



УДК 57.017.647; 612.133; 616.053

EDN FVMZMV

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-367-377>

Особенности механизмов NO-опосредованной дилатации пиальных артерий на воздействие ацетилхолина у стареющих крыс

О. П. Горшкова^{✉1}

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторе

Оксана Петровна Горшкова, SPIN-код: 6372-0076, Scopus AuthorID: 24491430500, ResearcherID: J-4850-2018, ORCID: 0000-0002-8026-6161, e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Для цитирования: Горшкова, О. П. (2022) Особенности механизмов NO-опосредованной дилатации пиальных артерий на воздействие ацетилхолина у стареющих крыс. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 367–377. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-367-377> EDN FVMZMV

Получена 27 июня 2022; прошла рецензирование 24 сентября 2022; принята 25 сентября 2022.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

Права: © О. П. Горшкова (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Аннотация. Изучали возрастные изменения роли NO, синтезируемого различными формами синтаз оксида азота (NOS), и экзогенного L-аргинина в ацетилхолин-опосредованной дилатации сосудов головного мозга у крыс. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки проведена сравнительная оценка реакций пиальных артерий различных диаметров на воздействие ацетилхолин хлорида (АХ, 10^{-7} М, 8 мин) в отсутствие и на фоне блокады NOS и воздействия экзогенного L-аргинина (0,25 мМ, 30 мин) у крыс Sprague-Dawley в возрасте 4 и 18 месяцев. Блокаду NOS производили путем применения неселективного ингибитора NOS (L-NAME, 10^{-3} М, 12 мин) и ингибитора индуцибельной NOS (аминогуанидин, 1 мМ, 10 мин). Оценивали изменение числа и степени дилатации артерий, измеряя ширину потока эритроцитов в трех отдельных группах артерий: мелких (диаметр менее 20 мкм), средних (20–40 мкм) и крупных (более 40 мкм). Установлено, что к 18 месяцам у крыс снижается роль NO, синтезируемого конститутивными формами NOS, в осуществлении АХ-опосредованных эндотелий-зависимых дилататорных реакций пиальных артерий мелких и средних диаметров и усиливается роль данного механизма в дилатации крупных пиальных артерий. Одновременно повышается роль индуцибельной NOS в дилатации артерий всех исследованных диаметров. Эти процессы сопровождаются снижением биодоступности экзогенного L-аргинина для NOS.

Ключевые слова: старение, эндотелиальная дисфункция, пиальные сосуды, NO-опосредованная дилатация, синтазы оксида азота

Mechanism of NO-mediated dilation of pial arteries in response to acetylcholine in aging rats

O. P. Gorshkova ¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Author

Oksana P. Gorshkova, SPIN: 6372-0076, Scopus AuthorID: 24491430500, ResearcherID: J-4850-2018, ORCID: 0000-0002-8026-6161, e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

For citation: Gorshkova, O. P. (2022) Mechanism of NO-mediated dilation of pial arteries in response to acetylcholine in aging rats. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 367–377. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-367-377> EDN FVMZMV

Received 27 June 2022; reviewed 24 September 2022; accepted 25 September 2022.

Funding: This study was supported by Government Program of the Russian Federation 47 GP “Scientific and Technological Development of the Russian Federation” (2019–2030), No. 0134-2019-0001.

Copyright: © O. P. Gorshkova (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. The article reports the results of the study focusing on age-related changes in the contribution of NO, synthesized by various forms of nitric oxide synthases (NOS) and exogenous L-arginine in acetylcholine-induced dilation of cerebral vessels in rats. A comparative assessment of the responses of pial arteries of various diameters to acetylcholine chloride (ACh, 10^{-7} M, 8 min) was carried in the absence and in the presence of NOS blockade and exogenous L-arginine (0.25 mM, 30 min) in Sprague-Dawley rats aged 4 and 18 months. NOS blockade was performed by using a non-selective NOS inhibitor (L-NAME, 10^{-3} M, 12 min) and an inducible NOS inhibitor (aminoguanidine, 1 mM, 10 min). The change in the number and degree of arterial dilation was assessed by measuring the width of the erythrocyte flow in three separate groups of arteries: small (<20 μ m in diameter), medium (20–40 μ m), and large (>40 μ m). It was found that in 18-month-old rats, the contribution of NO, synthesized by constitutive forms of NOS, decreases in the implementation of ACh-mediated endothelium-dependent dilatatory reactions in small and medium pial arteries, while an increase was observed for pial. At the same time, the contribution of inducible NOS to dilation of all types of arteries is on the increase. These processes are accompanied by a decrease in the bioavailability of exogenous L-arginine for NOS.

Keywords: aging, endothelial dysfunction, pial vessels, NO-mediated dilation, nitric oxide synthases

Введение

Церебро-васкулярные заболевания являются ведущими причинами смертности и инвалидизации населения (Cuadrado-Godia et al. 2018). Эпидемиологические исследования однозначно показывают (Arvanitakis et al. 2016; Ungvari et al. 2018; Xu et al. 2022), что доминирующим фактором риска их развития является возраст. Механизмы, которые инициируют изменения в стареющей сосудистой сети, в настоящее время находятся в центре внимания все большего количества исследователей. Важным модулятором связанных с возрастом сосудистых изменений признана дисфункция сосудистого эндотелия (Cuadrado-Godia et al. 2018; Xu et al. 2022). Основные клеточные и молекулярные механизмы развития эндотелиальной дисфункции в стареющем организме до конца не выяснены. Одним из основных ее проявлений является снижение реакции сосудов на сосудорасширяющие агенты и, в частности, на ацетилхолин (АХ). Снижение

эндотелий-зависимой вазодилатации при старении во многом связывают с нарушением NO-опосредованной регуляции сосудистых реакций, в основе которого лежит изменение уровня и/или снижение биодоступности NO (Mistry et al. 2002; Sindler et al. 2009). Ограниченная биодоступность NO может быть опосредована изменением активности синтаз оксида азота (NOS) (Luiking et al. 2012; Mistry et al. 2002; Sindler et al. 2009). В настоящее время выделяют три изоформы NOS (Fujii et al. 2016; Gambardella et al. 2020; Pozhilova, Novikov 2015). Две конститутивных (нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS)), которые постоянно присутствуют в соответствующих клетках, и третья индуцибельная (iNOS), которая синтезируется в ответ на определенное внешнее воздействие на клетку. В норме в эндотелии сосудов головного мозга NO преимущественно генерируется при участии eNOS (Cernadas et al. 1998; de Silva, Faraci 2020). Однако в кровеносных сосудах стареющих животных была показана способ-

ность продуцировать NO и в присутствии другой изоформы NOS — индуцибельной (Cernadas et al. 1998; Fujii et al. 2016). В то время как активация eNOS генерирует небольшие количества NO в течение коротких периодов времени, стимуляция iNOS приводит к замедленному и длительному высвобождению больших количеств NO. Некоторые экспериментальные работы показали, что активность eNOS заметно ингибируется самим NO, тогда как активность iNOS в меньшей степени зависит от концентрации NO (Cau et al. 2012; Cernadas et al. 1998). Поэтому NO, высвобождаемый в больших количествах при участии iNOS, может быть вовлечен в снижение активности eNOS и нарушение NO-опосредованной вазодилатации при старении. Важным фактором возрастного снижения активности eNOS может быть также изменение в системе L-аргинин/NO. L-аргинин — аминокислота, которая в эндотелии сосудов метаболизируется синтазой оксида азота с образованием NO и L-цитрулина (Bierhansl et al. 2017; Mazlan et al. 2017; Morris 2007; Shin et al. 2011). Недостаточное снабжение L-аргинином может приводить к снижению выработки NO, увеличению генерации супероксида эндотелиальной NOS и развитию эндотелиальной дисфункции (Berkowitz et al. 2003; Katusic 2007; Santhanam et al. 2008).

Считается, что относительный вклад дисрегулирующих механизмов в сосудистую патологию при старении может быть видозависимым. Кроме того, возрастные изменения вклада различных механизмов в регуляцию сосудистых реакций могут варьировать в зависимости от сосудистого русла и размера сосудов (de Silva, Faraci 2020; Santhanam et al. 2008). В данной работе изучали возрастные изменения роли NO, синтезируемого различными формами синтаз оксида азота, и экзогенного L-аргинина в AX-опосредованной дилатации сосудов головного мозга у крыс. В задачи исследования входило сравнение реакций пиальных артерий различных диаметров на воздействие AX в отсутствие и на фоне блокады конститутивных и индуцибельной форм NOS и введения экзогенного L-аргинина у крыс в возрасте 4 и 18 месяцев.

Методика

Эксперименты проведены на самцах крыс *Sprague-Dawley* из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем»

(Санкт-Петербург) в возрасте 4 (n = 27, массой 290 ± 60 г) и 18 месяцев (n = 29, массой 450 ± 70 г). Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и требованиям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Хирургическая подготовка животных

Крыс наркотизировали зоветилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). Для обеспечения свободного дыхания животному устанавливали трахеостому. В правую бедренную артерию вводили катетер, заполненный гепаринизированным физиологическим раствором (50 ед/мл). Голову животного фиксировали в горизонтальном положении. В теменной области черепа высверливали отверстие (S ≈ 1 см²), твердую мозговую оболочку в пределах которого удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Температуру тела животного поддерживали на уровне +37 °С.

Регистрация артериального давления

На протяжении всего эксперимента у животных проводили прямое измерение артериального давления (АД) через катетер в бедренной артерии. Катетер соединяли с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к АЦП, входящему в состав микроконтроллера фирмы STMicroelectronics (США), выход которого был подключен к компьютеру через порт USB. Для работы устройства с компьютером была разработана оригинальная программа визуализации значений АД. Расчет среднего АД в реальном времени производили с помощью программы по классической формуле:

$$P_{cp} = P_A + 1/3 (P_c - P_A),$$

где P_{cp} — среднее артериальное давление (мм рт. ст.), P_c — систолическое давление (мм рт. ст.), P_A — диастолическое давление (мм рт. ст.).

В течение всего эксперимента показатели среднего АД оставались примерно на одном уровне и у крыс в возрасте 4 месяцев составляли 138 ± 5 мм рт. ст., а в возрасте 18 месяцев — 143 ± 4 мм рт. ст.

Прижизненная микротомосъемка сосудов

Пиальные артерии визуализировали через отверстие в теменной области черепа с помощью оригинальной установки, включающей стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM («Микромед», Россия), цветную камеру-видеоокуляр для микроскопа Basler acA 4600 – 10uc (Германия) и персональный компьютер. При регистрации фоновых значений поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120,4; KCl 5,9; NaHCO₃ 15,5; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 2,5; NaH₂PO₄ 1,2; глюкоза 11,5; pH 7,4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержали в водяном термостате (ТW-2, SIA «ELMI», Латвия) при температуре +37 °С.

Экспериментальный протокол

У всех крыс исследовали реакцию пиальных артерий на орошение поверхности головного мозга раствором АХ (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich, 10⁻⁷ М, 8 мин). После воздействия АХ поверхность головного мозга в течение 15 мин отмывали раствором Кребса. Этого времени было достаточно для полной отмывки и достижения исходных значений размеров исследуемых сосудов. Индуцированную АХ дилатацию считали базовой реакцией (100% дилатаций), и с ней сравнивали результаты, полученные при дальнейшем исследовании. Изучение роли NOS и L-аргинин/NO-опосредованной системы в дилатации пиальных артерий на воздействие АХ проводили в отдельных сериях эксперимента.

Оценка роли NOS в АХ-опосредованной дилатации

У крыс в возрасте 4 (n = 8) и 18 (n = 10) месяцев после воздействия АХ и отмывки раствором Кребса проводили орошение поверхности головного мозга раствором неселективного блокатора NOS метилового эфира нитро-L-аргинина (L-NAME, ICN Biomed. Inc, 10⁻³ М) в течение 12 мин с последующим добавлением АХ (8 мин) в раствор блокатора. Сравнивали реакции артерий на АХ до и на фоне применения L-NAME.

Оценка роли iNOS в АХ-опосредованной дилатации

У крыс в возрасте 4 (n = 7) и 18 (n = 7) месяцев после воздействия АХ и отмывки раствором Кребса проводили орошение поверхности мозга раствором селективного блокатора iNOS амингуанидина (AG) (ICN Biomed. Inc, 1 мМ) в течение 10 мин с последующим добавлением

АХ (8 мин) в раствор блокатора. Сравнивали реакции пиальных артерий на воздействие АХ до и на фоне применения АГ.

Исследование роли L-аргинин/NO-опосредованной системы в дилатации в ответ на воздействие АХ

У крыс в возрасте 4 (n = 7) и 18 (n = 6) месяцев исследовали влияние экзогенного L-аргинина на характер АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных артерий. Сравнивали реакции артерий на АХ до и после воздействия раствора L-аргинина (ICN Biomed. Inc, 0,25 мМ, 30 мин (Xiong et al. 2014)).

Отдельно у крыс в возрасте 4 (n = 5) и 18 (n = 6) месяцев исследовали АХ-опосредованные реакции сосудов, подвергнутых воздействию L-аргинина, на фоне предварительного применения блокатора iNOS. После воздействия АХ и отмывки раствором Кребса проводили орошение поверхности мозга раствором АГ в течение 10 мин с последующим последовательным добавлением L-аргинина (30 мин) и АХ (8 мин) в раствор блокатора.

Измерения и оценка реакции сосудов

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях с помощью компьютерной программы для фотометрии «Blood Vessel Media Analyzer» (© Denis Chouvaev, Швеция). В программе предусмотрены режимы увеличения и контрастирования изображения и калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. С использованием программы измеряли ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Изменение вклада исследуемых механизмов в дилатацию оценивали путем сравнения числа дилатированных артерий и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокаторов и L-аргинина.

Изменение количества расширившихся и сузившихся артерий на воздействие выражали в процентах относительно общего числа исследованных артерий в группе. Степень дилатации ΔD оценивали как разность между значениями диаметра после (D2) и до (D1) воздействия АХ относительно диаметра сосуда D1 перед воздействием АХ, %:

$$\Delta D = (D_2 - D_1) / D_1 \times 100$$

Изменения диаметра в покое не превышали 5,0 ± 0,5%, поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

Проведено измерение 898 участков пиальных артерий диаметром от 9 до 78 мкм у крыс в возрасте 4 месяцев и 864 участков — у 18-месячных крыс (диаметр от 10 до 63 мкм). У каждой крысы было измерено от 30 до 65 участков сосудов. В литературе имеются сведения о том, что возрастные изменения вклада NO-опосредованных механизмов в регуляцию сосудистых реакций могут варьировать в зависимости от размера сосуда в исследуемом сосудистом русле (Santhanam et al. 2008). Поэтому для последующего анализа измеренные участки сосудов были разделены на группы в соответствии с их диаметрами: мелкие (диаметром до 20 мкм), средние (от 20 до 40 мкм) и крупные (более 40 мкм). Данные по отдельной группе сосудов усредняли для каждого животного и использовали для статистических сравнений.

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 («GraphPad Software Inc.», США). Проверку экспериментальных данных на нормальное распределение проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Во всех случаях исследование на нормальность распределения показало его отсутствие хотя бы для одной из

сравниваемых выборок, поэтому статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрических методов. Для сравнения средних данных независимых выборок при сравнении более двух групп использовали U-критерий Манна — Уитни. При сравнении большего числа групп применяли критерий Краскела — Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты

У крыс в возрасте 4 месяцев орошение поверхности головного мозга раствором АХ вызывало дилатацию $52,81\% \pm 5,73\%$ исследованных пиальных артерий. Преимущественно расширялись артерии диаметром менее 20 мкм ($56,33 \pm 4,08\%$ исследованных артерий данного диаметра) (рис. 1А). Амплитуда реакции составляла в среднем $32,47 \pm 0,9\%$ (рис. 1Б). Число расширившихся средних и крупных артерий составило в среднем около 40% (рис. 1А). Амплитуда дилататорной реакции на АХ с увеличением диаметра достоверно снижалась и у крупных артерий составляла $13,79 \pm 1,01\%$ (критерий Краскела — Уоллиса, $KW = 12,3$, $p < 0,001$, рис. 1Б).

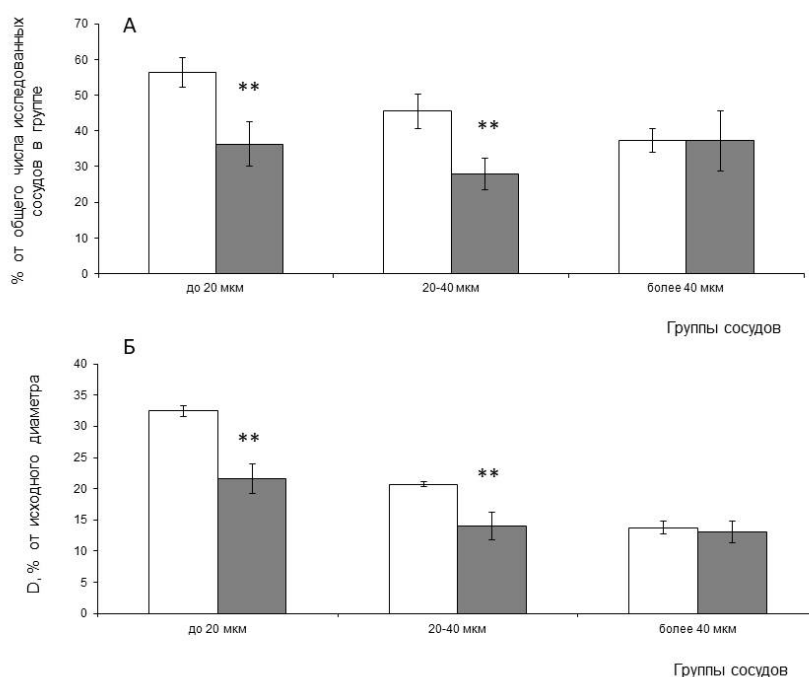


Рис. 1. Дилататорная реакция пиальных артерий на воздействие АХ. А — число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов в группе), Б — амплитуда дилататорной реакции (диаметр сосуда после воздействия АХ, % от исходного диаметра). Светлая заливка — крысы в возрасте 4 месяцев; темная заливка — крысы в возрасте 18 месяцев. ** — различия статистически значимы при $p < 0,01$ (U-критерий Манна — Уитни)

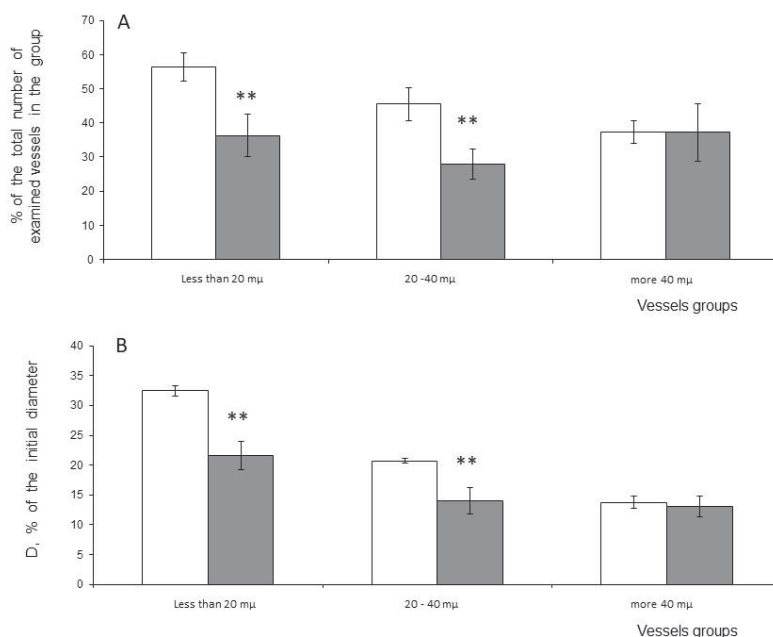


Fig. 1. Dilatory response of pial arteries to ACh. A—number of dilatations, % of the total number of examined vessels in the group, B—vascular diameter after ACh exposure, % of the initial diameter. White columns—4-month-old rats; dark columns—18-month-old rats. **—significant differences; $p < 0.01$ (Mann—Whitney U-test)

Применение L-NAME уменьшало число дилатаций артерий всех исследованных диаметров на воздействие AX в среднем примерно в 2 раза (рис. 2А). У мелких артерий также снижалась

амплитуда дилататорной реакции (в среднем на 35,11%, рис. 2Б). AG достоверно не изменяла число и амплитуду AX-опосредованных дилатаций (рис. 2).

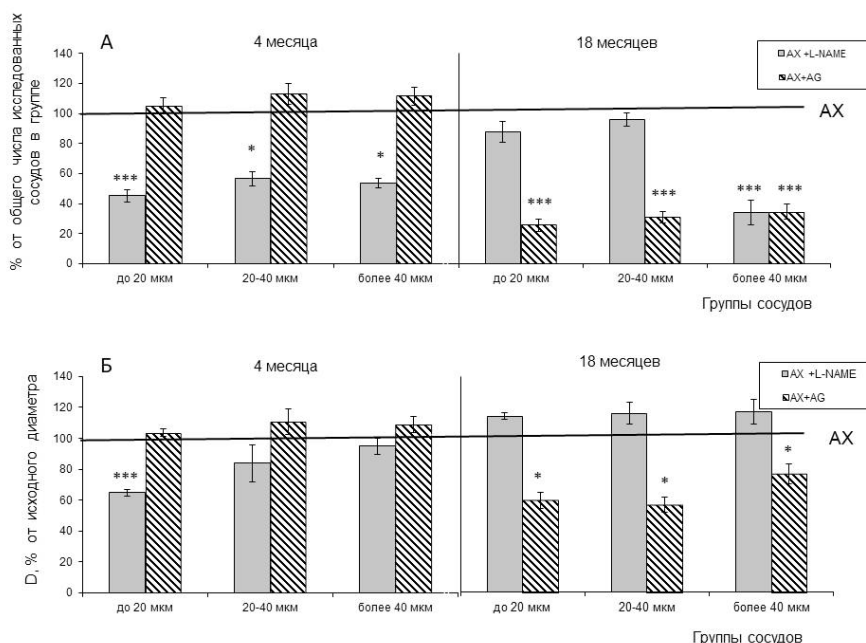


Рис. 2. Изменение дилататорной реакции пиальных артерий разных диаметров на воздействие AX на фоне применения блокаторов NOS. А — число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов в группе), Б — амплитуда дилататорной реакции (диаметр сосуда после воздействия AX, % от исходного диаметра). Линия — дилататорная реакция сосудов в группе на введение AX без применения блокатора, принятая за 100%. * — различия статистически значимы; * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$ (U-критерий Манна — Уитни)

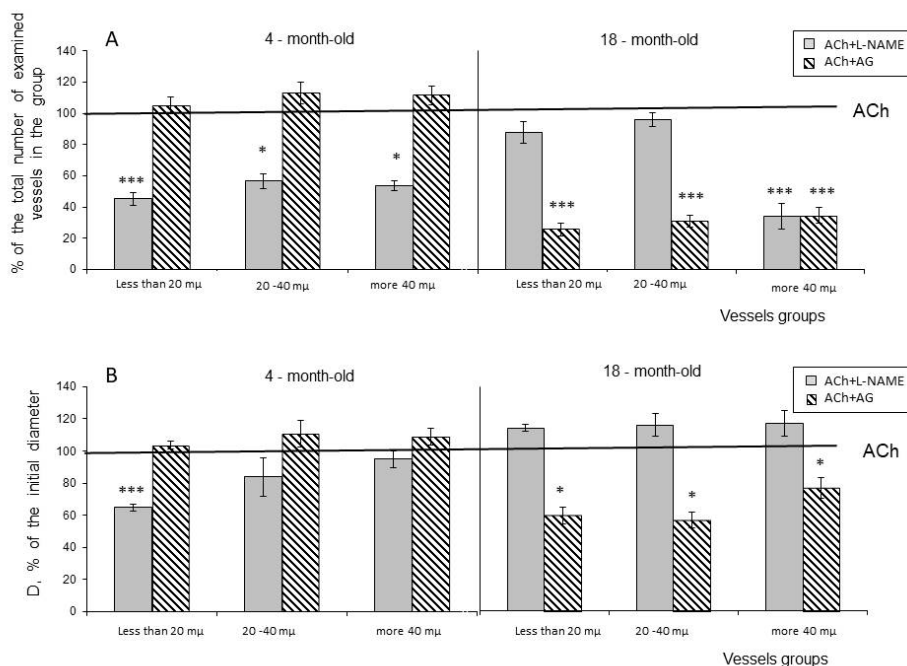


Fig. 2. Dilatory response of pial arteries of different diameter to ACh in the presence of NOS blockers. A—number of dilations, % of the total number of examined vessels in the group, B—vascular diameter after ACh exposure, % of the initial diameter. Solid line—reaction of vessels group to the introduction to ACh without a blocker, taken as 100%. *—significant differences; *— $p < 0.05$, ***— $p < 0.001$ (Mann—Whitney U-test)

Предварительное орошение поверхности головного мозга раствором L-аргинина у молодых крыс изменяло дилататорную реакцию на воздействие АХ только у крупных артерий (число расширившихся артерий увеличилось в среднем на 31,52%, амплитуда дилатации увеличилась в среднем на 68,29%, рис. 3). При этом добавление АГ в раствор АХ не изменяло число и амплитуду АХ-опосредованных дилатаций пиальных артерий, предварительно обработанных раствором L-аргинина (рис. 3).

Старение уменьшало дилататорную реакцию пиальных артерий на воздействие АХ. У крыс в возрасте 18 месяцев, по сравнению с 4-месячными животными, было отмечено уменьшение числа (в среднем на 35%, рис. 1А) и амплитуды АХ-опосредованных дилатаций (в среднем на 30%) мелких и средних артерий (рис. 1Б).

Применение L-NAME у крыс в возрасте 18 месяцев вызывало уменьшение числа дилатаций на АХ только у артерий диаметром более 40 мкм (в среднем на 65,55%) без изменения амплитуды дилатации (рис. 2). АГ уменьшал число (в среднем на 65-70%) и амплитуду

(в среднем на 40%) АХ-опосредованных дилататорных реакций артерий всех исследованных диаметров (рис. 2).

Орошение поверхности мозга раствором L-аргинина у 18-месячных крыс уменьшало число дилатаций на воздействие АХ артерий всех диаметров в среднем на 40% (рис. 3А). У мелких и крупных артерий также снижалась амплитуда дилатаций (на 20% и 45% соответственно, рис. 3Б). Добавление АГ изменяло АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий, предварительно обработанных раствором L-аргинина. У мелких артерий увеличивалось число дилатаций на воздействие АХ до уровня значений, полученных без применения L-аргинина. Число дилатаций средних артерий увеличивалось в среднем на 25%. Амплитуда дилатации мелких и средних артерий при этом достоверно не изменялась (рис. 3). Число АХ-опосредованных дилатаций крупных артерий на фоне применения АГ снижалось примерно в два раза, а амплитуда дилатации увеличивалась и достигала значений в среднем на 40% превышающих показатели, полученные без применения L-аргинина (рис. 3).

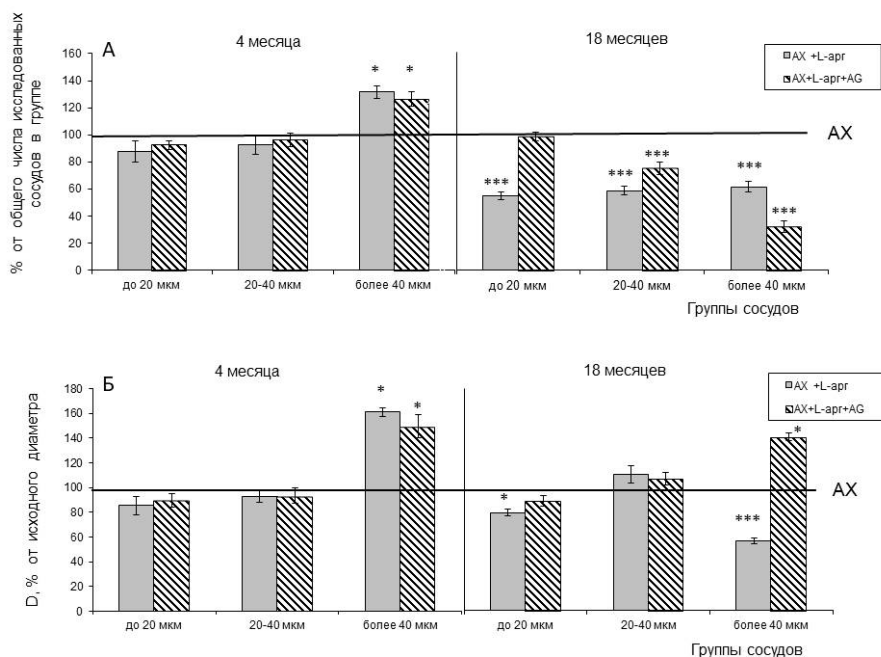


Рис. 3. Изменение дилаторной реакции пиллярных артерий различных диаметров на воздействие ацетилхолина на фоне применения L-аргинина. А — число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов в группе), Б — амплитуда дилаторной реакции (диаметр сосуда после воздействия АХ, % от исходного диаметра). Линия — дилаторная реакция сосудов в группе на введение АХ без L-аргинина, принятая за 100%. * — различия статистически значимы; * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$ (U-критерий Манна — Уитни)

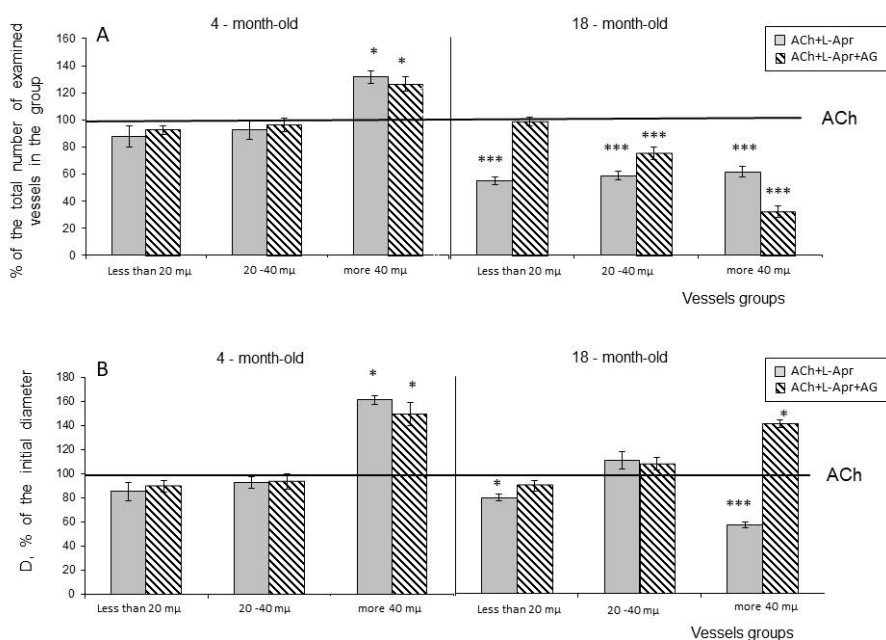


Fig. 3. Dilatory response of pial arteries of different diameter to ACh in the presence of L-arginine. A—number of dilatations, % of the total number of examined vessels in the group, B—vascular diameter after ACh exposure, % of the initial diameter. Solid line—reaction of vessels group to the introduction to ACh without L-arginine, taken as 100%. *—significant differences; *— $p < 0.05$, ***— $p < 0.001$ (Mann—Whitney U-test)

Обсуждение результатов

Исследование показало, что старение приводит к нарушению АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий у крыс. К 18 месяцам число и амплитуда дилататорных ответов на АХ снижаются в среднем на 30–35%. АХ стимулирует NOS, генерирующие NO, который диффундирует в нижележащие гладкомышечные клетки, вызывая расслабление за счет увеличения производства цГМФ, что приводит к АХ-индуцированной вазодилатации (Olchanheski et al. 2018). В литературе имеются сведения о том, что уменьшение вазодилатации при старении может быть связано с нарушением NO-зависимой регуляции сосудистых реакций (Mistry et al. 2002; Sindler et al. 2009). В основе этого нарушения может лежать снижение биодоступности NO, опосредованное изменением активности синтаз оксида азота: снижением активности eNOS и усилением активности iNOS (Cau et al. 2012; Cernadas et al. 1998).

В наших экспериментах применение L-NAME (неселективного ингибитора NO-синтаз) у молодых крыс уменьшало число и амплитуду дилататорной реакции на воздействие АХ артерий всех исследованных диаметров примерно в равной степени. В то же время AG (селективный ингибитор iNOS (Cinelli et al. 2020)) достоверно не изменял дилатацию пиальных артерий на АХ. В норме в эндотелии сосудов NO преимущественно генерируется при участии одной из форм конститутивных синтаз оксида азота — eNOS (Cernadas et al. 1998). Исходя из полученных результатов, можно утверждать, что у молодых крыс значительную роль в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий всех исследованных диаметров играет NO, синтезируемый eNOS.

У крыс в возрасте 18 месяцев L-NAME уменьшал число дилататорных реакций на АХ только у крупных артерий. Причем по сравнению с реакциями у более молодых животных снижение АХ-опосредованной дилатации крупных артерий на фоне применения L-NAME у стареющих крыс было выражено в большей степени. Роль NO, синтезируемого конститутивными формами NOS, в вазодилатации на АХ артерий меньших диаметров у 18-месячных крыс, по сравнению с более молодыми животными, снижалась. AG уменьшал число (в среднем на 65–70%) и амплитуду АХ-опосредованных дилататорных реакций всех исследованных артерий (в среднем на 40%). Следовательно, в отличие от полученных другими исследователями результатов (Cau et al. 2012; Cernadas et al. 1998;

Gambardella et al. 2020; Toth et al. 2017), которые указывают на снижение роли NO-опосредованных механизмов в дилатации мозговых артерий при старении, нами обнаружено, что у крыс в возрасте 18 месяцев роль NO в АХ-опосредованной дилатации крупных пиальных артерий (диаметром более 40 мкм) усиливается. Такие противоречия могут быть связаны с видовыми или регионарными различиями. Также недавние исследования (Toth et al. 2017) показали, что эндотелиальная дисфункция играет решающую роль в вызванном старением нарушении мгновенной адаптации регионального мозгового кровотока к изменениям активности нейронов. Возможно, что в условиях снижения роли NO-опосредованной регуляции в эндотелий-зависимой дилатации мелких пиальных артерий обнаруженное нами усиление роли NO в дилатации более крупных сосудов может быть проявлением адаптивных процессов, направленных на поддержание нормального кровоснабжения стареющего мозга.

Усиление активности iNOS и продуцирование чрезмерного количества NO может приводить к ограничению доступности L-аргинина, общего субстрата для всех ферментов NOS (Fujii et al. 2016). Производство NO из eNOS в первую очередь определяется внеклеточной биодоступностью L-аргинина (Tang et al. 2009; Xiong et al. 2014). В наших экспериментах предварительное орошение поверхности головного мозга раствором L-аргинина у молодых крыс приводило к достоверному увеличению числа и амплитуды АХ-опосредованных дилатаций только крупных пиальных артерий. У крыс в возрасте 18 месяцев число и амплитуда дилататорных реакций на АХ всех исследованных артерий на фоне применения L-аргинина снижались. Это может быть связано с тем, что у стареющих животных дополнительное введение L-аргинина, помимо активации eNOS, способствует также усилению выработки NO, синтезируемого iNOS. NO, высвобождаемый в больших количествах при участии iNOS, может быть вовлечен в снижение активности eNOS и связанное с этим уменьшение дилататорной реакции сосудов (Cau et al. 2012; Cernadas et al. 1998), что подтверждают результаты, полученные нами в эксперименте с применением AG. Добавление AG в раствор АХ у крыс в возрасте 18 месяцев, в отличие от 4-месячных животных, усиливало АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий, предварительно обработанных раствором L-аргинина. Однако, если у мелких артерий увеличивалось число дилатаций на воздействие АХ до уровня значений, полученных без при-

менения L-аргинина, то число дилатаций средних артерий возрастало в среднем только на 25%. А у артерий диаметром более 40 мкм увеличивалась только амплитуда дилатаций (до значений, достоверно превышающих значения, полученные без применения L-аргинина). Число дилатаций крупных артерий при этом достоверно снижалось. Такое явление, возможно, связано с описанным в литературе возрастным увеличением в эндотелии сосудов экспрессии и активности аргиназы (Clemente et al. 2020; Katusic 2007), фермента, который также использует L-аргинин в качестве субстрата и может конкурировать за L-аргинин с NOS (Fujii et al. 2016; Katusic 2007).

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что к 18 месяцам у крыс снижается роль NO, синтезируемого конститутивными формами NOS, в АХ-опосредованных дилататорных реакциях пиальных артерий диаметром менее 40 мкм и усиливается роль данного механизма в дилатации более крупных пиальных артерий. В основе этих изменений может лежать обнаруженное нами повышение роли iNOS в дилатации артерий всех исследованных диаметров и снижение биодоступности экзогенного L-аргинина. Возрастное нарушение механизмов NO-опосредованной регуляции сосудистого тонуса, являющихся одним из основных модуляторов реакций мозговых сосудов, может являться причиной развития эндотелиальной дисфункции, лежащей в основе снижения церебрального кровотока, разрежения микрососудистого русла и возникновения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The author declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Эксперименты проводили в соответствии с этическими стандартами, утвержденными правовыми актами РФ, принципами Базельской декларации и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Ethics Approval

The experiments were conducted in compliance with ethical standards as part of Russian legislation, the principles of the Basel Declaration and the requirements of the Commission for Control over the Maintenance and Use of Laboratory Animals, the I. P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences.

Вклад авторов

Планирование эксперимента, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи выполнены автором лично.

Author Contributions

The author planned the experiment, collected and processed data, drafted and edited the article independently.

References

- Arvanitakis, Z., Capuano, A. W., Leurgans, S. E. et al. (2016) Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in elderly people: A cross-sectional study. *The Lancet. Neurology*, vol. 15, no. 9, pp. 934–943. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30029-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30029-1) (In English)
- Berkowitz, D. E., White, R., Li, D. et al. (2003) Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation*, vol. 108, no. 16, pp. 2000–2006. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7> (In English)
- Bierhansl, L., Conradi, L.-C., Treps, L. et al. (2017) Central role of metabolism in endothelial cell function and vascular disease. *Physiology*, vol. 32, no. 2, pp. 126–140. <https://doi.org/10.1152/physiol.00031.2016> (In English)
- Cau, S. B., Carneiro, F. S., Tostes, R. C. (2012) Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: Therapeutic opportunities. *Frontiers in Physiology*, vol. 3, article 218. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00218> (In English)
- Cernadas, M. R., de Miguel, L. S., García-Durán, M. et al. (1998) Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circulation Research*, vol. 83, no. 3, pp. 279–286. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.3.279> (In English)

- Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., Silverman, R. B. (2020) Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*, vol. 40, no. 1, pp. 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599> (In English)
- Clemente, G. S., van Waarde, A., Antunes, I. F. et al. (2020) Arginase as a potential biomarker of disease progression: A molecular imaging perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 15, article 5291. <https://doi.org/10.3390/ijms21155291>. (In English)
- Cuadrado-Godia, E., Dwivedi, P., Sharma, S. et al. (2018) Cerebral small vessel disease: A review focusing on pathophysiology, biomarkers, and machine learning strategies. *Journal of Stroke*, vol. 20, no. 3, pp. 302–320. <https://doi.org/10.5853/jos.2017.02922> (In English)
- De Silva, T. M., Faraci, F. M. (2020) Contributions of aging to cerebral small vessel disease. *Annual Review of Physiology*, vol. 82, pp. 275–295. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034338> (In English)
- Fujii, N., Meade, R. D., Alexander, L. M. et al. (2016) iNOS-dependent sweating and eNOS-dependent cutaneous vasodilation are evident in younger adults, but are diminished in older adults exercising in the heat. *Journal of Applied Physiology*, vol. 120, no. 3, pp. 318–327. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00714.2015> (In English)
- Gambardella, J., Khondkar, W., Morelli, M. B. et al. (2020) Arginine and endothelial function. *Biomedicines*, vol. 8, no. 8, article 277. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080277> (In English)
- Katusic, Z. S. (2007) Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: Role of arginase I. *Circulation Research*, vol. 101, no. 7, pp. 640–641. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.162701> (In English)
- Luiking, Y. C., Ten Have, G. A. M., Wolfe, R. R., Deutz, N. E. P. (2012) Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol. 303, no. 10, pp. E1177–E1189. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00284.2012> (In English)
- Mazlan, M., Hamezah, H. S., Taridi, N. M. et al. (2017) Effects of aging and tocotrienol-rich fraction supplementation on brain arginine metabolism in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, article 6019796. <https://doi.org/10.1155/2017/6019796> (In English)
- Mistry, S. K., Greenfeld, Z., Morris, S. M. Jr., Baylis, C. (2002) The ‘intestinal-renal’ arginine biosynthetic axis in the aging rat. *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 123, no. 8, pp. 1159–1165. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(02\)00003-9](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(02)00003-9) (In English)
- Morris, S. M. Jr. (2007) Arginine metabolism: Boundaries of our knowledge. *The Journal of Nutrition*, vol. 137, no. 6, pp. 1602S–1609S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1602S> (In English)
- Olchanheski, L. R. Jr., Sordi, R., Oliveira, J. G. et al. (2018) The role of potassium channels in the endothelial dysfunction induced by periodontitis. *Journal of Applied Oral Science*, vol. 26, article e20180048. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0048> (In English)
- Pozhilova, E. V., Novikov, V. E. (2015) Sintaza oksida azota i endogennyj oksid azota v fiziologii i patologii kletki [Physiological and pathological value of cellular synthase of nitrogen oxide and endogenous nitrogen oxide]. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj meditsinskoj akademii — Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*, vol. 14, no. 4, pp. 35–41. (In Russian)
- Santhanam, L., Christianson, D. W., Nyhan, D., Berkowitz, D. E. (2008) Arginase and vascular aging. *Journal of Applied Physiology*, vol. 105, no. 5, pp. 1632–1642. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90627.2008> (In English)
- Shin, S., Mohan, S., Fung, H.-L. (2011) Intracellular L-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: Implications on the “L-arginine paradox”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 414, no. 4, pp. 660–663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.112> (In English)
- Sindler, A. L., Delp, M. D., Reyes, R. et al. (2009) Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *The Journal of Physiology*, vol. 587, no. 15, pp. 3885–3897. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172221> (In English)
- Tang, W. H. W., Wang, Z., Cho, L. et al. (2009) Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 53, no. 22, pp. 2061–2067. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.02.036> (In English)
- Toth, P., Tarantini, S., Csiszar, A., Ungvari, Z. (2017) Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: Mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 312, no. 1, pp. H1–H20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00581.2016> (In English)
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Donato, A. J. et al. (2018) Mechanisms of vascular aging. *Circulation Research*, vol. 123, no. 7, pp. 849–867. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311378> (In English)
- Xiong, Y., Fru, M. F., Yu, Y. et al. (2014) Long term exposure to L-arginine Accelerates endothelial cell senescence through arginase-II and S6K1 signaling. *Aging*, vol. 6, no. 5, pp. 369–379. <https://doi.org/10.18632/aging.100663> (In English)
- Xu, H., Li, S., Liu, Y.-S. (2022) Nanoparticles in the diagnosis and treatment of vascular aging and related diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 7, no. 1, article 231. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01082-z> (In English)