical Company, США).

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью компьютерной программы «Статистика 6». На первом этапе проводилась оценка нормальности распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Поскольку данные не подчинялись закону нормального распределения, обработка данных производилась непараметрическими методами. Данные представлены как медиана и интерквартильный размах (25-75 процентиля). При сравнении ответов на исследуемые соединения до и после применения фармакологических антагонистов использовался критерий Уилкоксона для связанных групп. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Величина базального коронарного потока в экспериментах с L-NAME составляла 1,41 (1,06;1,75) мл/мин и 0,90 (0,64;1,10) мл/мин до и после применения данного антагониста, соответственно (p=0,0002). В экспериментах с индометацином базальный коронарный поток был 1,68 (1,10;2,49) мл/мин и 1,42 (1,06;1,75) мл/мин до и после применения антагониста, соответственно (p=0,052). Как ацетилхолин, так и брадикинин вызывали дозозависимый прирост коронарного потока в изолированном сердце мыши. Коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином, состояла из двух фаз: кратковременной ранней вазодилатации и более длительной поздней (см. рисунок). Ранняя вазодилатация значительно (на 67,1%) уменьшалась в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME (5·10⁻⁴ М) и не изменялась существенно ингибитором циклооксигеназы индометацином (таблица 1). В то же время поздняя вазодилатация практически полностью блокировалась индометацином и незначительно (на 32,2%) уменьшалась L-NAME. Коронарная вазодилатация, вызванная брадикинином, значительно уменьшалась в присутствии L-NAME и не изменялась на фоне применения индометацина (таблица 1).

Установлено также, что ацетилхолин увеличивал скорость выведения 6-кето-простаглицлана F_{1α} в изолиро-

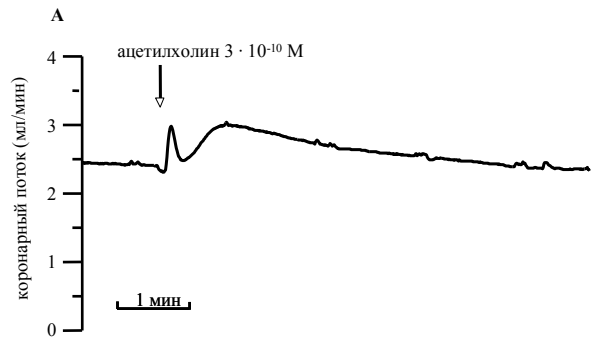


Рисунок – Коронарорасширяющий ответ на ацетилхолин в изолированном сердце мыши: фрагмент записи эксперимента

ванном сердце мыши в 6,83 раза (табл. 2). Брадикинин тоже увеличивал выброс метаболита простаглицлана, но в меньшей степени (в 2,16 раза).

Таблица 2 – Влияние ацетилхолина и брадикинина на скорость выведения 6-кето-простаглицлана F_{1α} в изолированном сердце мыши – Ме (25%;75%)

Соединение	Выброс 6-кето-простаглицлана F _{1α} (пкг/мин)	
	до введения соединения	после введения соединения
Ацетилхолин (300 пкмоль, n=8)	24,53 (15,95;36,42)	167,44 (121,77;236,69) p=0,012*
Брадикинин (1 нмоль, n=5)	14,80 (13,84;15,77)	31,94 (31,17;37,25) p=0,043*

Примечание: * - статистически достоверное отличие по сравнению с контролем, p<0,05.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в изолированном сердце мыши NO определяет только кратковременную раннюю фазу коронарного вазодилаторного ответа на ацетилхолин, в то время как поздняя фаза опосредована в основном простаглицлином. В то же время коронарная вазодилатация, вызванная брадикинином, реализуется главным образом через NO. С другой стороны, как ацетилхолин, так и брадикинин активируют генерацию эндотелиального простаглицлана. Отсутствие существенного вклада простаглицлана в коронарную вазодилатацию, вызванную брадикинином, может объясняться меньшим уровнем активации продукции данного аутокоида. Очевидно, концентрация простаглицлана в данном случае недостаточна для развития выраженной коронарной вазодилатации.

Сходные данные о стимуляции генерации простаглицлана были получены Lamontagne и соавт. на изолированном сердце кролика [13]. Однако на этой модели, в противоположность данным настоящего исследования, эффект брадикинина был в 3 раза выше в сравнении с эффектом ацетилхолина, и ингибитор циклооксигеназы диклофенак уменьшал только коронарную вазодилатацию, вызванную брадикинином.

Таблица 1 – Влияние L-NAME и индометацина на субмаксимальную коронарную вазодилатацию, вызванную ацетилхолином (3×10⁻¹⁰ М) и брадикинином (10⁻⁹ М) в изолированном сердце мыши – Ме(25%;75%)

Вводимое соединение		Прирост коронарного потока (мл/мин)			
		до применения L-NAME	в присутствии L-NAME	до применения индометацина	в присутствии индометацина
Ацетилхолин	ранняя вазодилатация	0,77 (0,50;0,78) n=9	0,30 (0,18;0,49) n=9; p=0,012*	0,51 (0,39;0,92) n=10	0,45 (0,31;0,91) n=10; p=0,241
	поздняя вазодилатация	0,59 (0,52;0,80) n=9	0,41 (0,35;0,42) n=9; p=0,066	0,47 (0,42;0,71) n=10	0,07 (0,00;0,11) n=10; p=0,005*
Брадикинин		2,20 (1,50;2,80) n=9	0,80 (0,40;1,10) n=9; p=0,008	1,95 (1,40;2,26) n=10	1,67 (1,35;2,25) n=10; p=0,878

Примечание: * - статистически достоверное отличие по сравнению с контролем, p<0,05.

Полученные данные об основной роли простаглицлина в коронарной вазодилатации в изолированном сердце мыши не соответствуют результатам исследований на изолированном сердце кролика [13], изолированных коронарных артериях собаки [19] и свиньи [8], а также в коронарном кровообращении собак *in vivo* [6], где коронарорасширяющая реакция на ацетилхолин была NO-зависимая. Это противоречие может быть связано не только с видовыми различиями. Отличия в данных, полученные на изолированных коронарных сосудах и изолированном сердце, могут объясняться разным калибром сосудов: в первом случае оцениваются крупные артерии, в то время как в изолированном сердце коронарный поток определяется в основном мелкими артериолами.

Итак, в настоящем исследовании показано, что коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином, реализуется через простаглицлин и NO, в то время как коронарорасширяющий эффект брадикинина опосредован в основном NO. С другой стороны, как ацетилхолин, так и брадикинин (в меньшей степени) стимулируют продукцию простаглицлина эндотелиальными клетками коронарных сосудов. Это может иметь значение не только для регуляции сосудистого тонуса, но и для регуляции гемостаза, так как простаглицлин – один из важнейших эндогенных антиагрегантов. Избирательное воздействие на соответствующие подтипы холинорецепторов и кининовых рецепторов в коронарном русле может рассматриваться в качестве одного из подходов фармакологической коррекции патологии коронарных сосудов.

Выводы

1. Коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином, в изолированном сердце мыши состоит из ранней фазы, опосредованной NO, и поздней фазы, определяемой преимущественно простаглицлином.

2. Коронарорасширяющий эффект брадикинина реализуется в основном через NO.

3. Как ацетилхолин, так и брадикинин (в меньшей степени) стимулируют продукцию простаглицлина в изолированном сердце мыши.

Литература

1. Beard, K.M., Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH₂-terminal kinase / K.M. Beard, H. Lu, K. Ho, I.G. Fantus // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 2678-2687.
2. Brown, N.J. Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway / N.J. Brown, J.V. Gainer, L.J. Murphey, D.E. Vaughan // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102. – № 18. – P. 2190-2196.
3. Chlopicki, S.. Compensation of endothelium-dependent responses in coronary circulation of eNOS-deficient mice / S. Chlopicki, V.I. Kozlovski, B. Lorkowska [et al.] // *J Cardiovasc. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 46, №1. – P. 115-123.
4. Clark, S.G. Superoxide anions contribute to impaired regulation of blood pressure by nitric oxide during the development of cardiomyopathy / S.G. Clark, L.C. Fuchs // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1997. – Vol. 282, № 3. – P. 1473-1479.
5. Furchgott, R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki // *Nature*. – 1980. – Vol. 288. – P. 373-376.
6. Gross, G.J. Effect of COX-1/COX-2 inhibition versus selective COX-2 inhibition on coronary vasodilator responses to arachidonic acid and acetylcholine / G.J. Gross, J. Moore // *Pharmacology*. – 2004. – Vol. 71, №3. – P. 135-142.
7. Hardy, P. A major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet / P. Hardy, D. Abran, X. Hou [et al.] // *Circ Res*. – 1998. – V. 83. – P. 721-729.

8. Hashimoto, M. Notes on the acetylcholine-induced relaxation of porcine coronary arteries / M. Hashimoto, Y. Ishida, I. Sakuma [et al.] // *Life Sci*. – 1994. – Vol. 54, №8. – P. 525-531.

9. Kamei, M. Endothelial factors involved in the bradykinin-induced relaxation of the guinea-pig aorta / M. Kamei, Y. Yoneda, H. Suzuki // *J. Smooth. Muscle Res.* – 2000. – Vol. 36. – P. 127-135.

10. Kamper, A.M. Prostaglandins are involved in acetylcholine- and 5-hydroxytryptamine-induced, nitric oxide-mediated vasodilatation in human forearm. / A.M. Kamper, L.C. Paul, G.J. Blauw // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 40, №6. – P. 922-929.

11. Kato, M. Bradykinin induced dilatation of human epicardial and resistance coronary arteries in vivo: effect of inhibition of nitric oxide synthesis / M. Kato, N. Shiode, T. Yamagata [et al.] // *Heart*. – 1997. – Vol. 78. – P. 493-498.

12. Lamontagne, D. NG-nitro-L-arginine antagonizes endothelium-dependent dilator responses by inhibiting endothelium-derived relaxing factor release in the isolated rabbit heart / D. Lamontagne, U. Pohl, R. Busse // *Pflugers Arch.* – 1991. – Vol. 418, № 3. – P. 266-270.

13. Lamontagne, D. Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed / D. Lamontagne, A. Konig, E. Bassenge, R. Busse // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 1992. – Vol. 20. – P. 652-657.

14. Obi, T. Characterization of muscarinic receptor subtype mediating contraction and relaxation in equine coronary artery in vitro / T. Obi, A. Kabeyama, A. Nishio // *J. Vet. Pharmacol. Ther.* – 1994. – Vol. 17, № 3. – P. 226-231.

15. O'Kane, K.P.J. Local L-N^G-monomethyl-arginine attenuates the vasodilator action of bradykinin in the human forearm / K.P.J. O'Kane, D.J. Webb, J.G. Gollier [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 1994. – Vol. 38. – P. 311 – 315.

16. Oriji, G. Role of prostacyclin in the renal response to acetylcholine / G. Oriji, J.R. Gill Jr., J.C. Yun, H. Keiser // *Ren Physiol Biochem*. – 1992. – Vol. 15, № 6. – P. 318-324.

17. Quinn, S. Role of cyclooxygenase and haemoxygenase products in nitric oxide-independent vasodilatation in the porcine ciliary artery / S. Quinn, C. O'Brien, P. McLoughlin // *Eye*. – 2003. – Vol. 17. – P. 628-636.

18. Radomski, M.W. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide/ M.W. Radomski, R.M.J. Palmer, S. Moncada // *Br. J. Pharmacol.* – 1987. – Vol. 92. – P. 639-646.

19. Shiraishi, S. Comparison of endothelium-dependent responses of canine internal thoracic and coronary arteries / S. Shiraishi, A. Mori, N. Toda // *Jpn J Pharmacol.* – 1993. – Vol. 61, №3. – P. 243-250.

20. Tracey, A. Relaxation to bradykinin in bovine pulmonary supernumerary arteries can be mediated by both a nitric oxide-dependent and -independent mechanism / A. Tracey, D. Bunton, J. Irvine [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 137. – P. 538-544.

21. Traverse, J.H. Coronary nitric oxide production in response to exercise and endothelium-dependent agonists / J.H. Traverse, Y.L. Wang, R. Du [et al.] // *Circulation*. – 2000. – Vol. 101, № 21. – P. 2526-2531.

22. Willis, A.P. Endothelial NO and prostanoid involvement in newborn and juvenile pig pial arteriolar vasomotor responses / A.P. Willis, C.W. Leffler // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. 2366-2377.

23. Wotherspoon, F. The contribution of nitric oxide and vasodilatory prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in Type 1 diabetes. / F. Wotherspoon, D.L. Browne, D.R. Meeking [et al.] // *Diabet Med*. – 2005. – Vol. 22, № 6. – P. – 697-702.

24. Yang, B.C. Role of eicosanoids in rat aortic ring response to agonists and acetylcholine with special reference to the biphasic effects of prostacyclin / B.C. Yang, D.N. Lawson, J.L. Mehta // *Eicosanoids*. – 1992. – Vol. 5. – P. 135-139.

25. Yu, H., Biphasic effect of bradykinin on rabbit afferent arterioles / H. Yu, O.A. Carretero, L.A. Juncos // *Hypertension*. – 1998. – Vol. 32. – P. 287-292.