

И. Н. Яковенко, В. В. Жирнов

## Перекись водорода — эндотелиальный фактор расслабления в каротидных артериях гуся

*(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)*

*Показано, що інгібітори гемвісних білків (NaCN і Na<sub>2</sub>S) блокували NO-залежне розслаблення, але не впливали на EDHF-компонент ацетилхолінової вазорелаксації, що виключає участь гемвісних ферментів як EDHF-синтаз. Каталаза і 2-меркаптоетанол пригнічували EDHF-опосередковане розслаблення. Екзогенна H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у діапазоні концентрацій від 10 до 100 мкмоль/л викликала ендотелій-незалежне розслаблення попередньо скорочених фенілефрином каротидних артерій гусяка з динамікою розвитку реакції аналогічної EDHF. Отримані результати вказують на те, що H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> функціонує як EDHF у каротидних артеріях гусяка, реалізуючи свою дію через Ca<sup>2+</sup>-чутливі K<sup>+</sup>-канали.*

Эндотелий играет существенную роль в поддержании сосудистого гомеостаза путем синтеза и освобождения различных вазодилататоров, в том числе простаглицина (PGI<sub>2</sub>), окиси азота (NO) и гиперполяризующего фактора (EDHF). Существует несколько EDHF и вклад каждого эндотелиального фактора в регуляцию сосудистого тонуса может меняться в зависимости от вида животного и исследуемого сосуда. В качестве кандидатов на роль EDHF в различных сосудах рассматриваются продукты цитохрома P-450, моно- и липоксигеназного путей окисления полиеновых жирных кислот, ионы калия, электрическая связь через межклеточные промежутки и перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [1]. Главный источник H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в микрососудах у животных и человека — эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) в состоянии разобщения [2]. Важную роль в продукции EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> играет Cu,Zn-супероксиддисмутаза, которая, превращая супероксид анионы (генерируемые eNOS) до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, вызывает вазодилатацию путем открытия Ca<sup>2+</sup>-зависимых K<sup>+</sup>-каналов (K<sub>Ca</sub>), выступая, таким образом, в качестве EDHF-синтазы [3].

Большинство исследований эндотелий-зависимых сосудистых реакций выполнено на кровеносных сосудах млекопитающих. В данной работе впервые изучен феномен EDHF на сосудах птицы, что важно для выяснения его молекулярного источника и эволюционного развития механизмов вазомодуляции.

Цель нашего исследования состояла в изучении эндотелий-зависимого расслабления при действии различных ингибиторов внутриклеточной сигнализации и проверке гипотезы о функционировании H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в роли EDHF в каротидных артериях гуся.

Эксперименты проводили на кольцевых сегментах каротидных артерий гусей и кроликов в изометрическом режиме при температуре 37 °C в модифицированном Krebs-бикарбонатном буфере, содержащем, ммоль/л: 133 NaCl, 4,7 KCl, 10 NaHCO<sub>3</sub>, 1,38 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 10 Перес, 7,8 глюкозы, pH 7,4. Для изучения эндотелий-зависимого расслабления артерии предварительно сокращали фенілефрином (ФЭ, 10 мкмоль/л) или внесением в Krebs-бикарбонатный буфер с эквимолярной заменой 60 ммоль/л NaCl на KCl с последующим выходом сосудистого тонуса на устойчивое плато перед добавлением кумулятивных доз ацетилхолина — 10<sup>-9</sup>–10<sup>-5</sup> моль. Для оценки вклада образования

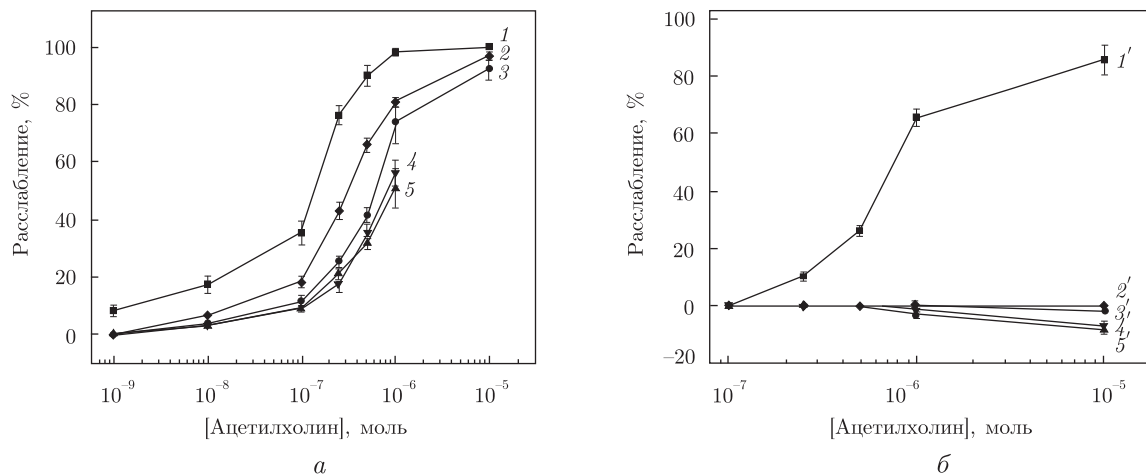


Рис. 1. Влияние ингибиторов LY83583 (кривые 2, 2'), L-NNA (кривые 3, 3'), NaCN (кривые 4, 4') и Na<sub>2</sub>S (кривые 5, 5') на уровень вызываемого ацетилхолином расслабления каротидных артерий в присутствии ИМ: а — гуся, б — кролика; 1, 1' — контроль (в присутствии только ИМ).  
Фрагменты сосудов предварительно сокращались ФЭ

EDHF в эндотелий-зависимое расслабление ацетилхолиновую вазорелаксацию регистрировали до и после 30-минутной инкубации сосудистого препарата при совместном действии ингибиторов циклооксигеназы, индометацина (ИМ, 10 мкмоль/л), и NO-синтазы, N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина (L-NNA, 0,3 ммоль/л). Данные представлены в виде среднего значения ± среднеквадратическая ошибка ( $M \pm m$ ). Статистическая оценка выполнялась с использованием *t*-критерия Стьюдента для выбранного уровня значимости  $p < 0,05$ .

Ацетилхолин вызывал концентративно-зависимое расслабление предварительно сокращенных ФЭ каротидных артерий гуся и кролика (рис. 1). После механического удаления эндотелия медиатор не расслаблял сосуды (данные не показаны), что указывает на эндотелий-зависимый механизм ацетилхолиновой вазорелаксации. Сокращенные ФЭ каротидные артерии гуся при совместном действии селективных ингибиторов циклооксигеназы (ИМ, 10 мкмоль/л) и NO-синтазы (L-NNA, 0,3 ммоль/л) или растворимой гуанилатциклазы (LY83583, 10 мкмоль/л) несколько снижали ответы релаксации на ацетилхолин (1 мкмоль/л) (рис. 1, а). Так, в присутствии ИМ и L-NNA запускаемое ацетилхолином (1 мкмоль/л) расслабление этих сосудов снижалось с  $(98 \pm 1,0)\%$  до  $(74 \pm 7,7)\%$  от уровня максимального сокращения на ФЭ (10 мкмоль/л). В присутствии ИМ ацетилхолиновая вазорелаксация каротидных артерий гуся полностью не отменялась NaCN (1,5 ммоль/л) или Na<sub>2</sub>S (1 ммоль/л) — неспецифическими ингибиторами гемсодержащих белков (гуанилатциклазы, пероксидазы, NO-синтазы и цитохром P-450 монооксигеназ) (см. рис. 1, а).

В отличие от артерий гуся, ацетилхолиновое расслабление каротидных артерий кролика в присутствии 10 мкмоль/л ИМ полностью блокировалось не только L-NNA, NaCN или Na<sub>2</sub>S, но и ингибитором растворимой гуанилатциклазы LY83583 (см. рис. 1, б). Это указывает на NO<sup>•</sup>-опосредованный механизм ацетилхолиновой релаксации сосудов кролика. Эффекты Na<sub>2</sub>S на все сосуды были полностью обратимы. В случае предварительного сокращения этих сосудистых препаратов путем помещения их в физиологический солевой раствор Кребса, в котором 60 ммоль/л NaCl эквивалентно замещали на KCl, величина расслабления была небольшой (рис. 2). После добавления к такому раствору L-NNA (0,3 ммоль/л), LY83583 (10 мкмоль/л), NaCN (1,5 ммоль/л) или Na<sub>2</sub>S (1 ммоль/л) ацетил-

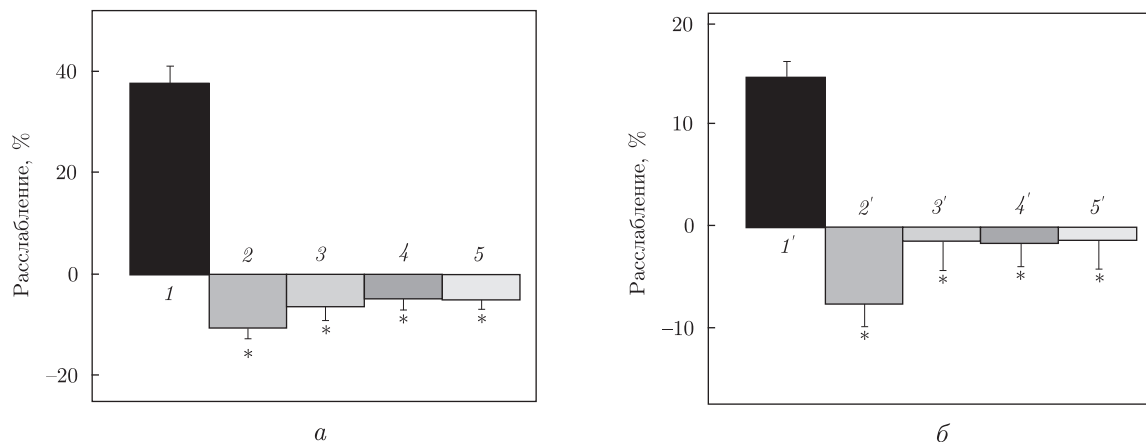


Рис. 2. Изменения изометрической силы каротидных артерий гуся (а) и кролика (б) при действии ацетилхолина. Вызываемая ацетилхолином вазорелаксация (1, 1' — контроль) заменялась вазоконстрикцией в присутствии L-NNA (2, 2'), Na<sub>2</sub>S (3, 3'), NaCN (4, 4') или LY83583 (5, 5'), когда сосуды предварительно были сокращены путем повышения внеклеточной концентрации K<sup>+</sup> до 60 ммоль/л.  
\* Достоверные отличия от контроля ( $p < 0,05$ )

холиновая вазорелаксация полностью отменялась во всех сосудах. Повышение внеклеточной концентрации K<sup>+</sup> до 60 ммоль/л полностью устраняло нечувствительный к ингибиторам L-NNA, LY83583, NaCN и Na<sub>2</sub>S компонент ацетилхолиновой релаксации каротидных артерий гуся (см. рис. 2, а). Это указывает на вовлечение EDHF в эндотелий-зависимое расслабление этих артерий путем активации K<sub>Ca</sub>-каналов.

Как отмечено выше, образующиеся цитохром P-450 монооксигеназами, эпоксиэйкозотриеновые кислоты функционируют в некоторых сосудах в роли EDHF. Поскольку неспецифические ингибиторы гемсодержащих белков NaCN и Na<sub>2</sub>S не устраняли EDHF-опосредованную релаксацию каротидных артерий гуся (см. рис. 2, а), то это исключает возможность функционирования цитохром P-450 монооксигеназ как EDHF-синтаз в этих сосудах.

Известно, что выходящие из эндотелиальных клеток ионы K являются EDHF в печеночных артериях крысы, вызывая гиперполяризацию и релаксацию гладкомышечных клеток путем активации Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы и K<sup>+</sup>-каналов внутреннего тока [4, 5]. Однако комбинированное действие ингибитора Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-насоса убаина (0,03 ммоль/л) с ионами Ba (1 ммоль/л) не подавляло EDHF-опосредованную вазорелаксацию артерий гуся (см. табл. 1). Дополнительное повышение в физиологическом растворе [K<sup>+</sup>] до 20 ммоль/л не вызывало расслабления (данные не приведены). Таким образом, возможное локальное увеличение уровня ионов K в миоэндотелиальном пространстве также не может быть EDHF в этих артериях.

В некоторых сосудах исследованных животных EDHF рассматривается как физический фактор, который передает гиперполяризацию от активированных эндотелиоцитов к гладкомышечным клеткам через межклеточные промежутки [1]. Такая межклеточная электрическая связь не играет центральную роль в EDHF-опосредованном расслаблении сонных артерий гуся, поскольку в гипертоническом растворе, содержащем 60 ммоль/л сахарозы, в котором прерывается электрическая связь посредством межклеточных промежутков, не наблюдалось значительного снижения EDHF-опосредованного расслабления в изучаемых нами сосудах (см. табл. 1).

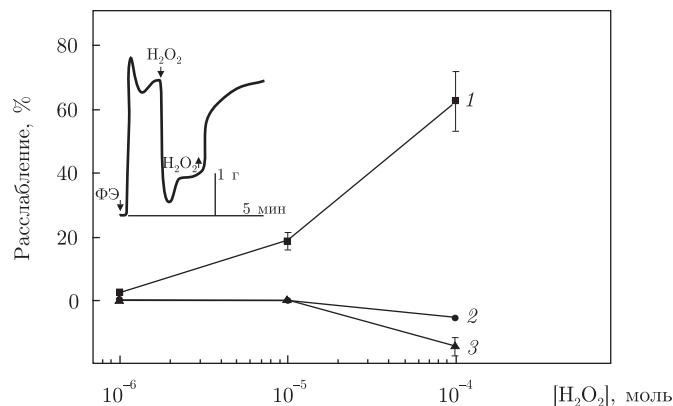


Рис. 3. Расслабление каротидных артерий гуся  $\text{H}_2\text{O}_2$ : предварительно сокращенных ФЭ в условиях физиологической концентрации внеклеточного  $\text{K}^+$  (1) или предварительно сокращенных повышением внеклеточного уровня  $\text{K}^+$  до 60 ммоль/л (2); 3 — влияние  $\text{H}_2\text{O}_2$  на тонус предварительно сокращенных ФЭ каротидных артерий кролика.

*Вставка.* Типичное изменение изометрического натяжения лишенных эндотелия и предварительно сокращенных ФЭ каротидных артерий гуся при действии  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 мкмоль/л)

$\text{H}_2\text{O}_2$  в качестве EDHF исследована в экспериментах с применением каталазы. В каротидных артериях гуся каталаза (1000 ед./мл) в присутствии ИМ и L-NNA подавляла ацетилхолиновую вазорелаксацию (см. табл. 1). Это указывает на то, что в этих сосудах  $\text{H}_2\text{O}_2$  может функционировать в роли EDHF. Неполное устранение каталазой EDHF обусловлено пространственными препятствиями, которые обычно возникают при проникновении в ткани таких высокомолекулярных белков. Действительно, эффективность каталазы существенно повышается после двух часовой прединкубации коронарных микрососудов свиньи с этим ферментом [6].

В отличие от сосудов кролика, экзогенная  $\text{H}_2\text{O}_2$  вызывала концентративно-зависимое расслабление лишенных эндотелия и предварительно сокращенных ФЭ в растворе с физиологическим уровнем  $\text{K}^+$  (4,7 ммоль/л) каротидных артерий гуся ( $EC_{50}$  ( $75 \pm 4$ ) мкмоль/л) (рис. 3). Наблюдаемый эффект  $\text{H}_2\text{O}_2$  не мог быть обусловлен увеличением образования cGMP, поскольку ингибитор растворимой гуанилатциклазы LY83583 (10 мкмоль/л) на него не влиял (данные не представлены). Полученные результаты показывают, что запускаемое

Таблица 1. Влияние фармакологических агентов на запускаемое ацетилхолином EDHF-опосредованное расслабление каротидных артерий гуся, предварительно сокращенных ФЭ

Ингибитор	Концентрация агента, ммоль/л	$EC_{50}$	Ацетилхолиновая вазодилатация, %
Контроль (без ингибитора)	—	$6,2 \pm 0,2$	$92 \pm 3$
Тетраэтиламмоний	5	—	0
Каталаза	1000 ед./мл	$6,0 \pm 0,2$	$(42 \pm 4)^*$
Сахароза	60	$6,2 \pm 0,3$	$80 \pm 7$
Убаин + $\text{BaCl}_2$	$0,03 \pm 1,00$	$6,4 \pm 0,2$	$90 \pm 4$
МЭ	0,10	—	$(15 \pm 2)^*$
NDGA	0,01	$6,2 \pm 0,3$	$82 \pm 4$
МЭ + NGDA	$0,10 \pm 0,01$	—	0

Примечание. Все эксперименты выполнены в присутствии ИМ (10 мкмоль/л) и L-NNA (0,3 ммоль/л).  $EC_{50}$  — отрицательный десятичный логарифм половины от максимально-эффективной концентрации ацетилхолина; \* достоверные отличия от контроля ( $p < 0,05$ ).

$H_2O_2$  расслабление каротидных артерий гуся, вероятно, обусловлено активацией  $K_{Ca}$ -каналов.

Эндотелиоциты сосудов способны генерировать  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$  несколькими внутриклеточными ферментативными системами, включая NO-синтазу, циклооксигеназу, липоксигеназу, ксантиноксидазу, P-450 монооксигеназы и NAD(P)H оксидазы [7]. В наших исследованиях лиганды гема (NaCN и  $Na_2S$ ) устраняли  $NO^{\bullet}$ -составляющую эндотелий-зависимого расслабления, но не EDHF (см. рис. 2). Это исключает возможность участия ферментов, содержащих гемовую простетическую группу (цитохрома P-450 монооксигеназы, NO-синтазы, пероксидазы), как источников образования EDHF в сосудах гуся.

EDHF-компонент ацетилхолиновой вазорелаксации изучался на фоне ИМ. Поэтому маловероятно, что циклооксигеназа функционирует в качестве EDHF/ $H_2O_2$ -синтазы в сонных артериях гуся. Как известно,  $H_2O_2$  может расслаблять гладкие мышцы сосудов, активируя  $K_{Ca}$ -каналы через путь, опосредованный липоксигеназой [8]. Поскольку ингибитор липоксигеназы (NDGA) существенно не влиял на EDHF-опосредованное расслабление (см. табл. 1), образование EDHF/ $H_2O_2$  в данных сосудах также, вряд ли, зависит от этого фермента. Кроме того, показано, что среди возможных источников  $O_2^{\bullet-}$  в некоторых микрососудах основным является эндотелиальная NO-синтаза в состоянии разобщения [9]. Поэтому пути образования супероксида и  $H_2O_2$  в коронарных артериях гуся требуют дополнительного изучения, так как нельзя исключить участия эндотелиальной NAD(P)H оксидазы, нечувствительной к действию NaCN и  $Na_2S$  [10].

EDHF-компонент эндотелий-зависимого расслабления каротидных артерий гуся также избирательно блокировался при увеличении внеклеточной концентрации  $K^+$  (см. рис. 2, а) или после добавления тетраэтиламмония (см. табл. 1). Эти результаты указывают на то, что EDHF так же, как и экзогенная  $H_2O_2$ , вызывает расслабление исследуемых сосудов, по-видимому, путем активации  $K_{Ca}$ -каналов.

Отметим, что  $H_2O_2$  также может действовать путем окислительной модификации eNOS, переводя его в разобщенное (окисленное) состояние. Так, обработка мембранной фракции эндотелиоцитов, содержащей eNOS, или очищенного фермента окислителем SH-групп, дитиоидом приводила к существенному снижению его NO-генерирующей активности (~ 75%). Этот эффект, по-видимому, связан с окислением тиоловых групп eNOS, так как он полностью восстанавливался дитиотреитолом [11]. В наших исследованиях, как и ожидалось, 2-меркаптоэтанол (МЭ, 100 мкмоль/л) значительно уменьшал (~ 84%) EDHF/ $H_2O_2$ -составляющую ацетилхолиновой вазорелаксации (см. табл. 1), что подтверждает важную роль разобщенного состояния eNOS в генерации EDHF/ $H_2O_2$ . После введения в омывающую сосуд среду комбинации МЭ с ингибитором липоксигеназы (NDGA), как и в случае сосудов без эндотелия, ацетилхолин вызывал незначительную вазоконстрикцию, в обычных условиях скрытую эндотелий-зависимой ацетилхолиновой вазорелаксацией. Последний результат, вероятно, обусловлен тем, что NDGA в используемой концентрации может неспецифически частично ингибировать НАД(Ф)Н оксидазу [12], которой принадлежит ведущая роль в разобщении eNOS [13], таким образом усиливая эффект МЭ, поскольку действие самой NDGA проявляет лишь тенденцию к снижению вазодилаторной активности ацетилхолина (см. табл. 1).

Описанные в литературе эффекты  $H_2O_2$  на некоторые сосуды рассматриваются как результат окислительного стресса [14]. Повреждение кровеносных сосудов продуктами превращения  $H_2O_2$  в наших исследованиях представляется маловероятным, поскольку диаметр сосуда возвращался к исходному уровню после удаления  $H_2O_2$ , а сосудо-

расширяющие эффекты  $H_2O_2$  повторно воспроизводились на том же сосудистом препарате.

Таким образом,  $H_2O_2$  функционирует как EDHF в каротидных артериях гуся, что подтверждается следующими выводами: во-первых,  $H_2O_2$ -инициированное расслабление и EDHF-компонент ацетилхолиновой вазорелаксации имеют подобную динамику развития реакции (см. рис. 3, *вставка*) и оба отменяются увеличением уровня  $K^+$  в омывающем сосуд физиологическом растворе (см. рис. 2, *a* и рис. 3). Во-вторых,  $H_2O_2$  вызывает расслабление каротидных артерий гуся без эндотелия и этот эффект не может быть обусловлен действием  $H_2O_2$  на эндотелий. В-третьих,  $H_2O_2$  не вызывает расслабление каротидных артерий кроликов, в которых отсутствует собственно  $NO^{\bullet}/PGI_2$ -независимый компонент ацетилхолиновой вазорелаксации. В-четвертых, защита тиоловых групп МЭ (100 мкмоль/л) значительно снижает EDHF-компоненту ацетилхолиновой вазорелаксации (см. табл. 1).

$H_2O_2$  не является свободным радикалом и намного более устойчивая молекула, чем  $NO^{\bullet}$ , но так же, как и  $NO^{\bullet}$ , способна проникать через биологические мембраны. Это позволяет  $H_2O_2$  участвовать в межклеточной сигнализации. Функциональная значимость  $H_2O_2$  как эндотелиального расслабляющего фактора не универсальна для всех сосудов и может варьировать среди артерий различных видов животных. Отличия в ответах гладкой сосудистой мышцы на этот паракринный медиатор, вероятно, обусловлены генетически. Можно предположить, что EDHF/ $H_2O_2$  в большей степени, чем EDHF/ $NO^{\bullet}$ , представлен в магистральных сосудах птиц, по сравнению с такими же сосудами млекопитающих, и филогенетически принадлежит к более древним медиаторам.

1. *Féletou M., Vanhoutte P. M.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**, No 6. – P. 1215–1225.
2. *Capettini L. S. A., Cortes S. F., Gomes M. A. et al.* Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – **295**, No 6. – P. H2503-H2511.
3. *Yada T., Shimokawa H., Morikawa K. et al.* Role of Cu, Zn-SOD in the synthesis of endogenous vasodilator hydrogen peroxide during reactive hyperemia in mouse mesenteric microcirculation in vivo // *Ibid.* – 2008. – **294**, No 1. – P. H441-H448.
4. *Beny J. L., Schaad O.* An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – **131**, No 5. – P. 965–973.
5. *Busse R., Edwards G., Feletou M. et al.* EDHF: bringing the concepts together // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2002. – **23**, No 8. – P. 374–380.
6. *Matoba T., Shimokawa H., Morikawa K. et al.* Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – **23**, No 7. – P. 1224–1230.
7. *Katusic Z. S.* Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996. – **20**, No 3. – P. 443–448.
8. *Barlow R. S., El-Mowafy A. M., White R. E.*  $H_2O_2$  opens  $BK_{Ca}$  channels via the  $PLA_2$ -arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2000. – **279**, No 2. – P. H475-H483.
9. *Yokoyama M., Hirata K.-I.* Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Is it a physiological mechanism of endothelium-dependent relaxation in cerebral artery? // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – **73**, No 1. – P. 8–9.
10. *Cai H.* NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease // *Circ. Res.* – 2005. – **96**, No 8. – P. 818–822.
11. *Huang A., Xiao H., Samii J. M. et al.* Contrasting effects of thiol-modulating agents on endothelial NO bioactivity // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2001. – **281**, No 6. – P. C719-C725.
12. *Holland J. A., Goss R. A., O'Donnell R. W. et al.* Low-density lipoprotein induced actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells: mechanisms of action // *Endothelium.* – 2001. – **8**, No 2. – P. 117–135.

13. *Griendling K. K., Sorescu D., Ushio-Fukai M.* NAD(P)H oxidase role in cardiovascular biology and disease // *Circ. Res.* – 2000. – **86**, No 1. – P. 394–501.
14. *Shimizu S., Ishii M., Miyasaka Y.* Possible involvement of hydroxyl radical on the stimulation of tetrahydrobiopterin synthesis by hydrogen peroxide and peroxynitrite in vascular endothelial cells // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – **37**, No 4. – P. 864–875.

*Институт биоорганической химии  
и нефтехимии НАН Украины, Киев*

*Поступило в редакцию 18.01.2010*

**I. N. Iakovenko, V. V. Zhirnov**

### **Hydrogen peroxide is an endothelium-derived relaxing factor in goose carotid arteries**

*It is shown that the nonselective inhibitors of heme-containing proteins (NaCN and Na<sub>2</sub>S) block the NO<sup>•</sup>-dependent relaxation, though they have no effect on the revealed EDHF component of acetylcholine vasodilatation, which excludes the functioning of heme-containing enzymes (soluble guanylate cyclase, NO<sup>•</sup>-synthase and other cytochrome P-450 monooxygenases) as EDHF-synthases. Catalase and 2-mercaptoethanol suppressed the EDHF-mediated relaxation. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10–100 μM) evoked the endothelium-independent relaxation of the goose carotid arteries precontracted with phenylephrine with similar EDHF reaction dynamics. Therefore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is functioning most likely as EDHF in goose carotid artery in response to ACh stimulation and makes a direct action on the Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels.*