



Возможные подходы к воспроизведению эндотелиальной дисфункции. Поиск оптимальной модели

© Цорин И. Б.¹, Кожевникова Л. М.², Симоненко С. А.¹, Суханова И. Ф.²,
Вититнова М. Б.¹, Крыжановский С. А.¹

¹ — ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

² — ФГБНУ «НИИ общей и патологической физиологии», Москва, Российская Федерация

Аннотация

Цель исследования. Поиск оптимального подхода к разработке трансляционной модели эндотелиальной дисфункции (ЭД).

Материалы и методы. Эксперименты проводили на 58 белых крысах-самцах, которых рандомизировали на 8 групп: 1-я ($n = 6$) — контроль для L-метионина (эксперименты *in vitro*); 2-я ($n = 6$) — L-метионин (эксперименты *in vitro*); 3-я ($n = 6$) — контроль для L-NAME (эксперименты *in vitro*); 4-я ($n = 6$) — L-NAME (эксперименты *in vitro*); 5-я ($n = 10$) — контроль для L-метионина (эксперименты *in vivo*); 6-я ($n = 7$) — L-метионин (эксперименты *in vivo*); 7-я ($n = 10$) — контроль для L-NAME (эксперименты *in vivo*); 8-я ($n = 7$) — L-NAME (эксперименты *in vivo*). Во 2-й и 6-й группах животным интрагастрально вводили L-метионин (3 г/кг/сут в течение 7 дней), а крысам групп 4 и 8 внутривенно (в/в) вводили L-NAME (0,025 г/кг/сут в течение 7 дней). Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя. В экспериментах *in vitro* для регистрации тонической активности колец аорты использовали четырехканальный миограф (Danish Myo Technology). В изометрическом режиме регистрировали силу сокращений колец аорты, вызываемых норадреналином (10^{-7} М) и карбахолом (10^{-5} М). В опытах *in vivo* на наркотизированных крысах (уретан 1300 мг/кг в/б) методом лазерной доплеровской флоуметрии с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАЗМА-Д» (производство НПП «Лазма», Россия) регистрировали микроциркуляцию крови в миокарде и скелетной мышце. При оценке микрокровотока показатель перфузии (М) рассчитывали в перфузионных единицах (перф. ед.).

Результаты. В экспериментах *in vitro* показано, что в условиях гипергомоцистеинемии, вызванной L-метионином, реакция сосудов на норадреналин остается практически неизменной. В то же время вазодилатирующий ответ на карбахол (10^{-5} М) статистически значимо уменьшался на 57 % ($p = 0,005$). У животных, получавших L-NAME, не только на 55 % ($p = 0,009$) снижается реакция на карбахол, но и на 48 % ($p = 0,003$) увеличивается вазоконстрикторный ответ на норадреналин. В условиях ЭД, вызванной как гипергомоцистеинемией, так и L-NAME, значительно снижается микроциркуляция крови в миокарде и скелетной мышце. Также показано, что в условиях модели ЭД, вызванной L-NAME, в отличие от модели ЭД, индуцированной L-метионином, не наблюдается падения массы тела крыс и практически отсутствует летальность.

Заключение. Таким образом, ЭД, индуцированная как гипергомоцистеинемией, так и блокадой L-NAME эндотелиальной синтазы оксида азота, сопровождается близкими по направленности изменениями микроциркуляции крови в миокарде и скелетной мышце. Однако, учитывая результаты экспериментов *in vitro*, можно заключить, что более перспективной представляется модель ЭД, вызываемая L-NAME, в условиях которой, в отличие от ЭД, индуцированной L-метионином, не только подавляется вазодилатирующий ответ сосуда на карбахол, но и активируется вазоконстрикторная реакция на норадреналин.

Ключевые слова: крысы; эндотелиальная дисфункция; микроциркуляция; сосуды; норадреналин; карбахол

Для цитирования:

Цорин И. Б., Кожевникова Л. М., Симоненко С. А., Суханова И. Ф., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А. Возможные подходы к воспроизведению эндотелиальной дисфункции. Поиск оптимальной модели. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(2):12–19. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-12-19>. EDN: BLAZIG

Поступила: 28.05.2024. **В доработанном виде:** 08.06.2024. **Принята к печати:** 15.06.2024. **Опубликована:** 30.06.2024.

Possible approaches to reproduction of endothelial dysfunction. searching for the optimal model

© Iosif B. Tsorin¹, Lubov V. Kozhevnikova², Sophia A. Simonenko¹, Irina F. Sukhanova², Marina B. Vititnova¹, Sergey A. Kryzhanovskii¹

¹ — Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

² —Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Abstract

Purpose of the study. Search for an optimal approach to developing a translational model of endothelial dysfunction (ED).

Materials and methods. The experiments were carried out on 58 white male rats, which were randomized into 8 groups: 1st ($n = 6$) — control for L-methionine (*in vitro* experiments); 2nd ($n = 6$) — L-methionine (*in vitro* experiments); 3rd ($n = 6$) — control for L-NAME (*in vitro* experiments); 4th ($n = 6$) — L-NAME (*in vitro* experiments); 5th ($n = 10$) — control for L-methionine (*in vivo* experiments); 6th ($n = 7$) — L-methionine (*in vivo* experiments); 7-a ($n = 10$) — control for L-NAME (*in vivo* experiments); 8th ($n = 7$) — L-NAME (*in vivo* experiments). In groups 2 and 6, animals were intragastrically administered L-methionine (3 g/kg/day for 7 days), and rats in groups 4 and 8 were administered i.p. with L-NAME (0.025 g/kg/day within 7 days). Control animals received an equivalent volume of solvent. In *in vitro* experiments, a four-channel myograph (Danish Myo Technology) was used to record the tonic activity of the aortic rings. The contraction strength of the aortic rings caused by norepinephrine (10^{-7} M) and carbachol (10^{-5} M) was recorded in isometric mode. In *in vivo* experiments on anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg i.p.), blood microcirculation in the myocardium and skeletal muscle was recorded

using laser Doppler flowmetry using a computerized laser analyzer "LAZMA-D" (manufactured by NPP "Lazma", Russia). When assessing microblood flow, the perfusion index (M) was calculated in perfusion units (perf.u.).

Results. *In vitro* experiments have shown that under conditions of hyperhomocysteinemia caused by L-methionine, the vascular response to norepinephrine remains practically unchanged. At the same time, the vasodilating response to carbachol (10^{-5} M) statistically significantly decreased by 57 % ($p = 0.005$). In animals treated with L-NAME, not only did the response to carbachol decrease by 55 % ($p = 0.009$), but also the vasoconstrictor response to norepinephrine increased by 48 % ($p = 0.003$). Under conditions of ED caused by both hyperhomocysteinemia and L-NAME, blood microcirculation in the myocardium and skeletal muscle is significantly reduced. It has also been shown that in the conditions of the L-NAME-induced ED model, in contrast to the L-methionine-induced ED model, there is no drop in rat body weight and practically no mortality.

Conclusion. Thus, ED induced by both hyperhomocysteinemia and L-NAME blockade of endothelial nitric oxide synthase is accompanied by similar changes in blood microcirculation in the myocardium and skeletal muscle. However, taking into account the results of *in vitro* experiments, we can conclude that the model of ED induced by L-NAME seems more promising, under which, in contrast to ED induced by L-methionine, the vasodilatory response of the vessel to carbachol is not only suppressed, but also the vasoconstrictor reaction to norepinephrine is activated.

Keywords: rat endothelial dysfunction; microcirculation; blood vessels; norepinephrine; carbachol

For citations:

Tsorin IB, Kozhevnikova LM, Simonenko SA, Suhanova IF, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. Possible approaches to reproduction of endothelial dysfunction. searching for the optimal model. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(2):12–19. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-12-19>. EDN: BLAZIG

Received: 28.05.2024. **Revision received:** 08.06.2024. **Accepted:** 15.06.2024. **Published:** 30.06.2024.

Введение / Introduction

В настоящее время большинство исследований, посвящённых поиску кардиотропных лекарственных средств, как правило, проводится на потенциально здоровых животных, не страдающих сердечно-сосудистой патологией. Однако такой подход не позволяет в полной мере оценить наличие/отсутствие кардиопротективного потенциала у изучаемых соединений, и тем более затрудняет экстраполяцию полученных данных на реальную клиническую ситуацию. В рамках решения этой проблемы нами ранее были разработаны трансляционные модели алкогольной кардиомиопатии и постинфарктной ХСН у крыс, что позволило не только в условиях, приближённых к клинической ситуации, оценить эффективность изучаемых нами соединений, но и выявить оригинальные биомаркеры для поиска инновационных кардиопротекторов [1, 2]. В развитие этого направления мы приступили к исследованиям, направленным на разработку трансляционной модели эндотелиальной дисфункции.

Эндотелий представляет собой однослойный пласт плоских клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов, а также полостей сердца. Масса эндотелия сопоставима с массой печени (1,5–1,8 кг), площадь его поверхности близка к 600 м² (площадь футбольного поля), непрерывный монослой эндотелиальных клеток имеет длину около 7 км и состоит из 1×10^{10} клеток [3].

В физиологическом состоянии эндотелий поддерживает оптимальное состояние сосудистой стенки за счёт сбалансированного синтеза вазодилатирующих и вазоконстрикторных агентов, при этом преобладает его вазодилатирующая функция за счёт синтеза и секреции оксида азота (NO), ингибиторов агрегации, коагуляции и активаторов фибринолиза, антиадгезивных субстанций и т. д. [4].

Патофизиологические механизмы, лежащие в основе развития эндотелиальной дисфункции, достаточно многообразны, однако большинство авторов полагает, что дисфункция эндотелия преимущественно связана с недостаточной продукцией эндотелиальными клетками NO [5, 6]. Помимо NO, значительную роль в патогенезе эндотелиальной дисфункции играют активные формы кислорода (АФК) [7] и ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) [8].

Исследования последних лет убедительно показали важную и самостоятельную и, по всей видимости, одну из ключевых ролей дисфункции эндотелия в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Опубликовано много экспериментальных и клинических работ, посвящённых роли эндотелиальной дисфункции в возникновении и прогрессировании таких заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССС), как артериальная гипертензия (АГ) [9, 10], ишемическая болезнь сердца (ИБС) [11], инфаркт миокарда (ИМ) [12], хроническая сердечная недостаточность (ХСН) [13], ишемическое повреждение головного мозга [14] и др. С эндотелиальной дисфункцией ассоциируются все основные факторы риска атеросклероза: АГ, гиперхолестеринемия, сахарный диабет, курение, гипергомоцистеинемия. Не менее важно и то, что не только сама эндотелиальная дисфункция (ЭД) способствует формированию и прогрессированию патологического процесса, но и основное заболевание зачастую усугубляет эндотелиальное повреждение [15].

Анализ литературы показал, что для воспроизведения ЭД у крыс используются самые разнообразные методические приёмы, в том числе модели, вызывающие метаболические нарушения, инициируемые диетой с высоким содержанием жиров, и/или сахарным диабетом, путём инъекции аллоксана или стрептозотцина, а также трансгенные модели, воспроизводящие метаболические нарушения [16]. Однако в литературу

ре наиболее широко представлены метиониновая и L-NAME-индуцированная модели ЭД.

Показано, что диета с избыточным содержанием метионина инициирует у крыс гипергомоцистеинемию [17]. В свою очередь, гипергомоцистеинемия усиливает действие эндогенных конкурентных ингибиторов eNOS, а именно L-N-монометиларгинина (L-NMMA) и асимметричного диметиларгинина (ADMA), которые могут способствовать дисфункции эндотелия сосудов [18, 19]. Помимо этого, гипергомоцистеинемия может подавлять активность eNOS путём её дефосфорилирования по Ser-1177 [20].

Метилловый эфир N ω -нитро-L-аргинина (L-NAME) — нитропроизводное аминокислоты аргинина — является неспецифическим ингибитором NOS, блокирующим активность eNOS, nNOS и iNOS [21]. Практически полное подавление L-NAME активности eNOS инициирует развитие ЭД и в последующем артериальной гипертензии [22].

Цель исследования / Purpose of the study

Поиск оптимального подхода к разработке трансляционной модели эндотелиальной дисфункции.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах самцах массой 200–220 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин (15 дней) в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Животных содержали в стандартных пластиковых клетках, с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме (light off at 08-00 am). Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

Животных рандомизировали на 8 групп: 1-я ($n = 6$) — контроль для L-метионина (эксперименты *in vitro*); 2-я ($n = 6$) — L-метионин эксперименты *in vitro*; 3-я ($n = 6$) — контроль для L-NAME (эксперименты *in vitro*); 4-я ($n = 6$) — L-NAME эксперименты *in vitro*; 5-я ($n = 10$) — контроль для L-метионина (эксперименты *in vivo*); 6-я ($n = 7$) — L-метионин эксперименты *in vivo*; 7-я ($n = 10$) — контроль для L-NAME (эксперименты *in vivo*); 8-я ($n = 7$) — L-NAME эксперименты *in vivo*.

Моделирование эндотелиальной дисфункции

Для моделирования ЭД использовали сопоставимые схемы применения L-метионина [23] и L-NAME [24]:

— L-метионин крысам групп №№ 2 и 6 вводили ежедневно в течение 7 суток интрагастрально в дозе 3 г/кг в виде суспензии, которая содержала метионин, солюбилизатор TWIN-80 и 1 % крахмальный раствор в соотношении 3:1:3, соответственно. В качестве контроля, группы 1 и 5, использовали животных, которым по той же схеме вводили эквивалентный объём растворителя;

— L-NAME крысам групп №№ 4 и 8 ежедневно в течение 7 суток вводили в дозе 0,025 г/кг, в/б. В качестве контроля использовали животных (группы №№ 3 и 7), которым по той же схеме вводили эквивалентный объём изотонического раствора натрия хлорида.

Эксперименты *in vitro*. Изолированные сосуды

Наркотизированных крыс (25 % раствор уретана, 4 мл/кг) декапитировали и извлекали грудной отдел аорты. Далее отрезок аорты (≈ 1 см) помещали в раствор Кребса–Хенселейта, охлажденный до +4 °C, и использовали в физиологических экспериментах. Состав раствора Кребса–Хенселейта в мМ: NaCl — 121; KCl — 4,69; KH₂PO₄ — 1,1; NaHCO₃ — 23,8; MgSO₄ — 1,6; CaCl₂ — 1,6; ЭДТА — 0,032; D-глюкоза — 8.

Сосуд очищали от жировой и соединительной тканей и нарезали кольцами шириной 1,5–2,2 мм, которые крепили на держателях, помещённых в раствор Кребса–Хенселейта, аэрируемый карбогеном (5 % CO₂ в O₂) в проволочном четырёхканальном миографе (Danish Myo Technology, модель Multi Myograph System — 620M). Измерение силы сокращения аорты проводили в изометрическом режиме.

После достижения в камерах миографа температуры раствора 37,0 $\pm$ 0,5 °C фрагменты аорты растягивали радиально до оптимального диаметра просвета, соответствующего 90 % пассивного диаметра сосуда при 100 мм рт.ст. После процедуры растяжения и последующего периода стабилизации в течение 20 мин жизнеспособность сосудов проверяли с помощью 1 мкМ фенилэфрина — агониста α -адренорецепторов. Сохранность эндотелия тестировали с помощью агониста мускариновых рецепторов 10 мкМ карбахола — негидролизуемого ацетилхолинэстеразами аналога ацетилхолина.

Эксперименты *in vivo*

Оценку микроциркуляции в тканях организма проводили методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАЗМА-Д» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 3.0.2.395. Эксперименты проводили на наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг в/б). Световодный зонд фиксировали на средней трети двухглавой мышцы бедра. При регистрации ЛДФ-грамм в области верхушки сердца животных переводили на искусственную вентиляцию лёгких при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Длительность записи показателей микроциркуляции в каждой точке составляла 8 минут. При оценке микрокровотока показатель перфузии (М) рассчитывали в перфузионных единицах (перф. ед.).

Дополнительные процедуры

Во всех группах проводили измерение массы тела крыс (перед началом эксперимента и через сутки после окончания введения L-метионина или L-NAME, или физиологического раствора) и оценивали летальность животных.

Статистический анализ

Эксперименты in vitro. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5. Для сравнения средних значений между группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими апостериорными тестами Тьюки. Расхождения считались достоверными при $p < 0,05$.

Эксперименты in vivo. Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — по Левену. Так как результаты измерений были распределены по нормальному закону и дисперсии выборок были гомогенны, то для определения значимости различий использовали t-критерий Стьюдента. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Использованные препараты

L-метионин (>99,0 %, PanReac, Barcelona, Spain).
Метилловый эфир N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME, >98,0 %, TCI, Tokyo, Japan).
Норадреналин (Sigma, USA).
Карбахол (Sigma, USA).
Фенилэфрин (Sigma, USA).
Уретан (>97 %, Acros organics, India).
Изотонический раствор натрия хлорида (ООО «Мосфарм», Россия).

Результаты / Results

Эксперименты in vitro. Анализ результатов экспериментов на изолированных кольцах аорты крыс показал, что в условиях гипергомоцистеинемии, вызванной L-метионином, реакция сосудов на норадреналин (неселективный агонист α_1 - и α_2 -адренорецепторов) в концентрации 10^{-7} М остаётся практически неизменной. Так, если в контроле изменение тонуса сосудов составляло $+17,0 \pm 0,9$ мН, то у крыс, получавших L-метионин, этот показатель равнялся $+15,4 \pm 1,6$ мН ($p = 0,4$). В то же время вазодилатирующий ответ на неселективный агонист М- и Н-холинорецепторов карбахол (10^{-5} М) статистически значимо уменьшался на 57 % ($p = 0,005$). Так, если в контроле величина реакции составляла $-14,1 \pm 0,5$ мН, то в условиях гипергомоцистеинемии она уменьшалась до $-6,0 \pm 0,9$ мН (табл. 1).

Таблица 1

Изменение реакций изолированной аорты крысы на норадреналин (10^{-7} М) и карбахол (10^{-5} М) в условиях ЭД, вызванной L-метионином (3 г/кг/сут интрагастрально в течение 7 дней)

Table 1

Changes in the reactions of isolated rat aorta to norepinephrine (10^{-7} M) and carbachol (10^{-5} M) under conditions of ED caused by L-methionine (3 g/kg/day intragastrically for 7 days)

Реакция на вещество	Группа	
	контроль, $n = 6$	эндотелиальная дисфункция, $n = 6$
Реакция на норадреналин 10^{-7} М, мН	$+17,0 \pm 0,9$	$+15,4 \pm 1,6$ $p = 0,4$
Реакция на карбахол 10^{-5} М, мН	$-14,1 \pm 0,5$	$-6,0 \pm 0,9$ $p = 0,005$
Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p — указано по отношению к контролю. Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; p is indicated in relation to the control.		

Таким образом, в экспериментах *in vitro* показано, что в условиях гипергомоцистеинемии вазодилатирующий ответ аорты на эталонный препарат карбахол значимо уменьшается, что, вероятно, связано с формированием ЭД.

У животных, получавших L-NAME, не только статистически значимо на 55 % ($p = 0,009$) снижается реакция на карбахол, но и значительно, на 48 % ($p = 0,003$), увеличивается вазоконстрикторный ответ на норадреналин (табл. 2). Так, если в контроле реакция на норадреналин была равна $18,2 \pm 1,7$ мН, то у животных, получавших L-NAME, она составила $27,0 \pm 1,5$ мН ($p = 0,003$).

Как следует из полученных данных, у крыс, получавших L-NAME, так же как и крыс, получавших L-метионин, не только значимо снижена реакция аорты на эталонный вазодилататор карбахол, но и, в от-

Таблица 2

Изменение реакций изолированной аорты крысы на норадреналин (10^{-7} М) и карбахол (10^{-5} М) в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной L-NAME (25 мг/кг/сут в/б в течение 7 дней)

Table 2

Changes in the reactions of isolated rat aorta to norepinephrine (10^{-7} M) and carbachol (10^{-5} M) under conditions of endothelial dysfunction caused by L-NAME (25 mg/kg/day i.p. for 7 days)

Реакция на вещество	Группа	
	Контроль, $n = 6$	Эндотелиальная дисфункция, $n = 6$
Реакция на норадреналин 10^{-7} М, мН	+18,2±1,7	+27,0±1,5 $p = 0,003$
Реакция на карбахол 10^{-5} М, мН	-15,4±1,6	-7,0±2,0 $p = 0,009$

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p — указано по отношению к контролю.
Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; p is indicated in relation to the control.

личие от последних, значимо увеличена реакция сосуда на эталонный вазоконстриктор норадреналин, что достаточно убедительно свидетельствует о формировании ЭД.

Таким образом, результаты экспериментов *in vitro* свидетельствуют о том, что инициация ЭД, вызванная курсовым применением L-NAME, более предпочтительна, поскольку, в отличие от L-метионина, на фоне его применения происходит не только ослабление зависимой от эндотелия вазодилатирующей реакции, но и усиление вазоконстрикторного ответа, что патогномонично для моделируемой патологии.

Эксперименты *in vivo*. Результаты изучения влияния гипергомоцистеинемии, инициированной L-метионином, на микроциркуляцию крови в сердце и скелетной мышце представлены в табл. 3. Как

Таблица 3

Влияние ЭД, вызванной гипергомоцистеинемией (L-метионин 3 г/кг/сут интрагастрально в течение 7 дней), на микроциркуляцию крови (перф. ед.) в сердце и скелетной мышце наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг в/б)

Table 3

Effect of ED caused by hyperhomocysteinemia (L-methionine 3g/kg/day intragastrically for 7 days) on blood microcirculation (perf. units) in the heart and skeletal muscle of anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg i.p.)

Группа	Сердце	Скелетная мышца
Контроль, $n = 10$	28,27±0,70	11,04±0,56
ЭД, $n = 7$	21,46±1,58 $p = 0,008$	6,13±0,30 $p < 0,001$

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p — указано по отношению к контролю.
Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; p is indicated in relation to the control

следует из полученных данных, гипергомоцистеинемия вызывает статистически значимое уменьшение микроциркуляции крови в сердечной мышце на 24 %, $p = 0,008$) и скелетной мускулатуре (на 45 %, $p < 0,001$). Так, например, если в контроле микроциркуляция крови в сердечной мышце равнялась 28,27±0,70 перф. ед., то на фоне приёма L-метионина — лишь 21,46±1,58 перф. ед.

Показано, что в условиях ЭД, вызванной подавлением L-NAME активности eNOS, изменения микроциркуляции крови близки к таковым, инициированным гипергомоцистеинемией (табл. 4). Так, в сердечной мышце микроциркуляция крови снизилась с 27,90±0,72 перф. ед. до 23,78±0,53 перф. ед. ($p < 0,01$), а в скелетной мускулатуре с 13,81±0,34 перф. ед. до 8,70±0,34 перф. ед. ($p < 0,01$).

Таблица 4

Влияние ЭД, вызванной L-NAME (25 мг/кг/сут в/б в течение 7 дней), на микроциркуляцию крови (перф. ед.) в сердце и скелетной мышце наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг в/б)

Table 4

Effect of ED caused by L-NAME (25 mg/kg/day IV for 7 days) on blood microcirculation (perf. units) in the heart and skeletal muscle of anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg i.p.)

Группа	Сердце	Скелетная мышца
Контроль, $n = 10$	27,90±0,72	13,81±0,34
ЭД, $n = 7$	23,78±0,53 $p < 0,01$	8,70±0,34 $p < 0,01$

Таким образом, ЭД, индуцированная как гипергомоцистеинемией, так и блокадой L-NAME эндотелиальной синтазы оксида азота сопровождается близкими по направленности изменениями микроциркуляции крови в миокарде и скелетной мышце, однако, анализируя полученные результаты, можно полагать, что модель ЭД, инициируемая L-NAME, на данном этапе представляется более перспективной по следующим соображениям:

— метод индуцирования ЭД с помощью L-NAME менее травматичен, поскольку внутрибрюшинное введение не требует использования зонда, применение которого может вызвать стресс у животного, а также раздражение слизистой оболочки пищевода и рвоту;

— воспроизведенная с помощью L-NAME ЭД не только инициирует подавление вазодилатирующего ответа сосуда, но, в отличие от ЭД, индуцированной L-метионином, способствует значительной активации вазоконстрикторного ответа;

— индуцирование ЭД с помощью L-NAME не сопровождается снижением массы тела животного (до начала моделирования контроль — 247±3 г, группа L-NAME — 243±5 г; по окончании моделирования контроль — 298±7 г, группа L-NAME — 294±9 г), тогда как в процессе моделирование ЭД с помощью

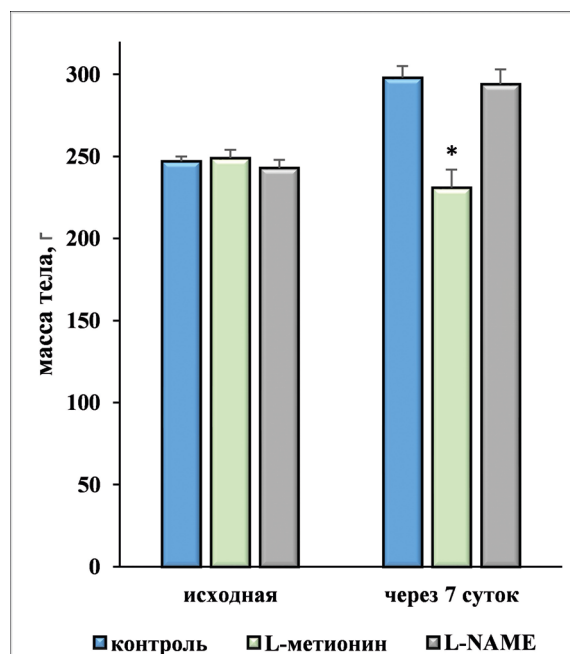


Рис. Изменения массы тела крыс под влиянием L-метионина (3 г/кг/сут интрагастрально в течение 7 дней) и L-NAME (25 мг/кг/сут в/б в течение 7 дней)

Fig. Changes in body weight of rats under the influence of L-methionine (3 g/kg/day intragastrically for 7 days) and L-NAME (25 mg/kg/day i.p. for 7 days)

Примечания: По оси ординат масса тела в г; показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; * — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю.
Notes: The y-axis is body mass in g; arithmetic averages and their standard errors are shown; * — $p \leq 0.05$ relation to control.

L-метионина наблюдается значимое ($p \leq 0,05$) снижение массы крысы $\approx$ на 25 % (до начала моделирования: контроль — 247 ± 3 г, группа L-метионина — 249 ± 5 г; по окончании моделирования: контроль — 298 ± 7 г, группа L-метионина — 231 ± 11 г) (рис.);

— на фоне моделирования ЭД при помощи L-NAME выживаемость крыс составила 97 %, тогда как на фоне моделирования ЭД при помощи L-метионина лишь 67 % ($p \leq 0,05$).

Заключение / Conclusion

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что опосредованная L-NAME блокада эндотелиальной синтазы NO подавляет вазодилатирующий ответ сосуда на М- и Н-холиномиметик, структурный аналог нейромедиатора ацетилхолина карбахол, активирует вазоспастическую реакцию на нейромедиатор норадреналин, что соответствует патогенетической картине, известной для ЭД. В условиях гипергомоцистеинемии, инициированной L-метионином, в рамках использованной нами модели, подобной сочетанной реакции сосуда на нейромедиаторы не наблюдается, что делает L-NAME-обусловленную модель ЭД более привлекательной для дальнейших исследований по разработке трансляционной модели ЭД, воспроизводящей основные клинико-диагностические признаки этой патологии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Цорин Иосиф Борисович

Автор, ответственный за переписку

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
e-mail: tsorin_ib@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
РИНЦ SPIN-код: 4015-3025

Iosif B. Tsorin

Corresponding author

PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Mos-
cow, Russian Federation
e-mail: tsorin_ib@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
RSCI SPIN code: 4015-3025

Кожевникова Любовь Михайловна

д. м. н., зав. лабораторией хронического
воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «НИИ
общей и патологической физиологии», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1323-6472>
РИНЦ SPIN-код: 6882-6933

Lubov V. Kozhevnikova

PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Chron-
ic Inflammation and Microcirculation FSBSI “In-
stitute of General Pathology and Pathophysiology”,
Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1323-6472>
RSCI SPIN code: 6882-6933

Симоненко София Алексеевна

лаборант-исследователь лаборатории
фармакологии кровообращения ФГБНУ
«ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
РИНЦ SPIN-код: 3075-6496

Sophia A. Simonenko

laboratory research assistant of laboratory of cir-
culation pharmacology Federal research center for
innovator and emerging biomedical and pharma-
ceutical technologies, Moscow, Russian Federation
RSCI SPIN code: 3075-6496

Суханова Ирина Федоровна

к. б. н., с. н. с. лаборатории хронического
воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «НИИ
общей и патологической физиологии», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1220-2596>

Irina F. Sukhanova

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of
Laboratory of Chronic Inflammation and Microcir-
culation FSBSI “Institute of General Pathology and
Pathophysiology”, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1220-2596>

Вититнова Марина Борисовна

к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
РИНЦ SPIN-код: 1901-8919

Marina B. Vititnova

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
RSCI SPIN code: 1901-8919

Крыжановский Сергей Александрович

д. м. н., зав. лабораторией фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
РИНЦ SPIN-код: 6596-4865

Sergey A. Kryzhanovskii

PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Circula-
tion Pharmacology Federal research center for inno-
vator and emerging biomedical and pharmaceutical
technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
RSCI SPIN code: 6596-4865

Список литературы / References

1. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Ионова Е.О. и др. Трансляционная модель хронической сердечной недостаточности у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018;62(2):136-148. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Ionova EO, et al. Translational model of chronic cardiac failure in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2018;62(2):136-148. (In Russ.)]. doi: 10.25557/0031-2991.2018.02.136-148.
2. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б. и др. Алкогольная кардиомиопатия: трансляционная модель. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017;163(5):627-631. [Kryzhanovskii SA, Kolik LG, Tsorin IB, et al. Alcoholic Cardiomyopathy: Translation Model. *Bull Exp Biol Med*. 2017;163(5):627-631. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s10517-017-3865-0.
3. Радайкина О.Г., Власов А.П., Мышкина Н.А. Роль эндотелиальной дисфункции в патологии сердечно-сосудистой системы. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2018;(4):8-17. [Radaykina OG, Vlasov AP, Myshkina NA. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular system pathology. *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal*. 2018;(4):8-17. (In Russ.)]. doi: 10.23648/UMBJ.2018.32.22685.
4. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(9):e108-e114. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309813.
5. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric oxide and endothelial dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020; 36(2):307-321. doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009.
6. Roy R, Wilcox J, Webb AJ, O'Gallagher K. Dysfunctional and dysregulated nitric oxide synthases in cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic potential. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(20):15200. doi: 10.3390/ijms242015200.
7. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018;100:1-19. doi: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
8. Sankrityayan H, Rao PD, Shelke V, et al. Endoplasmic reticulum stress and renin-angiotensin system crosstalk in endothelial dysfunction. *Curr Mol Pharmacol*. 2023;16(2):139-146. doi: 10.2174/1874467215666220301113833.
9. Ambrosino P, Bachetti T, D'Anna SE et al. Mechanisms and clinical implications of endothelial dysfunction in arterial hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2022;9(5):136. doi: 10.3390/jcdd905013620.
10. Das D, Shruthi NR, Banerjee A, et al. Endothelial dysfunction, platelet hyperactivity, hypertension, and the metabolic syndrome: molecular insights and combating strategies. *Front Nutr*. 2023;10:221438. doi: 10.3389/fnut.2023.1221438.
11. Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron Artery Dis*. 2014;25(8):713-724. doi: 10.1097/MCA.0000000000000178.
12. Pavlović P, Tavciowski D, Stamenković E. Thrombocyte aggregation, endothelial dysfunction and acute myocardial infarction. *Vojnosanit Pregl*. 2009;66(4):323-327. doi: 10.2298/vsp0904323p.
13. Wang Y, Zhang J, Wang Z, et al. Endothelial-cell-mediated mechanism of coronary microvascular dysfunction leading to heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail Rev*. 2023;28(1):169-178. doi: 10.1007/s10741-022-10224-y.
14. Roquer J, Segura T, Serena J, Castillo J. Endothelial dysfunction, vascular disease and stroke: the ARTICO study. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27 Suppl 1:25-37. doi: 10.1159/000200439.
15. Новикова Н.А. Дисфункция эндотелия — новая мишень медикаментозного воздействия при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Врач*. 2005;8:51-53. [Novikova NA. Disfunktsiya endotelija — novaya mishen' medikamentoznogo vozdeistviya pri serdечно-sosudistyykh zabolevaniyakh. *Vrach*. 2005;8:51-53. (In Russ.)].
16. Sorop O, van de Wouw J, Chandler S, et al. Experimental animal models of coronary microvascular dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2020;116(4):756-770. doi: 10.1093/cvr/cvaa002.
17. Liu X, Qu D, He F, Lu Q, Wang J, Cai D. Effect of lycopene on the vascular endothelial function and expression of inflammatory agents in hyperhomocysteinemic rats. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16 Suppl 1:244-8.
18. Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atheroscler Suppl*. 2003 Dec;4(4):61-5. doi: 10.1016/s1567-5688(03)00035-7.
19. Jahangir E, Vita JA, Handy D, et al. The effect of L-arginine and creatine on vascular function and homocysteine metabolism. *Vascular Med*. 2009;4(3):239-248. doi: 10.1177/1358863X08100834.245.
20. Yan TT, Li Q, Zhang XH, et al. Homocysteine impaired endothelial function through compromised vascular endothelial growth factor/Akt/endothelial nitric oxide synthase signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Nov;37(11):1071-7. doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05438.x.
21. Bernátová I, Pechánová O, Kristek F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment. *Jpn J Pharmacol*. 1999 Sep;81(1):99-106. doi: 10.1254/jip.81.99.
22. Saravananakumar M, Raja B. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2011 Dec 5;671(1-3):87-94. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.08.052.
23. Патент РФ на изобретение №2414755/ 20.03.2011. Бюл. №8. Емельянов С.Г., Корокин М.В., Покровский М.В. и др. Способ моделирования гипергомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции. [Patent RUS №2414755/ 20.03.2011. Byul. №8. Emel'yanov SG, Korokin MV, Pokrovskii MV i dr. Sposob modelirovaniya gipergomotsistein indutsirovannoi endotelial'noi disfunktsii. (In Russ.)]. Доступно по: <https://www.fips.ru/registers-web/action?acName=clickRegister®Name=RUPAT>. Ссылка активна на 02.04.2024.
24. Патент РФ №2301670/ 27.06.2007. Бюл. №18. Покровский М.В., Кочкаров В.И., Покровская Т.Г. и др. Способ коррекции эндотелиальной дисфункции комбинацией эналаприла и резвератрола при l-name-индуцированном дефиците оксида азота. Опубликовано: [Patent RUS №2301670/ 27.06.2007. Byul. №18. Pokrovskii MV, Kochkarov VI, Pokrovskaya TG i dr. Sposob korrektsii endotelial'noi disfunktsii kombinatsiei enalapril i rezveratrola pri l-name-indutsirovannom defitsite oksida azota. (In Russ.)]. Доступно по: <https://www.fips.ru/registers-web/action?acName=clickRegister®Name=RUPAT>. Ссылка активна на 02.04.2024.