

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

КОРОНАРНАЯ ВАЗОДИЛАТАЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ АЦЕТИЛХОЛИНОМ В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ МОРСКОЙ СВИНКИ И МЫШИ: РАЗЛИЧНЫЙ ВКЛАД ОКИСИ АЗОТА И ПРОСТАЦИКЛИНА

В. И. Козловский¹, П. Гвудзь², Л. Дрелихаж², В. В. Зинчук¹, С. Хлопицкий²

Исследовали вклад окиси азота (NO) и простациклина (PGI₂), а также м₂- и м₃-холинорецепторов в коронарную вазодилатацию, вызванную ацетилхолином в изолированном сердце морской свинки или мыши, перфузируемых по методу Лангендорфа. В сердце морской свинки коронарорасширяющий ответ на ацетилхолин значительно снижался ингибитором NO-синтазы метиловым эфиром L-N^G-нитроаргинина (L-NAME, 10⁻⁴ М), в то же время в сердце мыши данный ответ блокировался ингибитором циклооксигеназы индометацином (5 · 10⁻⁶ М). У обоих видов животных антагонист м₃-холинорецепторов 4-дифенилацетокси-N-метилпиперидин (4-DAMP, 3 · 10⁻⁸ М) блокировал сосудорасширяющий ответ, вызванный ацетилхолином, антагонист м₂-холинорецепторов метоктрамин (3 · 10⁻⁷ М) не влиял на этот ответ. Таким образом, сосудорасширяющий эффект ацетилхолина реализуется через NO в коронарном кровообращении морской свинки и через PGI₂ в коронарном кровообращении мыши. У обоих видов животных коронарорасширяющий эффект ацетилхолина опосредован м₃-рецепторами.

Ключевые слова: ацетилхолин, коронарная вазодилатация, окись азота, простациклин, м₂- и м₃-холинорецепторы

ВВЕДЕНИЕ

В 1980 г. Furchgott и Zawadski в экспериментах на изолированной аорте кролика установили, что для сосудорасширяющего действия ацетилхолина необходимо наличие эндотелиальных клеток. Эта закономерность была вскоре подтверждена на ряде других сосудистых моделей, в том числе на изолированных коронарных артериях кролика [12]. Позднее было обнаружено, что роль так называемого эндотелиального фактора расслабления сосудов играет окись азота (NO). В большинстве последующих работ сообщается о решающем вкладе эндотелиального NO в коронарорасширяющий эффект ацетилхолина [2, 3, 11, 13]. Однако имеется также ряд данных о возможном участии другого эндотелиального фактора — простациклина (PGI₂) — в механизме развития сосудорасширяющего эффекта ацетилхолина как в коронарном [4, 7], так и в других сосудистых руслах [6, 14].

Известно, что сосудистые эффекты ацетилхолина реализуются через мускариновые рецепторы. В коронарных сосудах обнаружены два подтипа этих рецепторов: м₂- и м₃-рецепторы [10].

Цель настоящей работы — оценить вклад эндотелиальных NO и PGI₂ в коронарорасширяющий эффект ацетилхолина в изолированных сердцах мыши и морской свинки, а также сравнить роль м₂- и м₃-холинорецепторов в механизме развития данного эффекта у обоих видов животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на изолированных сердцах морских свинок и мышей, которые перфузировали под постоянным давлением по методу Лангендорфа. В экспериментах использовали морских свинок обоих полов массой 300 – 400 г и мышей линии C57BL/6 обоих полов массой 20 – 25 г. Морских свинок наркотизировали пентобарбиталом (30 – 40 мг/кг), мышей наркотизировали тиопентал-натрием (100 – 120 мг/кг). После вскрытия грудной клетки сердца изолировали, промывали в холодном физиологическом растворе, затем коронарное русло изолированного сердца перфузировали ретроградно через аорту под постоянным перфузионным давлением (60 мм. рт. ст. для морских свинок, 100 мм. рт. ст. для мышей) 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 двумя

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. М. И. Бушма) Гродненского государственного медицинского университета, Гродно, Беларусь, 230015, ул. Горького, 80, E-mail: vkz45@rambler.ru

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

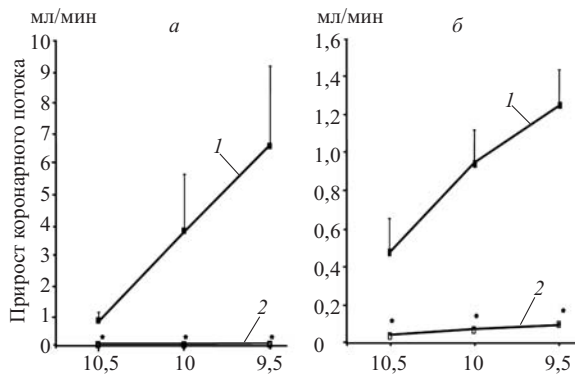


Рис. 1. Влияние 4-DAMP ($3 \cdot 10^{-8}$ М) на прирост коронарного потока, вызванный ацетилхолином, в изолированном сердце морской свинки (а, $n = 3$) и мыши (б, $n = 6$).

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. * — статистически достоверное отличие по сравнению с данными без 4-DAMP, $p < 0,05$. 1 — без 4-DAMP, 2 — в присутствии 4-DAMP. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — доза ацетилхолина, $-\lg$ М, по оси ординат — прирост коронарного потока.

платиновыми электродами, введенными в правое предсердие (частота составляла 273 имп. в минуту для морских свинок и 400 имп. в минуту для мышей). 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).

Сосудорасширяющий эффект ацетилхолина оценивали путем болюсного введения растворов соединения (в объеме 10 мкл). Роль NO, простаглицина, m_2 - и m_3 -холинорецепторов оценивали, соответственно, с помощью ингибитора NO-синтазы метилового эфира L-N^G-нитроаргина (L-NAME, 10^{-4} М для морских свинок и $5 \cdot 10^{-4}$ М для мышей), ингибитора циклооксигеназы индометацина ($5 \cdot 10^{-6}$ М), антагониста m_2 -рецепторов метоктрамина ($3 \cdot 10^{-7}$ М) и антагониста m_3 -рецепторов 4-дифенилацетокси-N-метилпиперидина (4-DAMP, $3 \cdot 10^{-8}$ М). Все ингибиторы добавляли в перфузионный раствор. В ходе эксперимента эффект ацетилхолина оценивали дважды: до введения соответствующих ингибиторов и в присутствии их. В контрольных экспериментах без использования ингибиторов сосудорасширяющий эффект ацетилхолина

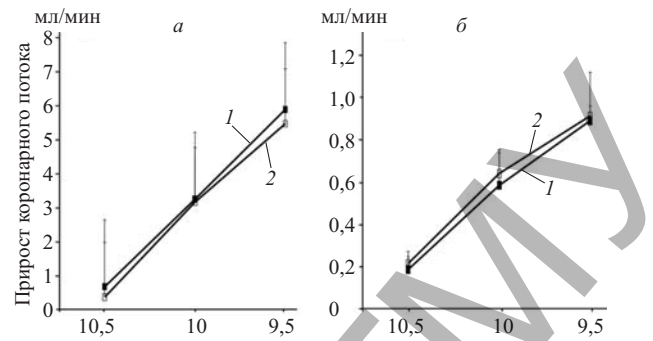


Рис. 2. Влияние метоктрамина ($3 \cdot 10^{-7}$ М) на прирост коронарного потока, вызванный ацетилхолином, в изолированном сердце морской свинки (а, $n = 4$) и мыши (б, $n = 4$).

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. 1 — без метоктрамина, 2 — в присутствии метоктрамина. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

был повторяем, величина его не изменялась при повторном введении.

Определяли также влияние ацетилхолина на продукцию PGI₂ путем измерения содержания в эфлюэнте из сердец 6-кето-простаглицина F_{1α} с помощью набора энзимов для иммуноферментного анализа (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI).

Полученные данные статистически обрабатывали общепринятым методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено, что как в изолированном сердце морской свинки, так и в изолированном сердце мыши ацетилхолин вызывал дозозависимый прирост коронарного потока при болюсном введении в дозах, начиная с $3 \cdot 10^{-8}$ М (рис. 1, 2). Сосудорасширяющему ответу на ацетилхолин в изолированном сердце мыши предшествовала кратковременная вазоконстрикторная фаза.

Влияние L-NAME и индометацина на прирост коронарного потока, вызванный ацетилхолином, представлено в таблице. L-NAME уменьшал сосудорасширяющий эффект ацетилхолина ($3 \cdot 10^{-7}$ М) в изолированном сердце морской свинки на 51,2 %. В изолированном сердце мыши L-NAME не вызвал статистически достоверного изменения величины прироста коронарного потока, вызванного ацетилхолином, хотя отмечалась тенденция к снижению данного показате-

Влияние L-NAME (10^{-4} М) и индометацина ($5 \cdot 10^{-6}$ М) на коронарную вазодилатацию, вызванную ацетилхолином ($3 \cdot 10^{-7}$ М) в изолированном сердце морской свинки и мыши ($M \pm m$)

Животное	Прирост коронарного потока, вызванный ацетилхолином			
	контроль	в присутствии L-NAME	контроль	в присутствии индометацина
Морская свинка	7,73 \pm 2,25 (5)	3,77 \pm 1,25* (5)	6,63 \pm 2,54 (4)	6,04 \pm 2,06 (4)
Мышь	0,68 \pm 0,14 (9)	0,41 \pm 0,07 (9)	0,52 \pm 0,09 (10)	0,06 \pm 0,02* (10)

Примечание: * — статистически достоверное отличие по сравнению с контролем, $p < 0,05$. В скобках — число животных.

ля. Индометацин не изменял сосудорасширяющую реакцию на ацетилхолин в изолированном сердце морской свинки и практически полностью блокировал ее в изолированном сердце мыши. L-NAME уменьшал величину базального коронарного потока как в изолированном сердце морской свинки ($11,16 \pm 0,7$ мл/мин до $7,84 \pm 0,88$ мл/мин, $n = 5$, $p < 0,05$), так и в изолированном сердце мыши ($1,29 \pm 0,11$ мл/мин до $0,82 \pm 0,11$ мл/мин, $n = 9$, $p < 0,05$). В то же время индометацин не вызывал статистически достоверного уменьшения базального коронарного потока в изолированном сердце обоих видов животных, хотя отмечалась тенденция к незначительному снижению данного параметра (в изолированном сердце морской свинки с $12,90 \pm 2,30$ мл/мин до $11,87 \pm 2,20$ мл/мин, $n = 4$, $p > 0,05$, в изолированном сердце мыши с $1,83 \pm 0,25$ мл/мин до $1,55 \pm 0,21$ мл/мин, $n = 10$, $p > 0,05$).

Обнаружено также, что ацетилхолин вызвал значительное увеличение содержания в эффуэнте из изолированного сердца мыши метаболита простагландина 6-кето-простагландина $F_{1\alpha}$ с $20,64 \pm 3,39$ пикограмм/мл до $98,87 \pm 6,16$ ($n = 8$, $p < 0,05$).

Антагонист m_3 -холинорецепторов 4-DAMP практически полностью блокировал сосудорасширяющий эффект ацетилхолина как в изолированном сердце морской свинки, так и в изолированном сердце мыши (рис. 1, а, б). В то же время антагонист m_2 -холинорецепторов метоктрамин существенно не влиял на данный эффект в сердце обоих видов животных (рис. 2, а, б).

Интересно, что вазоконстрикторная фаза сосудистой реакции на ацетилхолин, наблюдавшаяся в изолированном сердце мыши, также блокировалась 4-DAMP ($0,51 \pm 0,1$ мл/мин до введения 4-DAMP и $0,01 \pm 0,01$ мл/мин после введения 4-DAMP для дозы ацетилхолина $3 \cdot 10^{-7}$ М, $n = 5$, $p < 0,05$) и не изменялась метоктрамином ($0,49 \pm 0,10$ мл/мин до введения метоктрамина и $0,52 \pm 0,09$ мл/мин после введения метоктрамина для дозы ацетилхолина $3 \cdot 10^{-7}$ М, $n = 5$, $p > 0,05$).

Таким образом, в настоящей работе показано, что в изолированном сердце морской свинки коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином, связана с активацией эндотелиальной системы L-аргинин — NO, в то же время в изолированном сердце мыши данный ответ реализуется через PGI_2 . Роль PGI_2 в механизме сосудорасширяющей реакции на ацетилхолин в изолированном сердце мыши подтверждается также увеличением содержания метаболита данного соединения 6-кето-простагландина $F_{1\alpha}$ в эффуэнте из изолированного сердца мыши. Ранее было показано, что PGI_2 не имеет существенного значения в эндотелийзависимых сосудорасширяющих реакциях в изолированном сердце морской свинки [1]. Поэтому отсутствие роли этого эндотелиального фактора в вазодилатации, вы-

званной ацетилхолином, в коронарном русле морской свинки можно объяснить видовыми особенностями, и мы не исключаем возможной роли PGI_2 в коронарорасширяющем действии ацетилхолина у других видов животных и у человека. Тенденция к снижению сосудорасширяющего эффекта ацетилхолина в изолированном сердце мыши под влиянием L-NAME может быть объяснена взаимодействием между NO и PGI_2 , возможность которого предполагалась в одной из предыдущих работ [5].

Показано также, что в изолированных сердцах обоих видов животных коронарорасширяющий ответ на ацетилхолин реализуется через m_3 -холинорецепторы. Эти данные соответствуют результатам, полученным на других видах животных [15], а также данным экспериментов, выполненных на трансгенных мышцах с поврежденными (нокаутированными) генами, ответственными за m_2 - и m_3 -рецепторы [8]. Интересно, что вазоконстрикторная фаза, наблюдавшаяся при введении ацетилхолина в изолированном сердце мыши и связанная, очевидно, с активацией холинорецепторов гладких мышц сосудов, также блокировалась антагонистом m_3 -холинорецепторов и не изменялась антагонистом m_2 -рецепторов. Таким образом, не подтвердилось высказанное ранее предположение о роли m_2 -холинорецепторов в вазоконстрикции, вызванной ацетилхолином [9].

Таким образом, в настоящей работе показано, что эндотелийзависимая коронарная вазодилатация, вызванная ацетилхолином, может реализоваться как через NO, так и через PGI_2 . Основным подтипом рецепторов, ответственным за данный эффект, являются m_3 -холинорецепторы.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены различия в механизме эндотелийзависимой коронарной вазодилатации, вызванной ацетилхолином, у морской свинки и мыши. Данный эффект опосредован NO в изолированном сердце морской свинки и PGI_2 в изолированном сердце мыши.
2. В изолированном сердце морской свинки и мыши коронарорасширяющий эффект ацетилхолина реализуется через m_3 -холинорецепторы.

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. S. Chlopicki and R. J. Gryglewski, *J. Physiol. Pharmacol.*, **43**, 353 – 365 (1992).
2. S. G. Clark and L. C. Fuchs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**(3), 1473 – 1479 (1997).
3. G. J. Gross and J. Moore, *Pharmacology*, **71**(3), 135 – 42 (2004).

4. A. Godecke, U. K. Decking, and Z. Ding, *Circ Res*, **82**, 186 – 194 (1998).
5. R. J. Gryglewski, J. Swies, S. Chlopicki, and P. Niezabitowski, *J. Physiol. Pharmacol.*, **44**, 313 – 318 (1993).
6. K. Kamata, M. Hosokawa, T. Matsumoto, and T. Kobayashi, *J. Smooth. Muscle. Res.*, **42**(5), 159 – 170 (2006).
7. D. Lamontagne, A. König, E. Bassenge, and R. Busse, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20**, 652 – 657 (1992).
8. K. G. Lamping, J. Wess, Y. Cui, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1253 – 1258, (2004).
9. Y. Nasa, H. Kume, and S. Takeo, *Heart Vessels*, **12**, 179 – 191 (1997).
10. M. Niihashi, M. Esumi, Y. Kusumi, et al., *Angiology*, **51**, 295 – 300 (2000).
11. T. Obi, A. Kabeyama, and A. Nishio, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **53**(1), 226 – 231 (1994).
12. M. Saeed, J. Schmidli, M. Metz, and R. J. Bing, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **8**(2), 257 – 261 (1986).
13. J. H. Traverse, Y. L. Wang, R. Du, et al., *Circulation*, **101**(21), 2526 – 2531 (2000).
14. E. O. Vizioli, M. D. Spadin, F. M. Corrêa, et al., *J. Smooth. Muscle. Res.*, **41**(5), 271 – 281 (2005).
15. Z. Wang, H. Shi, and H. Wang., *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 395 – 408 (2004).

Поступила 15.11.07

CORONARY VASODILATATION INDUCED BY ACETYLCHOLINE IN THE ISOLATED HEARTS OF GUINEA PIG AND MICE: DIFFERENTIAL CONTRIBUTIONS OF NITRIC OXIDE AND POSTACYCLIN

V. I. Kozlovskii¹, P. Gwozdz², L. Drelicharz², 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 Cracow, Poland

We have studied the involvement of nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂) as well as muscarinic m₂ and m₃ receptors in the coronary vasodilatation induced by acetylcholine in the isolated hearts of guinea pig and mouse perfused according to the Langendorff method. In the guinea pig heart, a coronary vasodilator response to acetylcholine was profoundly decreased by the NO-synthase inhibitor L-N^G-nitroarginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴ M), while in the mouse heart this response was blocked by the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (5 × 10⁻⁶ M). In both cases, the muscarinic m₃ receptor antagonist 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine (4-DAMP, 3 × 10⁻⁸ M) blocked the acetylcholine-induced vasodilator response, while the muscarinic m₂ antagonist methoctramine (3 × 10⁻⁷ M) had no effect. It was concluded that the vasodilator effect of acetylcholine depends on NO in the coronary circulation of guinea pig and on PGI₂ in the coronary circulation of mouse. In both cases, the coronary vasodilatation induced by acetylcholine is mediated by muscarinic m₃ receptors.