

УДК 597.556.35:577.15

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РАЗВИТИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Раваева М.Ю., Чуян Е.Н., Древетняк Н.А.

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: mravaeva@ukr.net*

Методом лазерной доплеровской флоуметрии установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение белым беспородным крысам-самцам в течение 10 дней ингибитора фермента eNOS N-нитро-L-аргинин метилового эфира приводит к значительному снижению метаболической функции эндотелия, связанной с угнетением релизинга оксида азота, причем данный эффект возрастал с увеличением кратности применения блокатора. Комплекс изменений в микрогемодинамике, ассоциированных с NO-дефицитной эндотелиальной дисфункцией включает в себя ингибирование как осцилляторных, так и неосцилляторных показателей. Использование метода лазерной доплеровской флоуметрии позволяет проследить клеточные и системные компоненты патогенетической цепи эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: метод лазерной доплеровской флоуметрии, микрогемодинамика, блокатор N-нитро-L-аргинин, эндотелиальная дисфункция.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, сердечно-сосудистая система играет важнейшую роль в обеспечении нормального течения всех процессов жизнедеятельности организма. Между тем, значение сосудистой системы для функционирования организма во многом детерминировано наличием в стенках сосудов (кровеносных и лимфатических) – эндотелия, обладающего очень важными специфическими функциями.

Исследования последних 10-15 лет существенно изменили представление о роли эндотелия сосудов в общем гомеостазе. На уровне микроциркуляции эндотелий представляет собой необходимый барьер, с одной стороны, и форму связи крови и лимфы с интерстициальной жидкостью. На этом рубеже происходит обмен между кровью и тканями, опосредованный эндотелием и регулируемый им [1]. Оказалось, что эндотелий синтезирует огромное количество биологически активных веществ и наличие такой обширной эндокринной активности у эндотелия дало основание D. Antomucci, L.A. Fitzpatrick (1996) назвать его «эндокринным деревом». Эндокринная активность эндотелия зависит от его функционального состояния. В физиологических условиях он синтезирует главным образом факторы противосвертывания и вазодилататоры, что является основой для адекватного кровотока, особенно в сосудах микроциркуляции.

Секреторная функция эндотелия связана также с высвобождением эндотелиального релаксирующего фактора [2], позднее идентифицированного как оксид азота (NO). NO – это постоянный эндотелиальный регулятор сосудистого

тонуса, главный паракринный вазодилататор. Эта физиологически значимая молекула присутствует во всех типах эндотелия, а в интактном эндотелии в покое секретируется даже без дополнительных стимулов постоянно, участвуя в поддержании миогенного тонуса сосудов. NO является нейротрансмиттером, мощным фактором гемостаза, ингибирует агрегацию тромбоцитов, опосредует снижение деформационной способности эритроцитарных мембран [3].

При воздействии повреждающих агентов (механических, инфекционных, обменных, иммуннокомплексных и т.п.) резко меняется направление эндокринной активности эндотелия на противоположную: образуются вазоконстрикторы, коагулянты. Причем, при продолжительном действии повреждающих факторов развивается эндотелиальная дисфункция (ЭД), которая играет ключевую роль в патогенезе ряда системных патологий, таких как артериальная гипертензия, атеросклероз, инсульты, инфаркты и др. [2, 4, 5].

В связи с этим одной из актуальных задач современной физиологии и медицины является исследование механизмов развития ЭД. Однако эту задачу достаточно трудно реализовать методически, поскольку существует множество методов, позволяющих изучить особенности структуры и функционирования микроциркуляторного русла, которые при этом не позволяют выявить особенности регуляции микрокровотока.

Вместе с тем, в настоящее время в клиническую и экспериментальную практику внедряется новый неинвазивный метод исследования микроциркуляции – лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ), позволяющая не только оценить общий уровень периферической перфузии, но и выявить особенности регуляции микрокровотока [6]. Достоинством метода ЛДФ является его возможность измерения показателей микрокровотока *in vivo* и безконтактно, что очень важно для тестирования микрогемодинамики, которая изменяет свои показатели при любой попытке подключения датчиков к капиллярам [7]. Другой важной особенностью ЛДФ является возможность получения большого количества измерений (тысячи в минуту), их регистрации и обработки в реальном масштабе времени, что позволяет анализировать весь спектр ритмических процессов в микрососудах и выявить механизмы изменения регуляции микроциркуляции.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось выявление роли NO в механизмах развития эндотелиальной дисфункции методом ЛДФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы выполнена на 20 белых беспородных крысах-самцах массой 180-250 г, полученных из питомника научно-исследовательского института биологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. Все проведенные исследования проводились согласно международных принципов Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей», норм биомедицинской этики, Закону Украины «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Для эксперимента отбирали животных одинакового возраста, характеризующихся средней двигательной активностью и низкой эмоциональностью в тесте «открытого

поля», которые составляют большинство в популяции. Подобный отбор позволил сформировать однородные группы животных с одинаковыми конституциональными особенностями, однотипно реагирующих на действие различных факторов. После предварительного отбора животных разделили на 2 группы по 10 крыс в каждой. Животные первой группы являлись биологическим контролем (контроль) и находились в обычных условиях вивария, крысам второй экспериментальной группы ежедневно в течение 10-ти суток, внутривенно вводили блокатор NO-синтазы L-NAME производства Sigma LTD, USA в дозе 3 мг/кг (объем 0,2 мл).

Исследование изменений параметров микроциркуляции крови проводилось методом ЛДФ, подробно описанным в наших предыдущих исследованиях [8]. ЛДФ-метрию проводили на 1, 3, 5, 7 и на 10 сутки эксперимента через 30 мин после введения блокатора.

В качестве параметров, анализируемых методом ЛДФ, рассматривали неосцилляторные показатели базального кровотока: показатель перфузии (ПМ, перф. ед.), среднее квадратичное отклонение (флакс, СКО, перф. ед.), коэффициент вариации (Кв, %) [6, 7]. С помощью вейвлет-анализа ЛДФ-сигнала определяли амплитуды колебаний кровотока разных частотных диапазонов: эндотелиального (Аэ), нейрогенного (Ан), миогенного (Ам) ритмов, являющихся активными составляющими регуляции микрокровотока, непосредственно воздействующими на систему микроциркуляции, а также дыхательного (Ад) и пульсового (Ап) ритмов, являющихся факторами, действующими вне системы микроциркуляции [9].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета «STATISTICA – 8.0». Оценка достоверности межгрупповых различий оценивались с помощью U-теста Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования установлено, что после введения блокатора NO-синтазы L-NAME происходило значительное снижение как осцилляторных так и неосцилляторных показателей микроциркуляции, причем данный эффект возрастал с увеличением кратности применения блокатора (табл. 1, 2).

Сразу после однократного введения препарата и наиболее существенно (на 26 %; $p \leq 0,05$) снижались амплитуды эндотелиального генеза (Аэ) (см. табл. 1), которые синхронизированы с периодическим релизингом NO эндотелием сосудов [10]. Известно [5], что L-NAME является ингибитором фермента, катализирующего образование NO из аргинина, кислорода и NADPH — NOS (его конституционных форм – эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS)). При введении L-NAME в организм этот эфир гидролизуется эстеразами до активного ингибитора – L-NNA, который и блокирует фермент eNOS, что приводит к снижению выработки NO [5], что и привело к существенному снижению амплитуды эндотелиального ритма.

Однако после однократного введения блокатора уменьшалась амплитуды не только эндотелиальных колебаний, но и миогенных (Ам) на 20 % ($p \leq 0,05$) (см. табл. 1). Эти осцилляции обусловлены пейсмекерной активностью прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол [11] и отражают колебания концентрации ионов Ca^{2+} через мембраны мышечных клеток [11, 12].

Следовательно, снижение Ам свидетельствует о повышении тонуса прекапилляров, обусловленного нарушением кальциевого трансмембранного обмена.

Таблица 1.
Динамика осцилляторных показателей микроциркуляции у животных при введении блокатора L-NAME (M±m)

Сутки	группы	Аэ, перф.ед.	Ан, перф.ед.	Ам, перф.ед.	Ад, перф.ед.	Ап, перф.ед.
1 сутки	Контроль	10,72±0,45	12,8±0,21	15,6±0,21	12,22±0,23	8,25±0,18
	L-NAME	8,03±0,21 p≤0,05	11,6±1,3	12,6±0,8 p≤0,05	12,46±0,16	8,05±0,12
3 сутки	Контроль	10,31±0,24	13,1±0,2	15,23±0,21	12,25±0,21	8,45±0,25
	L-NAME	6,34±0,44 p≤0,05	9,89±0,23 p≤0,05	10,6±0,52 p≤0,05	12,95±0,42	7,86±0,1 p≤0,05
5 сутки	Контроль	10,07±0,22	12,98±0,21	15,33±0,23	12,20±0,34	8,30±0,15
	L-NAME	5,8±1,2 p≤0,05	9,2±1,25 p≤0,05	10,3±1,9 p≤0,05	13,15±1,15	7,65±0,42 p≤0,05
7 сутки	Контроль	10,23±0,58	12,5±0,3	15,21±0,2	12,3±0,2	8,22±0,18
	L-NAME	5,23±2,3 p≤0,05	8,25±1,4 p≤0,05	9,2±0,4 p≤0,05	13,45±1,45	7,37±0,23 p≤0,05
10 сутки	Контроль	10,78±0,21	13,1±0,35	16,6±0,2	12,25±0,3	8,4±0,3
	L-NAME	4,3±1,2 p≤0,05	7,68±1,4 p≤0,05	8,7±1,5 p≤0,05	13,7±1,7	7,16±0,34 p≤0,05

Примечание: p - достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой

Известно, что ионы кальция – обязательные участники мышечного сокращения сосудов. В физиологических условиях оксид азота, синтезируемый эндотелием, диффундирует в гладкомышечные сосудистые клетки, активирует гуанилатциклазу и увеличивает образование цГМФ. Высвобождение и накопление цГМФ приводит к активации фермента цГМФ-зависимой протеинкиназы [3]. Потенциальными мишенями для цГМФ-зависимой протеинкиназы (тип I) в сосудистых гладкомышечных клетках являются Ca²⁺-зависимые калиевые каналы и IRAG-белки, участвующие в моделировании входа внеклеточного кальция и высвобождения внутриклеточного кальция [13, 14]. Фосфорилирование этих двух белков снижает концентрацию цитозольного кальция, что ведет к расслаблению сосудов [15].

Исходя из этого можно заключить, что конечный эффект снижения секреции NO эндотелием в условиях блокирования активности NO-синтазы, является снижение активности цГМФ-зависимой протеинкиназы, которая снижает активность K_{Ca}²⁺-каналов, препятствуя их открытию, выходу ионов калия и кальция, что приводит к вазоконстрикции.

В целом, уменьшение Аэ и Ам - двух активных компонентов регуляции микроциркуляции свидетельствует об обеднении нутритивного микроуруса и снижении перфузии тканей, в пользу чего свидетельствует снижение базальных характеристик микрогемодинамики (табл. 2), таких как показатель

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РАЗВИТИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

микроциркуляции (ПМ) и модуляции микрокровотока (Кв), которые снизились относительно значений в контроле на 13 % ($p \leq 0,05$) и 18 % ($p \leq 0,05$) соответственно.

Таблица 2.
Динамика неосцилляторных показателей микроциркуляции у животных при введении блокатора L-NAME ($M \pm m$)

Сутки	группы	Параметр микроциркуляции, ПМ, перф.ед.	Уровень флакса, СКО, перф.ед.	Коэффициент вариации, Кв, %
1 сутки	Контроль	3,59±0,1	1,48±0,15	40,69±1,5
	L-NAME	2,95±0,1 $p \leq 0,05$	1,2±0,3	35,63±3,1 $p \leq 0,05$
3 сутки	Контроль	3,54±0,15	1,52±0,21	40,85±1,62
	L-NAME	2,83±0,21 $p \leq 0,05$	1,15±0,45 $p \leq 0,05$	34,2±3,6 $p \leq 0,05$
5 сутки	Контроль	3,58±0,23	1,49±0,23	41,1±1,65
	L-NAME	2,56±0,45 $p \leq 0,05$	1,08±0,5 $p \leq 0,05$	32,73±3,68 $p \leq 0,05$
7 сутки	Контроль	3,57±0,2	1,47±0,15	40,52±2,65
	L-NAME	2,43±0,4 $p \leq 0,05$	1,02±0,13 $p \leq 0,05$	29,68±2,74 $p \leq 0,05$
10 сутки	Контроль	3,51±0,19	1,40±0,17	40,95±2,82
	L-NAME	2,25±0,35 $p \leq 0,05$	0,95±0,12 $p \leq 0,05$	30,5±3,8 $p \leq 0,05$

Примечание как в табл. 1.

Таким образом, однократное блокирование синтеза оксида азота привело к существенному нарушению практически всех факторов, участвующих в регуляции микрогемодинамики.

Увеличение кратности применения блокатора привело к прогрессирующему уменьшению кровотока в тканях, причем снижение значений данных показателей носило линейный характер.

После трехкратного применения блокатора на фоне снижения A_α и A_m происходило снижение A_n на 24 % ($p \leq 0,05$). Поскольку известно [6, 16], что нейрогенные колебания связаны с симпатическими адренергическими влияниями на гладкие мышцы артериол и артериоларных участков артерио-венулярных анастомозов, то можно предположить, что введение блокатора привело к увеличению активности симпатических адренергических вазомоторов, и, как следствие, развитие симпатической вазоконстрикции.

Известна роль NO как фактора, ограничивающего активность симпатико-адреналовой системы [17-19], подавляя высвобождение катехоламинов из

пресинаптических мембран [20]. Эффективность этого процесса может повышаться за счет того, что NO высвобождается из тех же самых симпатических нервных окончаний. Способность NO ограничивать периферический выброс катехоламинов находит свое подтверждение в исследованиях [21-22], где показано, что ингибирование синтеза NO приводит к выраженной активации симпатической нервной системы и стойкой гипертонии.

Об активации симпатической нервной системы в условиях ограничения синтеза оксида азота свидетельствуют и результаты настоящего исследования. Так, на фоне ингибирования активных компонентов регуляции микроциркуляции происходит уменьшение активности и внесосудистого фактора, а именно амплитуд пульсовой волны (Ап), что отражает снижение притока крови в микрососудистое русло вследствие увеличения нейрогенной активности (симпатической составляющей). Можно предположить, что уменьшение Ап связано, с одной стороны, с развитием симпатической вазоконстрикции приносящих сосудов крупного, среднего и мелкого калибров, а, с другой – с изменением сократимости самого сердца, поскольку известно, что оксид азота может оказывать прямое влияние на сократимость миокарда: от тонкой регуляции электромеханического сопряжения до модуляции вегетативного влияния на пре- и постсинаптическом уровне [14, 23, 24], обеспечивающих сократимость миокарда и функцию синусового и атриовентрикулярного узлов сердца [24, 25].

Таким образом, трехкратное введение блокатора привело к нарушению практически всех регуляторных механизмов поддержания микрогемодинамики.

Дальнейшее применение L-NAME способствовало еще более существенному ингибированию данных показателей, максимальное снижение которых наблюдалось после 10-тикратного введения (табл. 1, 2). Так, неосцилляторные показатели микроциркуляции, такие как ПМ, СКО и Кв снижались относительно значений этих показателей у животных контрольной группы на 36 % ($p \leq 0,05$), 33 % ($p \leq 0,05$) и 26% ($p \leq 0,05$) соответственно. Так же снижались и осцилляторные показатели: Аэ – на 61 % ($p \leq 0,05$), Ан – на 42 % ($p \leq 0,05$) и Ам – на 48 % ($p \leq 0,05$) и Ап — на 14 % ($p \leq 0,05$).

Таким образом, результатом 10-тикратного введения блокатора NO-синтазы L-NAME является снижение как осцилляторных, так и неосцилляторных показателей микроциркуляции, причем, наиболее существенной депрессии были подвержены эндотелиальные ритмы, что отражало значительное уменьшение базальной вазодилатирующей активности эндотелия микрососудов и развитие ЭД, сопровождающееся развитием вазоконстрикции, уменьшением числа функционирующих капилляров и обеднением нутритивного микрокровотока.

Как показали результаты настоящего исследования, ЭД в условиях блокады NO-синтазы в первую очередь затрагивала артериальную часть микроциркуляторного русла, в то время как показатели венозного оттока (Ад) оказались резистивными к данному патологическому процессу. Объяснением этого могут служить исследования [26], которые показали, что у пациентов с гипертонической болезнью ремоделирование артериальной части микроциркуляторного русла обусловлено нарушениями функционирования эндотелия сосудов, в то время как на ремоделирование венозного отдела

микроциркуляторного русла преимущественное влияние оказывает степень выраженности артериальной гипертонии.

Таким образом, ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 10 дней животным ингибитора фермента eNOS N-нитро-L-аргинин метилового эфира вызывает комплекс изменений в микрогемодинамике, ассоциированных с NO-дефицитной эндотелиальной дисфункцией. Использование метода ЛДФ позволило нам проследить патогенетическую цепь развития ЭД, начальным звеном которой является снижение секретирующей NO функции эндотелия и включающей все факторы регуляции микрогемодинамики клеточного и системного уровней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 10 дней животным ингибитора фермента eNOS N-нитро-L-аргинин метилового эфира приводит к значительному снижению метаболической функции эндотелия, связанной с угнетением релизинга оксида азота.
2. Комплекс изменений в микрогемодинамике, ассоциированных с NO-дефицитной эндотелиальной дисфункцией включает в себя ингибирование как осцилляторных (эндотелиальных на 61 % ($p \leq 0,05$), нейрогенных на 42 % ($p \leq 0,05$), миогенных на 48 % ($p \leq 0,05$), пульсовых на 14 % ($p \leq 0,05$)), так и неосцилляторных (ПМ на 36 % ($p \leq 0,05$), СКО на 33 % ($p \leq 0,05$), Кв на 26% ($p \leq 0,05$)) показателей.
3. Использование метода лазерной доплеровской флоуметрии позволяет проследить клеточные и системные компоненты патогенетической цепи эндотелиальной дисфункции.

Список литературы

1. Куприянов В. В.. Микроциркуляторное русло / В. В. Куприянов, Я. Л. Караганов, В. И. Козлов. – М.: Медицина, 1975. – 216 с.
2. Furchgott R.E., Ignarro L.S., Murad F. Nitric oxide as a signaling molecule in the cardiovascular system. // Press Release: The 1998 Nobel Prize in Physiology of Medicine. - Webmaster.
3. Ванин А.Ф., 1998 Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы - две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – Т. 63, Вып.7. – С. 924-928.
4. Balligand J.J. Control of cardiac muscle function by endogenous nitric oxide signalling system / J.J. Balligand, R.A. Kelfy, P.A. Matsden. et al. // — Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – V.90. – P. 347-351.
5. Малыхин В.А. Исследование эндотелиопротективных свойств L-аргинина и его комбинаций с амлодипином и индапамидом: Автореф. дис.... Канд.мед. наук: 14.00.25/ Курск. –2009. –20 с.
6. Крупаткин А.И. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови / А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров. – М. : Медицина, 2005. – 254 с.
7. Козлов В.И. Лазерная доплеровская флоуметрия и анализ коллективных процессов в системе микроциркуляции / В.И. Козлов, Л.В. Корси, В.Г. Соколов // Физиология человека. –1998. – Т. 24. – №6. – С.112.
8. Типологические особенности микроциркуляции животных / Е.Н. Чуян, Н.А. Древетняк, О.Д. Богданова, М.Ю. Раваева, Н.С. Трибрат // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия «Биология, химия». – 2012. – Том 25 (64), № 3. – С. 222-239.

9. Hoffman U. The frequency histogram – A new method for the evaluation of Laser Doppler Flux Motion/ U. Hoffman, A. Yanar, A. Bolinger // *Microvascul. Res.* – 1990. – Vol. 40. – P. 293–301.
10. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandins / P. Kvandal, A. Stefanovska, M. Veber [et al.] // *Microvascular Research.* – 2003. – № 65. – P. 160-171.
11. Stefanovska A. Physics of the human cardiovascular system / A. Stefanovska, M. Bracic // *Contemporary Physics.* – 1999. – V. 40, №1. – P.31-35.
12. Маколкин В.И. Метод лазерной доплеровской флоуметрии в кардиологии / В.И. Маколкин, В.В. Бранько, С.А. Богданова. // Пособие для врачей. – М.: Россельхозакадемия. – 1999. – 48 с.
13. Грибкова И.В., Шуберт Р., Серебряков В.П. NO активирует Ca²⁺ - активируемый K⁺ ток гладкомышечных клеток хвостовой артерии крысы через GMP - зависимый механизм // *Кардиология.* – 2002. – №8. – С.34-37.
14. Nitric oxide/dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes / J.L. Balligand, L. Kobzik, X. Han [et al.] // *J.Biol. Chem.* – 1995. – V.270. No24. – P.14582-14586.
15. Cyclic GMP - dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine / M. Fukao, H.S. Mason, F.C. Britton [et al.] // *Biol. Chem.* – 1999. – V.274. – P.10927-10935.
16. Synergetic interpretation of patterned vasomotor activity in microvascular perfusion: discrete effects of myogenic and neurogenic vasoconstriction as well as arterial and venous pressure fluctuations / H. Schmid – Schonbein, S. Ziege, R. Grebe [et al.] // *Int. J. Microcir.* – 1997. – № 17. – P. 346-359.
17. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов / Г.Н. Крыжановский – М.: Медицина, 2002. – 631 с.
18. Мацко М.А. Соотношение некоторых медиаторов стрессреализующих и стресслимитирующих систем в остром периоде ишемического инсульта / М.А. Мацко // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2004. – № 4. – С. 14-16.
19. Cytokines: Stress and Immunity / N.P. Plotnikoff, R.E. Faith, A.G. Murgo [et al.]. – Boca Raton: CRC Press. 2nd Edition, 2006. – 405 p.
20. Do corticosteroids damage the brain? / [Herbert J., Goodyer I.M., Grossman A.B., Hastings M.H., de Cloet E.R., Lightman S.L., Lupien S.J., Roozendaal B., Seck J.R.] // *Journal of Neuroendocrinology.* – 2006. – Vol. 18. – P. 393-411.
21. Гельцер Б.И. Комплексная оценка вазомоторной функции сосудистого эндотелия у больных артериальной гипертензией / Б.И. Гельцер, С.В. Савченко, В.Н. Котельников // *Кардиология.* – 2004. – Т.4. – С.24-27.
22. Лямина Л.П. Оксид азота и артериальная гипертензия / Н.П. Лямина, В.Н. Сенчихин // *Международ.мед.журн.* – 2002. – №1-2. – С.218-224.
23. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system / J.L. Balligand, R.A. Kelly, P.A. Marsden [et. al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1993. – V. 90. No1. – P. 347-351.
24. Bers D.M. Excitation/contraction, coupling and cardiac contractile force. / Bers D.M. – Dordrecht (The Netherlands), Kluwer Academic Publishers, 2001.– 427 p.
25. Гогин Е.Е. Варианты нестабильной стенокардии в свете современных представлений о механизмах повреждения эндотелия / Е.Е. Гогин, А.К. Груздев, И.А. Лазарев и др. // *Тер. архив.* – 2009. – № 4. – С. 21–28.
26. Спосіб діагностики порушень ендотеліальзовмвленої дилатації артеріальних судин / С.М. Поливода, В.І. Кривенко, О.О. Черепок, Б.Б. Самура // *Промислова власність.* – 2001. – № 1. – С. 38.24

Равасва М.Ю. Роль оксиду азоту в розвитку ендотеліальної дисфункції // М.Ю. Равасва, О.М. Чуян, Н.А. Древетняк // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 147-157.

Методом лазерної доплерівської флоуметрії на 20-ти білих безпородних щурах-самцях досліджувалася роль оксиду азоту в розвитку ендотеліальної дисфункції. Встановлено, що щоденне внутрішньоочеревинне введення протягом 10 днів тваринам інгібітора ферменту eNOS N-нітро-L-аргінін метилового ефіру призводить до значного зниження метаболічної функції ендотелію, пов'язаної

з пригніченням релізингу оксиду азоту , причому даний ефект зростав із збільшенням кратності застосування блокатора. Комплекс змін у мікрогемодинаміки, асоційованих з NO-дефіцитної ендотеліальної дисфункцією включає в себе інгібування як осциляторних, так і неосциляторних показників. Використання методу лазерної доплерівської флоуметрії дозволяє простежити клітинні і системні компоненти патогенетичного ланцюга ендотеліальної дисфункції.

Ключові слова: метод лазерної доплерівської флоуметрії, мікрогемодинаміка, блокатор N-нітро-L-аргінін, ендотеліальна дисфункція.

ROLE IN THE DEVELOPMENT OF NITROGEN OXIDE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

Ravaeva M.Y., Chuyan E.N., Drevetnyak N.A.

Taurida National V. I. Vernadsky University, Simferopol, Ukraine

E-mail: mravaeva@ukr.net

It is shown that after a single administration of the drug , and most significantly (by 26 %; $p \leq 0,05$) decreased the amplitude of endothelial origin (Ae) which are synchronized with the periodic releasing NO by the endothelium of blood vessels, indicating that reducing endothelial NO production .

However, after a single administration of the blocker is not only decreased the amplitude of the oscillations endothelial but myogenic (Am) by 20 % ($p \leq 0,05$), which indicates an increase precapillaries tone due to violation of transmembrane calcium metabolism.

The general reduction Ae and Am - two active components regulation of microcirculation indicates decrease nutritional microvascular and reducing tissue perfusion , which testifies in favor of reduction of basal characteristics microhemodynamics such as microcirculation index (PM) modulation and microcirculation (Sq), which decreased relative to values in the control 13 % ($p \leq 0,05$) and 18 % ($p \leq 0,05$) , respectively.

The increase in the use of blocker led to a progressive decrease in blood flow to the tissues, and decrease the values of these parameters were of linear character. So, after three application blocker amid falling Ae and Am there was a decrease of amplitudes of neurogenic origin (An) 24 % ($p \leq 0,05$), reflecting the increased activity of the sympathetic adrenergic vasomotors, and as a consequence , the development of the sympathetic vasoconstriction when administered blocker. On the background of inhibition of the active components of the regulation of microcirculation caused a decrease of activity and extravascular factors, namely the amplitude of the pulse wave (Ap), reflecting the decrease in blood flow in the microvasculature due to increased neurogenic activity (sympathetic component) .

Thus, the three-dose blocker led to a violation of almost all regulatory mechanisms maintain microhemodynamics.

Further application of L-NAME promoted even more significant inhibition of these parameters, the maximum reduction was observed that after 10 days with administration. So nonoscillation microcirculation, such as PM, and RMS Sq decreased relative values of these parameters in the control group by 36 % ($p \leq 0,05$), 33 % ($p \leq 0,05$) and 26 % ($p \leq 0$

, 05), respectively. Just declined and oscillator indicators: Ae - by 61 % ($p \leq 0,05$), An - 42 % ($p \leq 0,05$) and Am - by 48 % ($p \leq 0,05$) and Ap - 14 % ($p \leq 0,05$).

Therefore, the daily intraperitoneal injection for 10 days the animals enzyme inhibitor eNOS N-nitro -L-arginine methyl ester leads to a significant reduction of the metabolic function of the endothelium associated with inhibition of releasing nitric oxide. Complex microhemodynamics changes associated with NO-deficient endothelium dysfunction includes both inhibition oscillator (endothelial, neurogenic, myogenic, pulse) and nonoscillation (PM, standard deviation, and Sq) indicators. The use of laser Doppler flowmetry allows us to trace the cell and system components pathogenetic chain of endothelial dysfunction.

Keywords: method of laser Doppler flowmetry, microhemodynamic, N-nitro-L-arginine, endothelial dysfunction.

References

1. Kupriyanov V. V.. Mikrotsirkulyatornoye ruslo (Moskva, Meditsina, 1975).
2. Furchgott R.E., Ignorie L.S., Murad F. Nitric oxide as a signaling molecule in the cardiovascular system. // Press Release: The 1998 Nobel Prize in Physiology of Medicine. - Webmaster.
3. Vanin A.F. Dinitrozil'nyye komplekсы zheleza i S-nitrozotiol'y - dve vozmozhnyye formy stabilizatsii i transporta oksida azota v biosistemakh, *Biokhimiya*, **63** (7), 924 (1998).
4. Balligand J.J., Control of cardiac muscle function by endogenous nitric oxide signalling system, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **90**, 347 (1993).
5. Malykhin V.A. Issledovaniye endotelioprotektivnykh svoystv L-arginina i yego kombinatsiy s amlodipinom i indapamidom: Avtoref. dis.... Kand.med.nauk: 14.00.25/ Kursk. (2009).
6. Krupatkin A.I., Lazernaya dopplerovskaya floumetriya mikrotsirkulyatsii krovi (Moskva, Meditsina, 2005).
7. Kozlov V.I., Korsi L.V., Sokolov V.G. Lazernaya dopplerovskaya floumetriya i analiz kollektivnykh protsessov v sisteme mikrotsirkulyatsii, *Fiziologiya cheloveka*, **24** (6) (1998).
8. Chuyan Ye.N., Drevetnyak N.A., Bogdanova O.D., Ravayeva M.YU., Tribat N.S. Tipologicheskiye osobennosti mikrotsirkulyatsii zhivotnykh, *Uchenyye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo Seriya «Biologiya, khimiya»*, **25** (64), 222 (2012).
9. Hoffman U., Yanar A., Bolinger A. The frequency histogram – A new method for the evaluation of Laser Doppler Flux Motion, *Microvascul. Res.* **40**, 293 (1990).
10. Kvandal P., Stefanovska A., Veber M. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandines *Microvascular Research.*, **65**, 160 (2003).
11. Stefanovska A. Bracic M., Physics of the human cardiovascular system *Contemporary Physics.*, **40** (1), 31 (1999).
12. Makolkin V.I. Bran'ko V.V., Bogdanova Ê.A. *Metod lazernoy dopplerovskoy floumetrii v kardiologii. Posobiye dlya vrachey*, (Moskva, Rossel'khozakademiya, 1999).
13. Gribkova I.V., Shubert R., Serebryakov V.P., NO aktiviruyet Ca^{2+} - aktiviruyemyy K^+ tok gladkomyshechnykh kletok khvostovoy arterii krysy cherez GMP - zavisimyy mekhanizm, *Kardiologiya*, **8**, 34 (2002).
14. Balligand J.L., Kobzik L., Han X. Nitric oxide/dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes, *J.Biol. Chem.* **270** (24), 14582 (1995).
15. Fukao M., Mason H.S., Britton F.C. Cyclic GMP - dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine, *Biol. Chem.* **274**, 10927 (1999).

16. Schmid – Schonbein H., Ziege S., Grebe R. Synergetic interpretation of patterned vasomotor activity in microvascular perfusion: discrete effects of myogenic and neurogenic vasoconstriction as well as arterial and venous pressure fluctuations, *Int. J. Microcir.* **17**, 346 (1997).
17. Kryzhanovskiy G.N. Dizregulyatsionnaya patologiya: Rukovodstvo dlya vrachey i biologov (Moskva, Meditsina, 2002).
18. Matsko M.A. Sootnosheniye nekotorykh mediatorov stressrealizuyushchikh i stresslimitiruyushchikh sistem v ostrom periode ishemicheskogo insulta, *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* **4**, 14 (2004).
19. Plotnikoff N.P., Faith R.E., Murgu A.G. Cytokines: Stress and Immunity (Boca Raton: CRC Press. 2nd Edition, 2006).
20. Herbert J., Goodyer I.M., Grossman A.B., Hastings M.H., de Cloet E.R., Lightman S.L., Lupien S.J., Roozendaal B., Seck J.R. Do corticosteroids damage the brain?, *Journal of Neuroendocrinology*, **18**, 393 (2006).
21. Gel'tser B.I. Savchenko S.V., Kotel'nikov V.N. Kompleksnaya otsenka vazomotornoy funktsii sosudistogo endoteliya u bol'nykh arterial'noy gipertenziyey, *Kardiologiya*, **4**, 24 (2004).
22. Lyamina L.P., Senchikhin V.N., Oksid azota i arterial'naya gipertenziya *Mezhdunar.med.zhurn.*, **1-2**, 218 (2002).
23. Balligand J.L., Kelly R.A., Marsden P.A. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90** (1), 347 (1993).
24. Bers D.M. Excitation/contraction, coupling and cardiac contractile force (Dordrecht (The Netherlands), Kluwer Academic Publishers, 2001).
25. Gogin Ye.Ye., Gruzdev K., Lazarev I.A. Varianty nestabil'noy stenokardii v svete sovremennykh predstavleniy o mekhanizмах povrezhdeniya endoteliya, *Ter. arkhiv.* **4**, 21 (2009).
26. Polivoda S.M., Krivenko V.Í., Cherepok O.O., Samura B.B. Sposób díagnostiki porushen' yendotelíyuzumvlenoí dilatatsíí arterial'nikh sudin *Promislova vlasníst'*, **1**, 38 (2001).

Поступила в редакцию 25.11.2013 г.