

ФГБОУ ВО ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**Прокофьев Игорь Игоревич**

**РОЛЬ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В КАРДИОПРОТЕКТОРНОМ  
ДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, доцент  
Перфилова Валентина Николаевна

Научный консультант:  
член-корреспондент РАН, ЗРВИ РФ,  
доктор медицинских наук, профессор  
Тюренков Иван Николаевич

Волгоград, 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ В НОРМЕ И ПРИ СТРЕССОРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	12
1.1.1 Оксид азота в функционировании сердечно-сосудистой системы.....	12
1.1.2 Роль оксида азота в механизмах симпатических и парасимпатических влияний на сердце .....	16
1.2 Кардиотропные эффекты глутаминовой кислоты и связь ее с системой оксида азота.....	19
1.3 Влияние ГАМК на функционирование сердечно-сосудистой системы и участие оксида азота в механизме ее действия .....	23
1.4 Механизмы повреждающего действия стресса на сердце .....	26
1.5 NO как стресс-лимитирующая система .....	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
ГЛАВА 3. РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В МОДУЛЯЦИИ ПРОИЗВОДНЫМИ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ СИМПАТИЧЕСКИХ И ПАРАСИМПАТИЧЕСКИХ ВЛИЯНИЙ НА СЕРДЦЕ .....	52
3.1 Изучение <i>in vitro</i> влияния глуфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных крыс при активации симпатической и парасимпатической системы и блокаде NOS .....	52
3.2 Изучение <i>ex vivo</i> влияния глуфимета и фенибута на сократимость изолированных предсердий интактных крыс при блокаде NOS в условиях активации симпатической и парасимпатической системы .....	58
3.3 Изучение <i>ex vivo</i> влияния глуфимета и фенибута на сократимость изолированных предсердий крыс при стрессорном повреждении сердца в условиях блокады NOS и стимуляции адreno- и холинорецепторов.....	67
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ NO-ЭРГИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА В МЕХАНИЗМЕ СТРЕССПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ .....	75

4.1 Влияние глуфимета и фенибута на концентрацию конечных метаболитов NO в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга стрессированных крыс в условиях блокады различных NO-синтаз .....	75
4.2 Оценка антиоксидантного действия производных нейроактивных аминокислот в условиях стресса при блокаде nNOS и iNOS.....	79
4.3 Влияние глуфимета и фенибута на дыхание митохондрий сердца и головного мозга стрессированных животных при блокаде различных NO-синтаз.....	87
4.4 Изучение влияния производных нейроактивных аминокислот на уровень артериального давления стрессированных животных при блокаде nNOS и iNOS ..	98
4.5 Оценка показателей системы гемостаза стрессированных животных и влияния на них производных нейроактивных аминокислот в условиях блокады различных NO-синтаз.....	100
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЦЕНТРАЛЬНОГО И ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО	
NO-ЕРГИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ	
ПРОИЗВОДНЫХ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ .....	
5.1 Изучение центрального NO-ергического компонента в механизме действия глуфимета и фенибута .....	104
5.2 Изучение <i>ex vivo</i> влияния исследуемых соединений на экспрессию индуцибельной NO-синтазы в перитонеальных макрофагах мышей.....	108
5.3 Изучение <i>in vitro</i> влияния глуфимета и фенибута на экспрессию индуцибельной NO-синтазы в перитонеальных макрофагах мышей.....	110
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	114
ВЫВОДЫ .....	128
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	130
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время заболевания сердечно-сосудистой системы во всем мире являются основной причиной смертности взрослого населения. Классическими причинами сложившейся ситуации остаются употребление табака, ожирение, малоактивный образ жизни [Петрухин И.С. и др., 2012; Телкова И.Л., 2012; Сайгитов Р.Т. и др., 2015]. Помимо этого, одной из особенностей развития современного общества является увеличение влияния психосоциальных факторов, вызывающих стресс, который служит одним из основных факторов риска заболеваний сердца и сосудов [Kivimaki M. et al., 2015; Гимаева З.Ф. и др., 2017].

В результате избытка катехоламинов и глюкокортикоидов при стрессе нарушается работа кальциевого насоса, усиливается экспрессия индуцибельной NO-синтазы, активируются процессы перекисного окисления липидов с повреждением мембранных структур клетки, развивается митохондриальная и эндотелиальная дисфункции, что приводит к повреждению кардиомиоцитов и снижению инотропных резервов сердца [Тюренков И.Н. и др., 2014; Chen H.J. et al., 2014; Coso H. et al., 2015; Перфилова В.Н. и др., 2016].

Ограничивают негативное влияние стресса на организм стресс-лимитирующие системы, наиболее мощными из которых являются нитроксид- и ГАМК-ергическая. NO на центральном уровне модулирует активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, снижая секрецию глюкокортикоидов корой надпочечников и выброс катехоламинов из окончаний симпатических нервов и мозгового отдела надпочечников [Малышев И.Ю. и др., 1998; Jang S.J. et al., 2011; Puzserova A. et al., 2016]. Оксид азота, регулируя тонус коронарных сосудов, симпатические и парасимпатические влияния на сердце, дыхательную функцию митохондрий, играет большую роль в устойчивости миокарда к различным повреждающим факторам [Rastaldo R. et al., 2007]. ГАМК

также оказывает симпатингибирующее действие, снижает АД, участвует в метаболических процессах в кардиомиоцитах [Goddard A.W., 2016].

Предшественником ГАМК является глутамат – нейрoактивная аминокислoта с кардиопротекторными свойствами и играющая определенную роль в патофизиологии кардиоваскулярных нарушений. Глутаминовая кислота участвует в центральном и периферическом контроле сердечно-сосудистой системы, обладает антигипоксическими и антиоксидантными свойствами, является субстратом цикла Кребса [Jennings A. et al., 2015; Zheng Y. et al., 2016].

Оксид азота тесно взаимосвязан в функциональном плане с нейрoактивными аминокислoтами, являясь внутри- и межклеточным сигнальным звеном в глутаматергической нейротрансмиссии в ЦНС [Raju K. et al., 2015]. Активация ионотропного NMDA-рецептора приводит к увеличению внутриклеточной концентрации кальция, в результате чего усиливается экспрессия конститутивных изоформ NO-синтаз [Santini C.O. et al., 2013]. При стимуляции метаботропных рецепторов глутамата снижается синтез iNOS [Yao H.H. et al., 2005]. Имеются данные и о тесной взаимосвязи NO- и ГАМК-ергической систем. Показано, что оксид азота вызывает высвобождение ГАМК из синаптических везикул в цитозоль [Merino J.J. et al., 2014; Tarasenko A.S., 2016]. Также NO способен ингибировать ГАМК-трансаминазу – основной фермент, участвующий в деградации ГАМК [Jayakumar A.R. et al., 1999].

В этой связи актуальным является поиск веществ, ограничивающих стресс-реакцию и влияющих на систему оксида азота, среди производных нейрoактивных аминокислoт. В ранее проведенных исследованиях показаны кардиопротекторные свойства нового производного глутаминовой кислоты – глүфимета и производного ГАМК – фенибута при стрессорном воздействии [Перфилова В.Н. и др., 2009; Тюренокoв И.Н. и др., 2014].

### **Степень разработанности проблемы**

В отечественной и зарубежной литературе имеется много данных о биологической роли оксида азота, в частности о его регуляторном влиянии на

работу сердца и сосудов [Massion P.B. et al., 2003; Rastaldo R. et al., 2007; Strijdom H. et al., 2009; Dias R.G. et al., 2011; Кузнецова В.Л. и др., 2015; Bohlen H.G., 2015]. Также показаны защитные и повреждающие эффекты оксида азота и его участие в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы [Рахматуллина Ф.Ф., 2005; Naseem K.M., 2005; Bian K. et al., 2008; Khazan M. et al., 2014; Ritchie R.H. et al., 2017]. NO оказывает стресс-лимитирующее действие, на центральном и периферическом уровнях ограничивает повреждение органов и тканей при стрессорном воздействии [Малышев И.Ю. и др., 1998; Манухина Е.Б. и др., 2000; Парахонский А.П., 2010; Gulati K. et al., 2015; Puzserova A. et al., 2016]. Известно о регуляции оксидом азота кардиоваскулярных эффектов глутамата и глутаматергической нейротрансмиссии [Пожилова Е.В. и др., 2015; Raquel H.A. et al., 2016]. Также имеются данные о тесной взаимосвязи NO и ГАМК-системы. Оксид азота опосредует вазодилатирующий эффект ГАМК, высвобождение ее из корковых нейронов [Kamran M. et al., 2013; Merino J.J. et al., 2014].

Вместе с тем, мы не нашли в доступной литературе данных, указывающих на участие NO-ергической системы в реализации кардиопротекторного действия производных ГАМК и глутаминовой кислоты при стрессорных повреждениях сердца, что и послужило основанием к выполнению данного исследования.

### **Цель исследования**

Комплексная оценка участия системы оксида азота в кардиопротекторном действии нового производного глутаминовой кислоты – глүфимета и производного ГАМК – фенибута в условиях острого стрессорного воздействия.

### **Задачи исследования**

1. Провести анализ центрального и периферического NO-ергического компонента в механизме кардиопротекторного действия глүфимета и фенибута.
2. Изучить *in vitro* влияние глүфимета и фенибута на сократимость миокарда интактных животных в условиях активации  $\beta_1$ -адренорецепторов и M-

холинорецепторов изолированных предсердий при неселективной блокаде NO-синтаз.

3. Исследовать *ex vivo* роль системы оксида азота в модуляции производными нейроактивных аминокислот симпатических и парасимпатических влияний на сердце интактных и стрессированных животных.

4. Изучить влияние глуфимета и фенибута на концентрацию конечных метаболитов NO, процессы перекисного окисления липидов и дыхательную функцию митохондрий клеток сердца и головного мозга, артериальное давление и состояние системы гемостаза у животных, подвершихся острому стрессорному воздействию при селективной блокаде нейрональной и индуцибельной NO-синтаз.

### **Научная новизна исследования**

Впервые показан периферический NO-ергический механизм действия производного глутаминовой кислоты – глуфимета и производного ГАМК – фенибута в условиях *in vitro*, о чем свидетельствует отсутствие ослабления инотропной реакции изолированных предсердий крыс при стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов под влиянием исследуемых соединений и неселективной блокаде NO-синтаз. В условиях *ex vivo* обнаружено, что глуфимет и фенибут также ослабляют увеличение амплитуды сокращений изолированных предсердий интактных животных при активации  $\beta_1$ -адренорецепторов, однако этот эффект не ингибируется неселективной блокадой NO-синтаз. Выявлено, что исследуемые соединения *ex vivo* уменьшают усиление инотропного ответа изолированных предсердий стрессированных животных на стимуляцию адренорецепторов как на фоне блокады NOS, так и без нее, реализуя свое действие, вероятно, через другие механизмы, не связанные с NO-системой. Впервые показано влияние глуфимета и фенибута на активность индуцибельной изоформы NO-синтазы, о чем свидетельствует снижение уровня конечных метаболитов NO в гомогенатах сердца, головного мозга и сыворотке крови, уровня продуктов ПОЛ, повышение активности антиоксидантных ферментов, показателей дыхания митохондрий,

нормализация параметров системы гемостаза и АД в условиях селективной блокады нейрональной NOS и отсутствие перечисленных эффектов при блокаде iNOS.

Выявлено ингибирующее влияние глүфимета и фенибута на экспрессию iNOS в перитонеальных макрофагах мышей. Впервые показан центральный NO-ергический компонент кардиопротекторного действия глүфимета, на что указывает отсутствие снижения артериального давления на фоне ингибирования NOS при введении производного глүтамата в боковые желудочки мозга крысы.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты исследования демонстрируют новые аспекты механизма кардиопротекторного действия фенибута и производного глүтаминной кислоты – глүфимета. Выявленные закономерности свидетельствуют о наличии NO-ергического компонента в реализации эффектов изученных соединений, что позволяет рекомендовать поиск среди производных ГАМК и глүтаминной кислоты высокоактивных веществ, ограничивающих стресс-реакцию и модулирующих NO-ергическую систему. Полученные данные указывают на перспективность дальнейшего изучения фармакологических эффектов, связанных с ингибированием iNOS.

Результаты диссертационной работы используются при обучении студентов и провизоров на кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ, в научно-исследовательской работе лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии ВолгГМУ.

### **Методология и методы исследования**

Выбранные методологические подходы соответствовали поставленным задачам. Исследование на изолированных предсердиях проводили на основе методических рекомендаций [Миронов А.Н., 2012], а также общепринятых

подходах по работе на изолированных органах [Блаттнер Р. и др., 1983]. Иммунизационно-болевого стресс моделировали по методике Ковалева Г.В. и соавт. [Ковалев Г.В. и др., 1983]. Ингибирующее влияние исследуемых соединений на индуцибельную NO-синтазу изучали на липополисахарид-активированных перитонеальных макрофагах мышей [Fortier A.H. et al., 1982]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием рекомендованных методов [Сергиенко В.И. и др., 2012].

Проведение экспериментов осуществляли в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике при РАН, а также международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях (1997). Работа одобрена Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (протокол № 198-2014 от 25.04.2014 г).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Изучаемые производные нейроактивных аминокислот имеют периферический NO-ергический механизм кардиопротекторного действия, о чем свидетельствует одинаковый прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий при стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов и неселективной блокаде NO-синтаз у интактных животных контрольной и опытных групп.

2. Механизм кардиопротекторного действия глуфимета и фенибута при стрессорном повреждении обусловлен их влиянием на активность индуцибельной изоформы NO-синтазы, о чем свидетельствует отсутствие изменения концентрации конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга, показателей антиоксидантного статуса, дыхания митохондрий сердца и головного мозга, системы гемостаза и уровня АД при ингибировании iNOS у животных, получавших изучаемые соединения.

3. В механизме кардиопротекторного действия глуфимета принимает участие центральный NO-ергический компонент, о чем свидетельствует отсутствие его влияния на систолическое АД при введении в боковые желудочки

мозга в условиях неселективной блокады NO-синтаз. Фенибут реализует свое центральное действие через другие механизмы, не связанные с NO-системой.

4. Исследуемые производные нейроактивных аминокислот снижают экспрессию индуцибельной NO-синтазы, на что указывает уменьшение концентрации iNOS, конечных метаболитов оксида азота и цГМФ в перитонеальных макрофагах мышей, активированных липополисахаридом в условиях *in vitro* и при внутрибрюшинном введении в течение трех дней ЛПС и изучаемых производных ГАМК и глутамата.

### **Личный вклад**

Вклад автора заключается в непосредственном участии в формировании рабочей концепции, в анализе литературных данных, проведении экспериментов, статистической обработке результатов, подготовке рукописи диссертации. Автор принимал участие в планировании экспериментальной части исследования, формулировании цели и задач, подготовке публикаций по основным положениям диссертации.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Высокая степень достоверности результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом полученных данных в экспериментальных исследованиях, проведенных на нелинейных крысах и мышах, с использованием современных методических подходов и высокотехнологичного оборудования, а также адекватных методов статистической обработки результатов.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на XIX региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2014, диплом II степени); 73-ей, 74-ой и 75-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2015, 2016 диплом II степени, 2017). По

результатам диссертационного исследования опубликовано 13 печатных работ, из них 7 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 8 таблицами и 20 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), описания материалов и методов исследования (глава II), экспериментальной части (главы III-V), обсуждения результатов, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы, который содержит 313 источников, включая 60 отечественных и 253 зарубежных авторов.

# ГЛАВА 1. РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ В НОРМЕ И ПРИ СТРЕССОРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1.1 Оксид азота в функционировании сердечно-сосудистой системы

Оксид азота (NO) открыт в 1970-х годах Furchgott R.F. как сигнальная молекула в регуляции сердечно-сосудистой системы, имеющая множество молекулярных мишеней и выполняющая в организме различные физиологические функции. NO модулирует выброс нейромедиаторов в центральной нервной системе (ЦНС), участвует в механизмах формирования памяти, вносит вклад в развитие воспалительной реакции и др. [Furchgott R.F. et al., 1980; Tripathi P. et al., 2007; Kochar N.I. et al., 2011; Saracyn M. et al., 2014; Lundberg J.O. et al., 2015; Кузнецова В.Л. и др., 2015; Kumar S. et al., 2017].

Оксид азота играет ключевую роль в регуляции работы сердечно-сосудистой системы. Снижение его синтеза и биодоступности ассоциировано с такими патологическими состояниями, как артериальная гипертензия, атеросклероз, инсульт, хроническая сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, сосудистые осложнения сахарного диабета [Ritchie R.H. et al., 2017]. Оксид азота синтезируется практически во всех типах клеток, составляющих миокард, и регулирует его функционирование через сосудисто-зависимые и сосудисто-независимые механизмы. Первые включают регуляцию тонуса коронарных сосудов, тромбообразования, пролиферативных и противовоспалительных процессов в них, а также ангиогенез. Вторые складываются из прямого действия NO на сократимость кардиомиоцитов, регуляции процессов возбуждения и модуляции (пресинаптической и постсинаптической) нервной сигнализации и митохондриального дыхания [Massion P.V. et al., 2003; Rastaldo R. et al., 2007].

Оксид азота синтезируется с помощью ферментов – NO-синтаз (NOS) из L-аргинина и молекулярного кислорода. Все NOS в качестве кофакторов

используют NADPH, FAD, FMN, ВН<sub>4</sub>, гем и связывают кальмодулин. Нейрональная NO-синтаза (nNOS, NOS I) конститутивно экспрессируется в центральных и периферических нейронах и некоторых других типах клеток. Она образует NO, который обеспечивает синаптическую пластичность в центральной нервной системе, центральное регулирование артериального давления, расслабление гладкой мускулатуры и вазодилатацию через периферические нитроксидаергические нейроны [Förstermann U. et al., 2012]. Кроме того, нейрональная изоформа NOS является основным эндогенным источником оксида азота в миокарде. Она преимущественно локализована в саркоплазматическом ретикулуме и, в меньшей степени, в митохондриях и на сарколемме кардиомиоцитов [Xu K.Y. et al., 2003; Oceandy D. et al., 2007; Burkard N. et al., 2010]. NO, произведенный nNOS, ослабляет инотропную функцию сердца путем изменения активности Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа на плазматической мембране и снижения концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> по цГМФ-зависимому пути. При этом функционирование Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обменника не изменяется [Sears C.E. et al., 2003]. Находясь в саркоплазматическом ретикулуме, NO способствует релаксации миоцитов путем активации Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азы и обратного захвата внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> [Zhang Y.H., 2008]. Кроме того, nNOS может повлиять на функционирование миокарда путем регуляции активности митохондриальных комплексов: NO, синтезированный этой изоформой NOS, способен ингибировать дыхательную цепь митохондрий, в частности комплексы I, III и IV, тем самым уменьшать потребление кислорода и влиять на сердечный метаболизм [Zhang Y.H. et al., 2012; Chouchani E.T. et al., 2013; Zhang Y.H. et al., 2014].

Эндотелиальная NOS (eNOS, NOS III) в основном экспрессируется в эндотелиальных клетках. Тем не менее, этот изофермент был обнаружен и в кардиомиоцитах. Подобно нейрональной NOS, активность eNOS регулируется Ca<sup>2+</sup>-кальмодулином и возрастает с повышением концентрации внутриклеточного кальция. eNOS локализуется в кавеолах эндотелиоцитов, где может взаимодействовать с белком кавеолином-1, оказывающим на нее ингибирующее действие [Förstermann U. et al., 2012, Carnicer R. et al., 2013]. NO,

синтезированный эндотелиальной NO-синтазой, участвует в регуляции артериального давления, имеет вазопротекторное и антиатеросклеротическое действие, а также модулирует сократительную функцию сердца [Massion P.B. et al., 2003; Förstermann U. et al., 2006; Wohlfart P. et al., 2008].

Индуцибельная нитрооксидсинтаза (iNOS, NOS II) экспрессируется во многих типах клеток. В кардиомиоцитах активность iNOS индуцируется биологическим стрессом (ишемия-реперфузия) или в ответ на введение различных агентов (липополисахарид, цитокины и т.д.) [Парахонский А.П., 2010; Chu M. et al., 2012]. Она синтезирует большое количество NO, который, взаимодействуя с супероксид-анионом, превращается в пероксинитрит и оказывает цитотоксическое действие [De Boo S. et al., 2009; Förstermann U. et al., 2012]. Гиперэкспрессия iNOS в кардиомиоцитах способна привести к развитию кардиомиопатии, нарушению электрофизиологических свойств миокарда и внезапной сердечной смерти [Mungrue I.N. et al., 2002].

Эксперименты, проведенные с использованием доноров NO, показывают двухфазность влияний на сократительную функцию сердца и зависимость от дозы. Низкие концентрации NO увеличивают силу и частоту сердечных сокращений, тогда как более высокие концентрации вызывают отрицательный ино- и хронотропный эффекты [Muller Strahl G. et al., 2000; Casadei B. et al., 2003; Massion P.B. et al., 2003]. На основании этого можно сделать вывод, что оксид азота – один из физиологических регуляторов сократимости миокарда.

Основной мишенью NO в сердечно-сосудистой системе является растворимая гуанилатциклаза, активация которой приводит к образованию вторичного мессенджера – циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). цГМФ активирует протеинкиназу G (ПК G), осуществляющую фосфорилирование различных клеточных субстратов [Francis S.H. et al., 2010]. Известно, что ПК G опосредует уменьшение внутриклеточной концентрации кальция. Это приводит к гиперполяризации мембраны кардиомиоцита, ингибированию фосфорилирования легких цепей миозина и снижению сократимости мышцы [Ковалев И.В. и др., 2004; Thoonen R. et al., 2013]. Кроме того, NO и цГМФ способны уменьшать

работу кальциевых каналов L-типа посредством активации фосфодиэстеразы, что вызывает снижение уровня внутриклеточного цАМФ, а также активности протеинкиназы А (ПКА), которая, в свою очередь, также обладает средством к кальциевому каналу L-типа [Balligand J.L. et al., 1997; Strijdom H., 2009]. Все эти процессы приводят к изменению сократимости миокарда.

Кроме того, оксид азота способен влиять и на работу других ионных каналов. На изолированных желудочковых миоцитах мышей и морских свинок показано, что NO ингибирует натриевые каналы посредством активации обоих типов протеинкиназ (G и A) [Ahmmed G.U. et al., 2001; Tamargo J. et al., 2010]. Имеются данные, что функционирование АТФ-зависимых калиевых каналов модулируется оксидом азота через образование цГМФ и активность ПКГ [Bank A.J. et al., 2000; Gomez R. et al., 2008; Лазуко С.С. и др., 2016].

Еще одним механизмом регуляции оксидом азота активности белков является S-нитрозилирование, которое заключается во взаимодействии NO с SH-группой аминокислот. Важными субстратами S-нитрозилирования, влияющими на функцию сердца, являются рецепторы, ферменты, факторы транскрипции, а также ионные каналы ( $\text{Ca}^{2+}$ -канал L-типа,  $\text{Na}^{+}$ -канал,  $\text{K}^{+}$ -каналы и др.) [Hess D.T. et al., 2005; Strijdom H. et al., 2009; Козина О.В., 2010].

Из анализа литературных данных ясно, что оксид азота оказывает существенное модулирующее влияние и на функцию митохондрий в сердце [Kanai A.J. et al., 2004; Dungal P. et al., 2013; Javadov S. et al., 2013; Медведев Д.В. и др., 2014; Thiriet M., 2015]. Появляется также все больше доказательств того, что NO может быть произведен и внутри самих митохондрий особой NOS – митохондриальной (mtNOS). Kanai A.J. и его коллеги показали отсутствие активности NOS у nNOSalpha-нокаутных мышей в изолированных митохондриях сердца с помощью электрохимического электрода [Kanai A.J. et al., 2001]. Тем не менее, эти наблюдения не были подтверждены впоследствии. Имеются данные, что mtNOS может быть клеточным ферментом, который прикреплен к наружной поверхности мембраны митохондрий [Henrich M. et al., 2002; Gao S. et al., 2004; Lacza Z. et al., 2009]. Оксид азота, синтезируемый этой NOS, может регулировать

дыхательную функцию митохондрий как за счет прямого воздействия на ЦПЭ, так и посредством модуляции накопления митохондриального кальция [Dedkova E.N. et al., 2004; Davidson S.M. et al., 2006; Shiva S., 2013]. Есть доказательства, что NO ингибирует открытие митохондриальных проницаемых временных пор («mitochondrial permeability transition pore», mPTP) при высокой концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  [Gonzalez D.R. et al., 2009].

### **1.1.2 Роль оксида азота в механизмах симпатических и парасимпатических влияний на сердце**

Как известно, оксид азота является нейромодулятором и участвует в регуляции влияний вегетативной нервной системы на сердце [Schultz H.D., 2009]. NO аутокринно и паракринно воздействует на протекание процессов в возбуждающих и тормозных синапсах, включая изменение активности NMDA- и ГАМК-рецепторов, а также  $\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Garthwaite J., 2008].

Оксид азота модулирует симпатические и парасимпатические влияния на сердце [Drexler H., 1996; Robertson D. et al., 2011; Абрамочкин Д.В. и др., 2012]. В исследовании Kishi T. показано, что гиперэкспрессия эндотелиальной NO-синтазы в ростральном вентролатеральном отделе продолговатого мозга вызывала ингибирование симпатических влияний [Kishi T., 2013]. В работе Fellet A.L. продемонстрировано увеличение ЧСС на фоне введения неселективного ингибитора NO-синтаз L-NAME (N-Nitro-L-arginine methyl ester) у крыс с вегетативной блокадой [Fellet A.L., 2003]. Также известно, что оксид азота оказывает отрицательные ино- и хронотропный эффекты [Pellegrino D. et al., 2009; Fink M.P. et al., 2012] и ослабляет увеличение сократимости миокарда в ответ на адреностимуляцию [Massion P.V. et al., 2003; Насырова А.Г., 2004]. Это согласуется с данными, что инотропное действие катехоламинов усиливается при ингибировании NO-синтаз [Rossi B.R. et al., 2009; Зарипова Р.И. и др., 2016]. В работе Насыровой А.Г. и соавт. показано снижение ЧСС у крыс при введении нитроглицерина, связанное с угнетением адренергических влияний,

опосредуемых  $\beta$ -адренорецепторами. Доноры оксида азота повышают время предсердно-желудочкового проведения импульса, о чем свидетельствует увеличение интервала PQ на ЭКГ при введении нитроглицерина [Насырова А.Г. и др., 2005]. В основе механизма ингибирующего действия оксида азота на симпатическую стимуляцию лежит снижение поступления кальция в клетку, а также угнетение высвобождения нейромедиатора норадреналина из симпатических нервных окончаний [Paterson D., 2001; Насырова А.Г. и др., 2005]. Кроме того, в работе Каримова Ф.К. было выявлено уменьшение синтеза NO при снижении адренергических влияний вследствие фармакологической десимпатизации [Каримов Ф.К., 2008]. Стимуляция  $\beta$ 1-адренорецепторов сердца катехоламинами приводит к повышению синтеза eNOS оксида азота, который активирует гуанилатциклазу и образование цГМФ. Последний активирует ПКГ, оказывающую ингибирующее влияние на функционирование кальциевых каналов L-типа, вследствие чего уменьшается поступление  $Ca^{2+}$  в клетку и ослабление инотропного ответа сердца на действие адреналина и норадреналина, тем самым снижая гиперактивацию адренорецепторов кардиомиоцитов [Paton J.F. et al., 2002] (Рисунок 1).

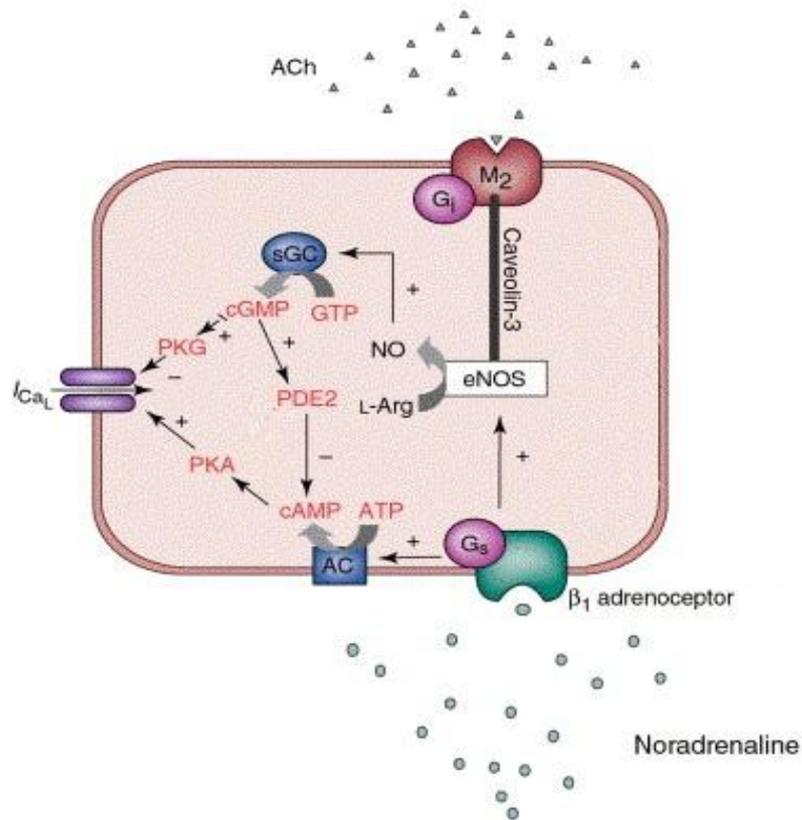


Рисунок 1. Механизм модуляции оксидом азота симпатических и парасимпатических влияний на сократимость миокарда [Paton J.F. et al., 2002].

*Примечание: ACh – ацетилхолин, AC – аденилатциклаза, sGC – растворимая гуанилатциклаза, ATP – аденозинтрифосфат (АТФ), GTP – гуанозинтрифосфат (ГТФ), cAMP – циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), cGMP – циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), PKA – протеинкиназа А, PKG – протеинкиназа G,  $I_{CaL}$  – кальциевый канал L-типа, L-ARG – L-аргинин.*

NO модулирует и парасимпатические влияния на миокард. Оксид азота, синтезированный эндотелиальной NO-синтазой в ответ на стимуляцию М-холинорецептора, участвует в ингибировании кальциевых каналов [Fellet A.L. et al., 2008; Cawley S.M. et al., 2011] (Рисунок 1). Известно, что усиление активности парасимпатической нервной системы может стимулировать синтез NO путем увеличения экспрессии эндотелиальной NOS [Klein H.U. et al., 2010; Macedo F.N. et al., 2016]. У нокаутных по гену nNOS мышей наблюдалось снижение тормозного эффекта вагуса на ЧСС [Choate J.K. et al., 2001]. Имеются данные, что оксид азота облегчает высвобождение ацетилхолина блуждающим нервом, что приводит к отрицательному хронотропному эффекту [Насырова А.Г. и др., 2005].

В раннем исследовании Balligand J. и соавт. сообщалось о снижении отрицательного хронотропного эффекта при активации холинергической системы и блокаде NOS в культивируемых спонтанно сокращающихся миоцитах желудочков крысы [Balligand J.L. et al., 1993]. Han X. и соавт. впоследствии продемонстрировали, что ингибиторы NOS предотвращают холинергическую инактивацию кальциевого канала в клетках синоатриального узла кролика [Han X. et al, 1998].

Таким образом, оксид азота является регулятором сократительной функции миокарда, модулирует симпатические, парасимпатические влияния на сердце, функционирование ионных каналов, а также дыхательную функцию митохондрий и работу других органелл кардиомиоцитов.

## **1.2 Кардиотропные эффекты глутаминовой кислоты и связь ее с системой оксида азота**

Глутаминовая кислота (глутамат) является ключевым возбуждающим медиатором и стимулирует передачу возбуждения в синапсах ЦНС. Она относится к заменимым аминокислотам и может образовываться в результате реакций трансаминирования. Свое действие глутаминовая кислота осуществляет через два типа рецепторов: ионо- и метаботропные, локализованные как в ЦНС, так и в периферических органах, в том числе и в сердце [Gill S.S. et al., 2001; Nedergaard M. et al., 2002].

Ионотропные рецепторы подразделяются на три подтипа: NMDA- (**N**-methyl-**D**-Aspartate), AMPA- ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) и KA- (**K**ainate) рецепторы, при активации которых происходит деполяризация плазматической мембраны и формирование потенциала действия вследствие открывания сопряженных с ними ионных каналов –  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Стоит отметить, что стимуляция NMDA-рецепторов вызывает вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь клетки по ассоциированным с ним ионным каналам, что и отличает его от других

подвидов ионотропных рецепторов [Петров В.И. и др., 1997; Traynelis S.F. et al., 2010].

В свою очередь metabotropic рецепторы делятся на 8 подтипов: mGluRs1 – mGluRs8. Они ассоциированы с G-белком, а передача сигнала осуществляется по инозитолфосфатному либо аденилатциклазному путям. Метаботропные рецепторы участвуют в механизмах синаптогенеза, а также в модуляции нейронной и глиальной возбудимости [Niswender C.M. et al., 2010].

Известно, что глутаминовая кислота обладает кардиопротекторными свойствами и играет определенную роль в патофизиологии сердечно-сосудистых нарушений [Jennings A. et al., 2015; Zheng Y. et al., 2016]. Глутамат участвует в центральном контроле функционирования сердечно-сосудистой системы. Синтезируемый в амигдале, он активирует симпатические влияния на миокард неанестезированных крыс [Neckel H. et al., 2012]. Данные, полученные Busnardo C. и соавт. указывают, что прессорный ответ после введения L-глутамата в паравентрикулярное ядро гипоталамуса обусловлен двумя путями: симпатическим (опосредуемым NMDA-рецепторами) и вазопрессинергическим [Busnardo C. et al., 2009]. Микроинъекция агониста первой группы metabotropic рецепторов приводила к увеличению активности в поясничном отделе симпатической цепочки и АД у спонтанно-гипертензивных крыс и линии Вистар-Киото. Причем эти эффекты были менее выражены при предварительном введении антагониста этой группы рецепторов [Li D.P. et al., 2010]. Участие глутаматергической системы в активации симпатической нервной системы подтверждено и в работе Chapp A.D. и соавт., которые показали, что этанол, введенный в центральное ядро амигдалы, вызывал увеличение симпатической активности поясничных нервов и повышение АД. Причем эти ответы снижались при совместной инъекции этанола и блокаторов ионотропных рецепторов глутамата [Chapp A.D. et al., 2014].

Периферический механизм действия глутамата в миокарде в основном связан с его влиянием на метаболизм. Показано, что инфузия препарата изолированного сердца раствором с 10 мМ содержанием глутамата, приводит к

сохранению функции левого желудочка при ишемии-реперфузии. Этот эффект может быть связан с функционированием  $K^+$ -каналов [Kristiansen S.B., 2005]. Глутамат проявляет выраженные антигипоксические свойства, активирует глюконеогенез и секрецию инсулина. Он участвует в обезвреживании и выведении из организма аммиака, перемещении восстановленных эквивалентов из цитоплазмы в митохондрии для окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ в кардиомиоцитах, а также является субстратом для цикла Кребса [Arsenian M., 1998]. Глутамат обладает и антиоксидантными свойствами, образуя вместе с цистеином и глицином трипептид – глутатион, участвующий в окислительно-восстановительных процессах в клетках сердца [Damy T. et al., 2009; Gu M. et al., 2016]. Имеются данные, что в условиях стресса производные глутаминовой кислоты способствуют сохранению инотропных резервов сердца [Тюренков И.Н. и др., 2014].

Большой вклад в кардиотропные эффекты глутаминовой кислоты вносит и система оксида азота. Сердечно-сосудистые реакции, вызванные микроинъекцией L-глутамата в вентральный гиппокамп, опосредуются NMDA-рецепторами и включают локальную активацию нейрональной NOS и гуанилатциклазы. Кроме того, в механизме этих реакций главную роль играет активация симпатической нервной системы сердца [Santini C.O. et al., 2013]. Результаты исследований, полученные Busnardo C. и соавт. свидетельствуют о том, что глутамат, введенный в паравентрикулярное ядро гипоталамуса, приводит к снижению АД и брадикардии у анестезированных крыс, и эти эффекты опосредованы системой NO [Busnardo C. et al., 2010]. Микроинъекции L-глутамата в диагональную полосу Брока уретан-анестезированных крыс вызывают дозозависимые депрессорные и брадикардические реакции, опосредованные системой NMDA-рецептор – NO – гуанилатциклаза [Tavares R.F. et al., 2007]. В литературе имеются и другие данные, свидетельствующие о регуляции оксидом азота кардиоваскулярных эффектов глутамата [Dias A.C. et al., 2005; Пожилова Е.В. и др., 2015; Raquel H.A. et al., 2016].

В глутаматергических синапсах стимуляция ионотропных глутаматных рецепторов, в частности подтипа NMDA, приводит к поступлению ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль, который после связывания с кальмодулином активирует нейрональную изоформу NOS [Santos R.M. et al., 2012]. nNOS специфична тем, что обладает N-концевым PDZ-мотивом, и это позволяет ферменту связываться с другими PDZ-содержащими белками, например с белком постсинаптической плотности PSD-95 (postsynaptic density protein 95) [Lee H.J. et al., 2010]. PSD-95 одновременно связывается с субъединицей NR2 NMDA-рецептора, формируя, таким образом, супрамолекулярный комплекс, в результате чего  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая nNOS пространственно расположена в области повышенной концентрации ионов кальция, поступающих через активированный канал рецептора [Christopherson K.S. et al., 1999] (Рисунок 2). В этих условиях и при наличии субстратов (L-аргинин, кислород) и нескольких кофакторов (NADPH, FMN, FAD,  $\text{BH}_4$ , гем) nNOS катализирует превращение L-аргинина в L-цитруллин и NO. В поддержку этого свидетельствует снижение активности NOS при блокаде NMDA-рецептора [Park D.J. et al., 2009].

Оксид азота также способен модулировать глутаматергическую передачу. Физическая связь NMDA-рецептора и nNOS с помощью PSD95 может регулироваться адаптерными белками, например, белком CAPON (*ca boxy-terminal PDZ ligand of n NOS*), который конкурирует за домен PDZ и отделяет nNOS от NMDA-рецептора [Ledo A. et al., 2004]. Другие белки, связанные с CAPON (Dexras 1, синапсин) обеспечивают структурную целостность мультибелкового комплекса и могут быть мишенями для NO [Jaffrey S.R. et al., 2002]. Кроме того, оксид азота модулирует глутаматергическую нейротрансмиссию через селективное, nNOS-зависимое S-нитрозилирование белков, регулирующее поглощение глутамата и его метаболизм [Raju K. et al., 2015].

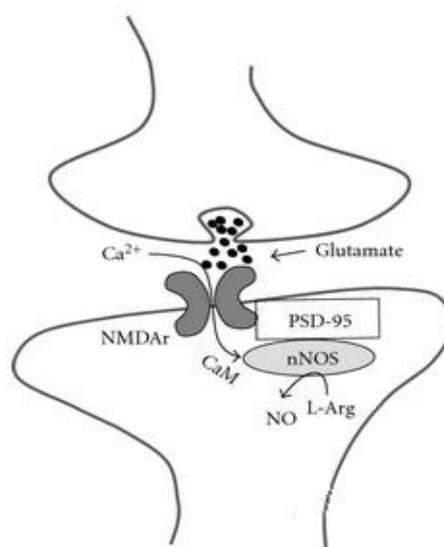


Рисунок 2. Основной путь синтеза оксида азота в глутаматергическом синапсе [Santos R.M. et al., 2012].

*Примечание: NMDAr – NMDA-рецептор; CaM – кальмодулин; L-Arg – L-аргинин.*

Таким образом, кардиотропные влияния глутамата осуществляются при тесном взаимодействии с системой оксида азота, включающее в себя сложные механизмы регуляции синтеза NO и модуляции им глутаматергической нейротрансмиссии.

### **1.3 Влияние ГАМК на функционирование сердечно-сосудистой системы и участие оксида азота в механизме ее действия**

Гамма-аминомасляная кислота – важнейший тормозный нейромедиатор ЦНС. Основным путем синтеза ГАМК в ЦНС является ее образование из глутамата при участии фермента глутаматдекарбоксилазы. Действие ГАМК реализуется тремя типами рецепторов: ионотропными (ГАМК<sub>A</sub>- и ГАМК<sub>C</sub>-рецепторами) и метаботропными (ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами).

ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы расположены на постсинаптической мембране в ЦНС и являются основными рецепторами, опосредующими тормозную нейротрансмиссию в мозге млекопитающих. Каждая изоформа состоит из пяти

гомологичных субъединиц, окружающих центральный  $5\text{-HT}_2\text{A}$ -селективный канал [Sigel E. et al., 2012; Jembrek M.J. et al., 2015]. Синаптическая передача приводит к высвобождению ГАМК, открытию хлорных каналов ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, тем самым вызывая гиперполяризацию мембраны и развитие фазного или тонического торможения в зависимости от концентрации ГАМК [Farrant M. et al., 2005]. ГАМК<sub>C</sub>-рецепторы также являются ионотропными, имеют пентамерную структуру, субъединицы формируют ионный канал, однако субъединичный состав отличен от ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, в связи с чем они активируются или ингибируются иными фармакологическими препаратами. Известно, что ГАМК<sub>C</sub>-рецепторы ингибируют высвобождение медиатора в терминалях биполярных клеток [Kumar M.S. et al., 2012], однако их физиологическая роль в настоящее время мало изучена.

Метаботропные ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы ассоциированы с G-белком, состоят из двух субъединиц и представляют собой аллостерически регулируемый гетеродимер. Локализуясь пре- и постсинаптически, они снижают высвобождение нейротрансмиттеров, уменьшают вход кальция и запускают цепь реакций, способствующих открытию калиевых каналов [Benarroch E.E., 2012]. Все это приводит к возникновению медленных тонических постсинаптических токов.

ГАМК участвует как в центральной, так и в периферической регуляции сердечно-сосудистой системы. Еще в 50-х годах прошлого столетия было установлено снижение артериального давления и ЧСС у животных при введении ГАМК в боковые желудочки мозга [Takahashi H. et al., 1955]. Впоследствии в экспериментальных исследованиях показано, что при блокаде ГАМК-рецепторов медиальной миндалины бикикулином повышается АД, ЧСС [Yoshida S. et al., 2002]. Двусторонние микроинъекции активатора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов мусцимола в роstralную вентролатеральную область продолговатого мозга бодрствующих крыс сопровождалась значительным снижением среднего АД и увеличением ЧСС, причем этот эффект полностью был нивелирован блокадой  $\beta_1$ -адренорецепторов. Полученные данные свидетельствуют о наличии связи симпатического отдела нервной системы и ГАМК. Однако у анестезированных

крыс при введении мусцимола в указанную область мозга наблюдалось снижение АД, ЧСС и симпатической активности [Menezes R.C. et al., 2007]. Результаты исследования, проведенного Ма Р. и соавт., также демонстрируют снижение АД при центральной стимуляции ГАМК-рецепторов [Ma P. et al., 2015].

Помимо центральных эффектов ГАМК на сердце, она оказывает действие и на периферии. В некоторых исследованиях показано наличие ГАМКа-рецепторов в сердце [Fischer H. et al., 2005; Tyagi N. et al., 2007]. Имеются данные, что добавление ГАМК в перфузируемый раствор приводит к снижению ЧСС изолированного сердца морской свинки. Также было показано, что диазепам в качестве аллостерического активатора ГАМКа-рецептора вызывает отрицательный ино- и хронотропный эффекты, что, вероятно, связано с подавлением кальциевого тока, регистрируемого на изолированных кардиомиоцитах морской свинки [Bentzen B.H. et al., 2011].

ГАМК оказывает и метаболическое действие, являясь промежуточным продуктом шунта Робертса, функционирование которого имеет большое значение в экстремальных условиях дефицита энергии [Lukyanova L.D. et al., 2015]. Кроме того, она ограничивает процессы ПОЛ, усиливает утилизацию глюкозы и скорость окислительного фосфорилирования, а также участвует в регуляции осмотических процессов [Perfilova V.N. et al., 2007; Тюренков И.Н. и др., 2008; Chen Z. et al., 2013; Di Lorenzo A. et al., 2016].

Известно о тесной функциональной взаимосвязи NO- и ГАМК-ергических систем. Высокая концентрация оксида азота в мозге после введения L-аргинина увеличивает проницаемость гематоэнцефалического барьера для ГАМК [Shyamaladevi N. et al., 2002]. Есть данные, что вазодилатирующий эффект ГАМК опосредуется ГАМКа-рецепторами и NO [Kamran M. et al., 2013]. Показано, что оксид азота может увеличивать высвобождение ГАМК в клетках сетчатки глаза [Maggesissi R.S. et al., 2009], а также ингибировать основной фермент ее деградации – ГАМК-трансаминазу [Jayakumar A.R. et al., 1999]. NO в форме S-нитрозотиолов при наномолярных концентрациях опосредует высвобождение ГАМК из нервных окончаний [Tarasenko A.S., 2016]. Кроме того, известно, что

оксид азота вызывает высвобождение ГАМК и других нейромедиаторов в корковых нейронах, которое блокируется ингибитором растворимой гуанилатциклазы. Вследствие этого можно предположить, что эффект NO на аминокислотную нейротрансмиссию опосредован образованием цГМФ в корковых нейронах [Merino J.J. et al., 2014].

#### **1.4 Механизмы повреждающего действия стресса на сердце**

Основоположником теории стресса считается канадский ученый Г. Селье. Стресс или общий адаптационный синдром он рассматривал как реакцию организма на предъявляемые ему требования, характеризующуюся триадой симптомов: гипертрофией коры надпочечников, инволюцией тимуса и наличием эрозий/язв желудка [Selye H., 1936].

По современным представлениям стресс – это неспецифическая реакция организма, возникающая в ответ на угрозу нарушения гомеостаза с изменением функционирования различных органов и систем. По своей природе стресс-реакция носит адаптационный характер и возникает под влиянием факторов окружающей среды [Goldstein D.S. et al., 2007; Теряева Н.Б., 2008; Михайлис А.А., 2010; Goldstein D.S., 2010]. Это могут быть психосоциальные воздействия, а также биогенные стрессоры – различные химические и биологические раздражители, изменение физических условий существования организма [Schneiderman N. et al., 2005; Lovallo W.R., 2015].

Психосоциальные стрессоры, в отличие от биогенных, напрямую не могут инициировать стресс: причиной физиологических изменений на такие воздействия является результат когнитивных и эмоциональных реакций на эти раздражители, а не они сами [Everly G.S. et al., 2012]. В интерпретации стимула как "угрожающего" участвуют неокортекс и лимбическая система, откуда импульсы поступают в задний (симпатическая активация) и передний (парасимпатическая активация) отделы гипоталамуса с последующим

высвобождением соответствующих нейромедиаторов и развитием биологических эффектов [McCorry L.K., 2007] (Рисунок 3).

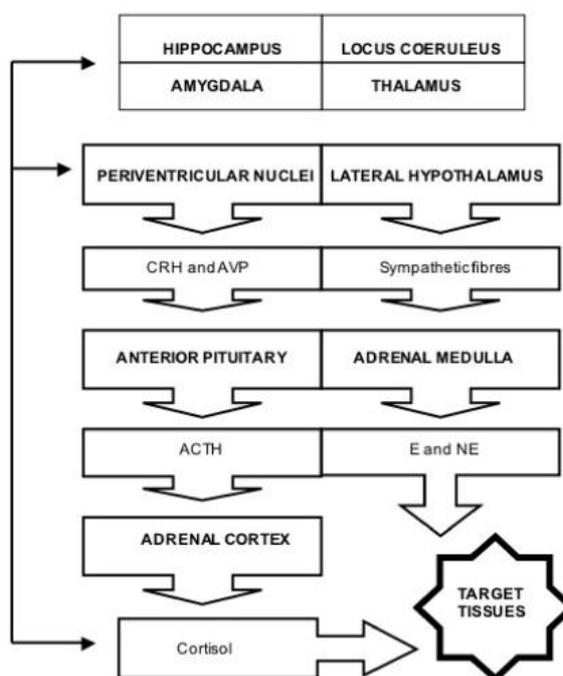


Рисунок 3. Схематическое изображение формирования стресс-реакции [Hardy K. et al., 2006].

*Примечание: CRH – кортикотропин-рилизинг гормон, AVP – вазопрессин, ACTH – адренокортикотропный гормон, E and NE – адреналин и норадреналин.*

При формировании стресс-реакции изменяют свою активность многие физиологические системы организма, наиболее значимой среди которых является гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ГГН). Она, несомненно, играет ключевую роль в реализации комплексного ответа на угрозу повреждения [Deak T. et al., 2015]. Нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса синтезируют кортикотропин-рилизинг гормон (КРГ), откуда он через портальную систему поступает в переднюю долю гипофиза, где локализованы рецепторы к нему в большом количестве. Основные нейроэндокринные эффекты КРГ опосредуются рецептором 1 типа (Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1, CRHR1), стимуляция которого вызывает активацию аденилатциклазы, синтез цАМФ, что, в конечном итоге, приводит к выбросу адренокортикотропного гормона (АКТГ) в общий кровоток. Вторым модулятором секреции АКТГ является вазопрессин,

также синтезируемый в паравентрикулярном ядре гипоталамуса и синергически действующий с КРГ. АКТГ связывается со специфическим рецептором меланокортина 2 типа (Melanocortin-2 receptor, MC2-R) в клетках пучковой зоны коркового вещества надпочечников и посредством аденилатциклазного пути передачи сигнала индуцирует стероидогенез [Clark A.J. et al., 2003; Smith S.M. et al., 2006; Aguilera G. et al., 2008; Grammatopoulos D.K., 2012; Stephens M.A. et al., 2012; Jasnic N. et al., 2012].

Глюкокортикоиды являются окончательными гормональными эффекторами ГГН-оси. Рецепторы к глюкокортикоидам (GR- $\alpha$  и GR- $\beta$ ) повсеместно распространены в организме. Неактивированный глюкокортикоидный рецептор находится в цитоплазме, однако, после связывания с лигандом комплекс транслоцируется в ядро и взаимодействует с ДНК, активируя или супрессируя гормон-зависимые гены [Anacker C. et al., 2011, Spencer S.J. et al., 2011]. Имеются данные, что GR- $\alpha$  и GR- $\beta$  присутствуют в митохондриях клеток животных и человека и модулируют энергетический обмен [Du J. et al., 2009; Ratman D. et al., 2013].

Значительную роль в формировании стресс-реакции играет амигдала. Нисходящий поток нервных импульсов переходит из дорсомедиального ядра амигдаларного комплекса к боковой и задней области гипоталамуса, затем через грудной отдел спинного мозга поступают в мозговое вещество надпочечников [Sah P. et al., 2003], стимулируя синтез и секрецию катехоламинов – адреналина и норадреналина – главных гормонов стресса. Описанный механизм составляет основу реакции "fight or flight" ("борьбы или бегства") – состояние вследствие гиперсимпатикотонии, при котором организм мобилизуется для устранения угрозы [Everly G.S. et al., 2012; Кузьменко Е.В., 2013]. В амигдале имеются КРГ-нейроны, стимуляция которых глюкокортикоидами приводит к развитию стресса [Pitts M.W. et al., 2009]. С другой стороны, тормозное действие на активность амигдалы и паравентрикулярного ядра гипоталамуса оказывает гиппокамп, играя важную роль в "отключении" стресс-системы. Из литературных данных известно,

что атрофия или повреждение гиппокамп приводит к пролонгированию ответа на действие стрессового фактора [McEwen B.S., 2007].

В контексте адаптивного ответа на стресс глюкокортикоиды оказывают катаболические эффекты с целью использовать все энергетические ресурсы организма для противодействия стрессовому фактору. Глюкокортикоиды усиливают интенсивность процессов глюконеогенеза и гликогенолиза в печени, тем самым вызывая гипергликемию, активируют липолиз и распад белков до аминокислот, которые могут использоваться в качестве дополнительного субстрата для обеспечения клетки энергией. Кроме того, глюкокортикоиды противодействуют анаболическим эффектам инсулина, половых гормонов и др. [Kyrou I. et al., 2007; Chrousos G.P., 2009].

Таким образом, действие глюкокортикоидов, синтез и секреция которых регулируется по принципу отрицательной обратной связи на различных уровнях ГГН-оси, направлено на восстановление гомеостаза. Тем не менее, в зависимости от типа, длительности и интенсивности стрессового стимула, гиперсекреция глюкокортикоидов может стать потенциальной угрозой для здоровья [McEwen B.S., 2007; McEwen B.S. et al., 2015; Vyas S. et al., 2016]. Имеются данные, что сильное воздействие глюкокортикоидов в раннем детском возрасте является фактором предрасположенности к метаболическим, нейропсихическим и нейродегенеративным заболеваниям [Harris A. et al., 2011; Moisiadis V.G. et al., 2014; Chen Y. et al., 2016]. Кроме того, есть достаточное количество экспериментальных доказательств, что повышенный уровень глюкокортикоидов при длительном стрессовом воздействии вызывает структурное ремоделирование нейронов с нарушением синаптической передачи, а также изменения в функционировании глиальных клеток [Sousa N. et al., 2012]. Увеличение активности ГГН-оси при стрессе также приводит к различным метаболическим нарушениям, в частности к развитию метаболического синдрома [Kyrou I. et al., 2009; Tamashiro K.L. et al., 2011]. Гиперкортицизм способен вызывать резистентность к инсулину различных органов и тканей, тем самым провоцируя развитие сахарного диабета 2 типа [Chrousos G.P. et al., 2009].

Острый и хронический стресс приводят к нарушению функционирования многих органов и систем, однако одной из основных мишеней стресс-реакции является сердечно-сосудистая система. Известно, что глюкокортикоиды действуют в сочетании с катехоламинами, чтобы облегчить доступность глюкозы и увеличить скорость метаболических реакций, что, в свою очередь, усиливает спонтанное образование свободных радикалов и приводит к интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Рисунок 4) [Du J. et al., 2009; Zafir A. et al., 2009; Spiers J.G. et al., 2013; Hong I.S. et al., 2014; Yang H.J. et al., 2014]. Активные формы кислорода (АФК) и азота являются одними из самых мощных угроз повреждения кардиомиоцитов. Они стимулируют пролиферацию фибробластов сердца, активируют матриксные протеиназы, что приводит к неадекватному ремоделированию миокарда, снижению его сократительной функции и развитию сердечной недостаточности [Tsutsui H. et al., 2011]. К АФК и азота относят супероксид-анион ( $O_2^{*-}$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), синглетный кислород, гидроксил-радикал ( $OH^*$ ), а также пероксинитрит ( $ONOO^-$ ). Как правило, в клетках существует равновесие между прооксидантной и антиоксидантной системами организма, которая включает в себя ферментативные (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза) и неферментативные компоненты (глутатион, витамины А, Е, трансферрин, церулоплазмин и др.). Окислительный стресс возникает, когда происходит нарушение в этом равновесии, и способен привести к некрозу или апоптозу клетки [Trachootham D. et al., 2008; Fulda S. et al., 2010].

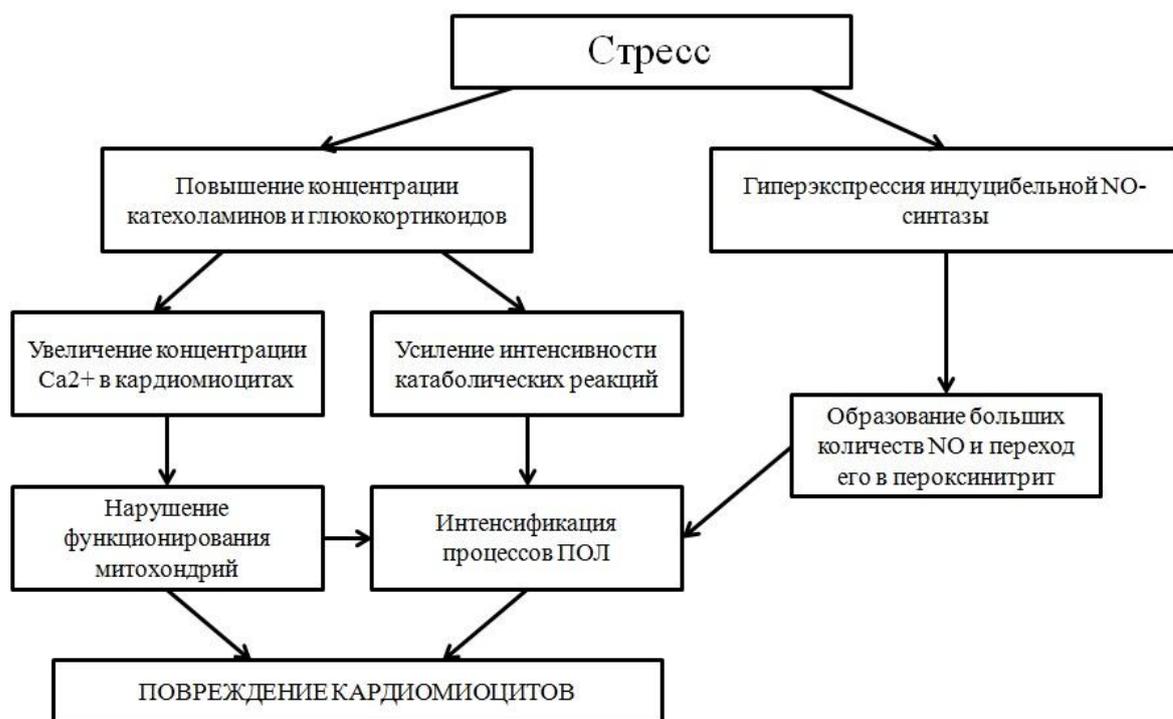


Рисунок 4. Схематическое изображение патогенеза стрессорного повреждения кардиомиоцитов.

Митохондрии являются главными источниками АФК в кардиомиоцитах [Murphy E. et al., 2007; Izem-Meziane M. et al., 2012]. В физиологических условиях перенос электронов к  $O_2$  тесно связан с окислительным фосфорилированием и синтезом АТФ. Тем не менее, окислительное фосфорилирование – это основной эндогенный источник АФК, таких как  $O_2^{*-}$ ,  $H_2O_2$  и  $OH^*$ , которые являются токсичными побочными продуктами дыхания [Wallace D.C., 2005]. По некоторым данным, именно  $O_2^{*-}$  обладает кардиотоксическим эффектом [Behonick G.S. et al., 2001]. Повышение скорости митохондриального фосфорилирования под действием гормонов стресса увеличивает утечку электронов из цепи переноса электронов (ЦПЭ) и последующее производство  $O_2^{*-}$ . Большое количество митохондрий в кардиомиоцитах и высокая интенсивность окислительного фосфорилирования способствуют образованию  $O_2^{*-}$ , который превращается в  $H_2O_2$  под действием марганцевой супероксиддисмутазы (Mn-SOD) [Sawyer D.B. et al., 2000]. Белки ЦПЭ содержат в качестве кофакторов металлы (комплексы II, III и IV). Вследствие этого,  $H_2O_2$  вступает в реакции Фентона и Габера-Вейса с

образованием высокореакционных гидроксильных радикалов. В условиях повышенной секреции глюкокортикоидов ухудшается функционирование ЦПЭ и увеличивается продукция АФК митохондриями. АФК способны инактивировать железосерные (Fe-S) центры I, II и III комплексов ЦПЭ, а также аконитазу цикла Кребса, что приводит к уменьшению синтеза АТФ и ещё большему производству АФК [Chen Y.R. et al., 2014; Spiers J.G. et al., 2014].

Еще одним источником АФК и азота при стрессорном воздействии является усиление экспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы и образование больших количеств оксида азота [Olivenza R. et al., 2000; Chen H.J. et al., 2014]. NO вступает в реакцию с супероксид-анионом с образованием высокореактивного метаболита – пероксинитрита, который способен вызвать апоптоз в кардиомиоцитах и эндотелиоцитах, уменьшение спонтанных сокращений кардиомиоцитов, привести к необратимому ингибированию митохондриальной дыхательной цепи, дефициту АТФ и гибели клеток [Ishida H. et al., 1996; Grishko V. et al., 2003; Pacher P. et al., 2007; Sarti P. et al., 2012; Chen H.J. et al., 2015].

Кроме того, усиленное образование АФК и интенсификация процессов ПОЛ является одним из патогенетических звеньев эндотелиальной дисфункции. Синтезируемый в эндотелиоцитах eNOS оксид азота является главным фактором вазодилатации и сосудистого гомеостаза. При стресс-реакции снижается экспрессия гена eNOS, уменьшается биодоступность кофакторов и, как следствие, ухудшается эндотелий-зависимая вазорелаксация. В результате действия гормонов симпатической нервной системы происходит увеличение сосудистого тонуса, усиление агрегации тромбоцитов, а также активация ренин-ангиотен-альдостероновой системы, что приводит к усилению дисфункции эндотелия [Chung I.M. et al., 2010; Toda N. et al., 2011; Lenna S. et al., 2014; Carda A.P.P. et al., 2015; Cocco H. et al., 2015].

Эндотелиальная дисфункция является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [Goff D.C. et al., 2014; Widmer R.J. et al., 2014]. Дисбаланс сосудосуживающих и сосудорасширяющих факторов в сторону вазоконстрикторов приводит к артериальной гипертензии [Dharmashankar K. et al.,

2010; Brandes R.P., 2014]. Способствуя развитию атеросклероза, дисфункция эндотелия вызывает развитие ишемии миокарда и острого коронарного синдрома [Caroli C. et al., 2015]. Болевой синдром, развивающийся при этом, усиливает стресс-реакцию [Меерсон Ф.З., 1993].

Избыток катехоламинов способствует накоплению кальция и натрия в кардиомиоцитах и предрасполагает к возникновению аритмий, вплоть до фибрилляции и остановки сердца. Кроме того, гормоны стресса и избыток  $\text{Ca}^{2+}$  активируют липидную триаду повреждения мембран, заключающуюся в интенсификации ПОЛ, активации фосфолипаз и детергентного действия жирных кислот, в результате чего происходит выход лизосомальных протеолитических ферментов, повреждение сарколеммы и саркоплазматического ретикулума кардиомиоцитов, ядерной ДНК. Вследствие нарушения работы кальциевого насоса еще более нарастает избыток кальция, что приводит к нарушению функционирования митохондрий, контрактуре миофибрилл и снижению сократимости миокарда [Меерсон Ф.З., 1984, Меерсон Ф.З., 1993, Хныченко Л.К. и др., 2003].

Таким образом, стресс представляет собой нейрогуморальный ответ организма на действие раздражающих факторов и сопровождается различными функциональными и морфологическими изменениями многих органов и систем, в том числе и сердечно-сосудистой.

### **1.5 NO как стресс-лимитирующая система**

Регуляция стресс-системы, формирующейся в результате воздействия стрессовых факторов, осуществляется как по принципу отрицательной обратной связи, так и с помощью стресс-лимитирующих систем, способных ограничивать чрезмерную активацию стресс-системы и, следовательно, ее повреждающее действие на органы и ткани, в том числе на сердце [Меерсон Ф.З., 1984]. К классическим стресс-лимитирующим системам относят ГАМК-, опиоид-, серотонинергическую и др., которые модулируют активность стресс-системы,

оказывая тормозное действие на КРГ-нейроны гипоталамуса и секреторные клетки гипофиза, предупреждая развитие стрессорных повреждений миокарда [Пшенникова М.Г., 1987; Nikolaev V.I., 1995; Гвак Г.В. и др., 2012].

В последнее время к стресс-лимитирующим системам относят и систему оксида азота, способную ограничивать ключевые звенья стресс-реакции [Малышев И.Ю. и др., 1998; Gulati K. et al., 2015].

NO является важным модулятором активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [Puzserova A. et al., 2016]. NO-зависимый контроль центральных звеньев стресс-реакции подтверждается тем фактом, что гипофиз получает богатую NO-ергическую иннервацию от гипоталамуса [Vanhatalo S. et al., 1995]. Оксид азота контролирует и секрецию КРГ, АКТГ [Karanth S. et al., 1993, Rivier C., 2001]. У крыс, подвергшихся острой иммобилизации, наблюдается значительное увеличение мРНК nNOS в передней доле гипофиза [Kishimoto J. et al., 1996]. Имеются данные, что NO ингибирует секрецию АКТГ и кортикостерона при вазопрессин-стимулированной активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [Bugajski J. et al., 1999]. В работе Turnbull A.V. и соавт. показано, что введение неселективного ингибитора NO-синтаз L-NAME оказывало стимулирующее влияние на продукцию АКТГ при локальном воспалительном ответе [Turnbull A.V. et al., 1996]. Данные, полученные *in vivo* Kim K.C. и соавт. подтверждают ингибирующее влияние эндогенного NO на активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, поскольку блокада NOS приводила к усиленному высвобождению АКТГ и кортикостерона в ответ на внутривенное введение липополисахарида или ИЛ-1 [Kim K.C. et al., 1998]. Кроме того, в литературе имеются доказательства ограничения оксидом азота выработки вазопрессина [Plotnikoff N.P., 2006]. Ограничивая секрецию гормонов гипоталамуса и гипофиза, NO приводит к снижению активности и периферического звена стресс-системы [Малышев И.Ю. и др., 1998] (Рисунок 5).

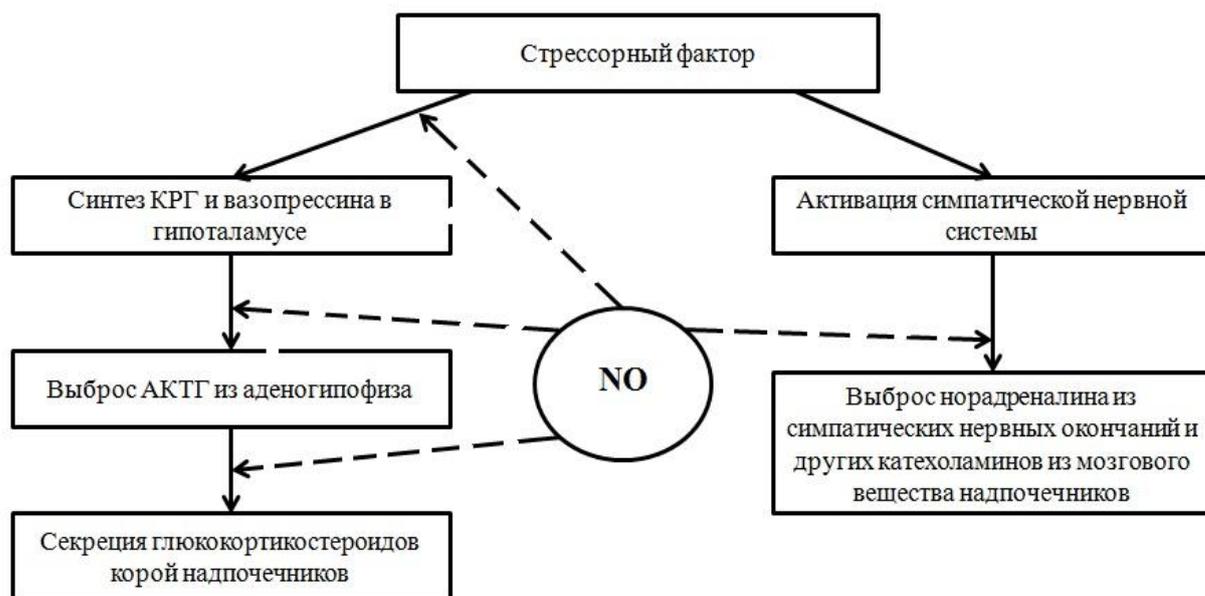


Рисунок 5. Стресс-лимитирующие эффекты системы оксида азота.

*Примечание: непрерывной стрелкой указаны активирующие влияния, пунктирной – ингибирующие.*

На периферии оксид азота способен блокировать выброс стресс-гормонов как на уровне надпочечников, так и нервных окончаний [Малышев И.Ю. и др., 1998; Herbert J. et al., 2006]. Kishimoto J. и соавт. было обнаружено усиление активности nNOS в коре надпочечников после кратковременного иммобилизационного стресса [Kishimoto J. et al., 1996]. У самцов крыс острое стрессорное воздействие приводило к повышению уровня кортикостерона плазмы, которое ослаблялось предварительным введением субстрата для синтеза NO – L-аргинина; противоположный эффект наблюдался при введении ингибитора nNOS – 7-нитроиндазола [Gulati K. et al., 2006]. Исходя из литературных данных, оксид азота модулирует и выброс катехоламинов мозговым веществом надпочечников. Так, в работе Jang S.J. и соавт. показано увеличение концентрации адреналина, норадреналина и дофамина в перфузате изолированного надпочечника после добавления ингибитора NOS – L-NAME [Jang S.J. et al., 2011]. В исследовании Vicente S. и соавт. продемонстрировано, что обработка хромаффинных клеток ингибиторами NO-синтазы приводила к дозозависимому увеличению базальной секреции катехоламинов. По мнению авторов,

это явление аналогично таковому в нейронах, что указывает на экспрессию конститутивной nNOS в этих клетках, и было подтверждено вестерн-блот-анализом. Тоническое образование NO посредством nNOS в хромаффинных клетках сохраняет базальную секрецию катехоламинов на низких уровнях [Vicente S. et al., 2002].

NO, являясь важнейшим звеном в адаптации организма, обладает кардиопротекторным эффектом при действии стрессорных факторов [Lundberg J.O. et al., 2015]. В литературе имеются данные, что стрессорное воздействие приводит к снижению экспрессии эндотелиальной изоформы NO-синтазы и усилению экспрессии iNOS в миокарде с преобладанием токсических эффектов NO [Герасимова Н.Г., 2008]. Ингибирование синтеза оксида азота L-NAME, вызывает значительное уменьшение инотропной функции сердца при стрессорном воздействии, а также стрессустойчивости животных, причем более выраженное, чем при блокаде ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикикулином. Это позволяет говорить о более сильном стресс-лимитирующем действии системы NO по сравнению с ГАМК-ергической системой [Перфилова В.Н. и др., 2016].

Таким образом, система оксида азота является одной из самых мощных стресс-лимитирующих систем организма, снижает высвобождение гормонов стресса как на центральном, так и на периферическом уровнях. Ограничивая интенсивность протекания стресс-реакции, она препятствует реализации её повреждающих эффектов и повышает адаптацию к стрессорным факторам.

На основании представленного обзора литературы можно сделать заключение, что оксид азота участвует в функционировании сердечно-сосудистой системы, оказывая регуляторное действие на сократимость миокарда путем модуляции симпатических и парасимпатических влияний, работы ионных каналов, а также на центральном уровне, изменяя активность медиаторных систем и нейротрансмиттеров. NO обладает и мощным стресслимитирующим эффектом, участвуя в механизмах защиты клеток и тканей от повреждений. Поэтому актуальным остается поиск веществ, обладающих кардио- и стресспротекторным действием и влияющих на систему оксида азота.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 204 нелинейных крысах и 60 белых мышах, которые были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Животные содержались в условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторных исследований при проведении доклинических испытаний в РФ (ГОСТ 33216 – 2014), а также приказа Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», в соответствии с рекомендациями ВОЗ по экспериментальной работе с использованием лабораторных животных. Проведение экспериментов осуществлялось в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук, а также международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях (1997). Работа была одобрена Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (протокол № 198-2014 от 25.04.2014 г).

Были изучены соединения: глүфимет – производное глүтаминовой кислоты и фенибут – производное ГАМК, синтезированные на кафедре органической химии ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена» (г. Санкт-Петербург). По химической структуре глүфимет представляет собой диметилловый эфир гидрохлорида 3-фенилглүтаминовой кислоты (рис. ба), фенибут - гидрохлорид  $\gamma$ -амино- $\beta$ -фенилмасляной кислоты (рис. бб). Выбор данных соединений обусловлен их выраженными кардиопротекторными свойствами при стрессорном повреждении сердца согласно ранее проведенным исследованиям [Перфилова В.Н. и др., 2014; Тюренокв И.Н. и др., 2014; Садикова Н.В., 2016].

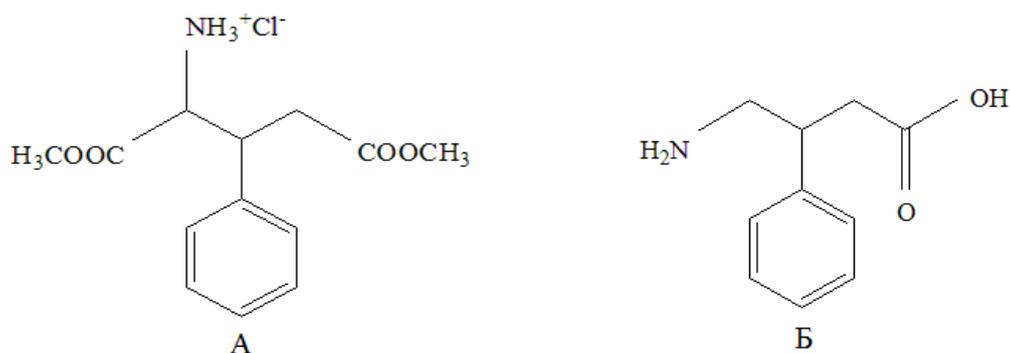


Рисунок 6. Структурные формулы глүфимета (а) и фенибута (б).

Острое стрессорное воздействие моделировали подвешиванием самок, находящихся в стадии диэструса, за дорсальную шейную кожную складку на 24 часа с помощью зажима Кохера [Ковалев Г.В. и др., 1983].

Соединения вводили внутривбрюшинно за 10 минут до стрессирования в наиболее эффективных дозах: глүфимет 28,7 мг/кг, фенибут – 50,0 мг/кг [Перфилова В.Н. и др., 2009; Садикова Н.В., 2016].

Блокаду NO-синтаз осуществляли с использованием неселективного ингибитора метилового эфира N-нитро-L-аргинина (L-NAME, Sigma, США) в дозе 10 мг/кг [Садикова Н.В., 2016], селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы – аминуганидина (Sigma, США) в дозе 50,0 мг/кг [Laszlo F. et al., 1995], нейрональной NOS – 7-нитроиндазола (Sigma, США) в дозе 50,0 мг/кг [Kwon Y.B. et al., 1999].

### **2.1.1 Изучение *in vitro* влияния глүфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий крыс при активации симпатической и парасимпатической систем и блокаде NO-синтаз**

Эксперименты были проведены на 22 крысах-самках. После декапитации животного извлекали сердце и помещали его в ванночку с оксигенированным раствором Кребса. Состав раствора Кребса, мМ: NaCl – 120,0; KCl – 4,8; MgSO<sub>4</sub> – 2,5; CaCl<sub>2</sub> – 2,6; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 25,0; глюкоза – 5,34; pH 7,4; температура раствора 25°C (все реактивы - Реахим, Россия). Затем отделяли

предсердия и вертикально помещали в резервуар с тем же раствором установки для изолированных органов Ugo Basile – 4000 (Ugo Basile, Италия), прикрепляя верхний конец препарата к изометрическому датчику Ugo Basile 7004-F (Ugo Basile, Италия). Запись кривой регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения «LabScribe2». К верхнему и нижнему краю препарата присоединяли электроды. Препарат стимулировали электрическими импульсами с помощью электростимулятора (ЭСЛ-2, СССР) (частота стимуляции от 2,5 до 5,0 Гц (от 150 до 300 имп/мин), задержка 0,08 мс, длительность 3,0 мс) в течение 5 секунд при каждой частоте. Концентрация исследуемых соединений и L-NAME в перфузируемом растворе Кребса составляла  $1 \times 10^{-5}$  М, время инкубирования 10 минут. Готовились истинные растворы изучаемых веществ в дистиллированной воде. Симпатический и парасимпатический отделы нервной системы активировали добавлением в перфузат дофамина и ацетилхолина соответственно в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М, время инкубации 1 минута. Эксперимент проводили по следующей схеме: после промывания препарата изолированных предсердий добавляли дофамин в перфузируемый раствор и регистрировали амплитуду сокращений (исход). Далее препарат промывали раствором Кребса до достижения исходной амплитуды сокращения и добавляли исследуемое соединение/ингибитор, дофамин и вновь регистрировали амплитуду сокращений. После этого препарат снова промывали раствором Кребса до получения первоначальной амплитуды сокращения. Аналогично проводили исследование и при активации М-холинорецепторов ацетилхолином. Рассчитывали изменение прироста (при активации адренорецепторов) и снижения (при активации холинорецепторов) амплитуды сокращения относительно исходных данных в процентах.

$$\Delta A = ((A_2 \times 100) / A_1) - 100, \text{ где}$$

$\Delta A$  – прирост / снижение сократимости, %

$A_1$  и  $A_2$  – амплитуда сокращений до и после добавления индуктора (дофамина или ацетилхолина).

Для определения изменения расслабления препарата предсердий оценивали смещение от изолинии амплитуды сокращений (рисунок 7).

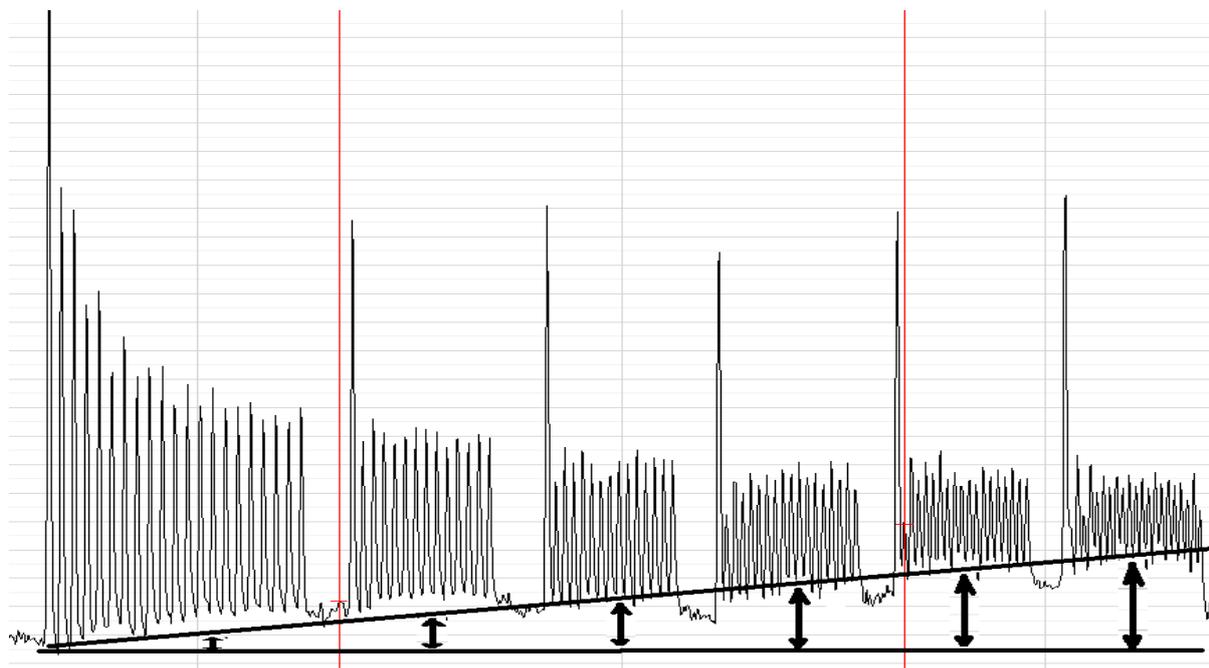


Рисунок 7. Схематическое изображение определения расслабления изолированных предсердий.

*Примечание: стрелками показано смещение от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий при различной частоте навязанного ритма.*

### **2.1.2 Изучение *ex vivo* влияния исследуемых соединений на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных и стрессированных крыс при активации симпатической и парасимпатической систем и блокаде NOS**

Исследование было проведено на 82 крысах-самках. Были сформированы следующие группы животных: 1) положительный контроль – интактная,  $n = 7$ ; 2) интактная + глуфимет,  $n = 7$ ; 3) интактная + фенибут,  $n = 7$ ; 4) интактная + L-NAME,  $n = 6$ ; 5) интактная + L-NAME + глуфимет,  $n = 7$ ; 6) интактная + L-NAME + фенибут,  $n = 7$ ; 7) отрицательный контроль – стресс + физ.раствор,  $n = 7$ ; 8) стресс + глуфимет,  $n = 7$ ; 9) стресс + фенибут,  $n = 7$ ; 10) стресс + L-NAME,  $n = 7$ ; 11) стресс + L-NAME + глуфимет,  $n = 7$ ; 12) стресс + L-NAME + фенибут,  $n = 7$ .

Подготовку препарата изолированных предсердий проводили по схеме, описанной в п.п. 2.1. После "отмывки" препарата раствором Кребса и установления постоянной амплитуды сокращения в рабочий раствор добавляли

дофамин в концентрации  $10^{-6}$  и регистрировали амплитуду сокращений. После этого препарат вновь промывали раствором Кребса до получения первоначальных показателей и добавляли ацетилхолин. Регистрировали амплитуду навязанного ритма, после чего вновь промывали предсердия раствором до получения исходного уровня сокращений. Результаты оценивали по изменению амплитуды сокращений и расслаблению миокарда.

## **2.2 Изучение NO-ергического компонента стресспротекторного действия исследуемых соединений**

Эксперименты проведены на 80 крысах-самках. Животные были разделены на группы: 1) положительный контроль – интактная,  $n = 8$ ; 2) отрицательный контроль – стресс + физ. раствор,  $n = 8$ ; 3) стресс + глуфимет,  $n = 8$ ; 4) стресс + фенибут,  $n = 8$ ; 5) стресс + 7-нитроиндазол,  $n = 8$ ; 6) стресс + 7-нитроиндазол + глуфимет,  $n = 8$ ; 7) стресс + 7-нитроиндазол + фенибут,  $n = 8$ ; 8) стресс + амингуанидин,  $n = 8$ ; 9) стресс + амингуанидин + глуфимет,  $n = 8$ ; 10) стресс + амингуанидин + фенибут,  $n = 8$ . Все вещества вводились внутривентриально однократно до стрессирования.

**Измерение артериального давления** проводили у всех животных до и после стрессирования с помощью прибора для неинвазивного измерения (Kent Scientific Corporation, Канада). Крыс предварительно приучали к нахождению в пластиковых пеналах-держателях в течение одного часа на протяжении трех дней. У животных всех групп регистрировали среднее артериальное давление (срАД).

**Для изучения параметров системы гемостаза** производили забор крови у всех групп наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг) животных из брюшного отдела аорты. Кровь стабилизировали 3,8% водным раствором цитрата натрия в соотношении 1:9 (0,5 мл цитрата натрия и 4,5 мл крови) с последующим ее центрифугированием при 1000 об/мин 10 минут для получения плазмы.

**Степень и скорость агрегации тромбоцитов** изучали на двухканальном лазерном анализаторе (НПФ «Биола», Россия) по методу Born G. в модификации

Габбасова З.А. и соавт. [Габбасов З.А. и др., 1989], основанном на изменении светопропускания «богатой тромбоцитами плазмы» (Platelet-Rich Plasma, PRP) после добавления в нее индуктора агрегации. «Бедную тромбоцитами плазму» (Platelet-Poor Plasma, PPP) получали путем повторного центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 минут. 270 мкл PRP добавляли в кювету и прогревали в ячейке агрегометра 3 минуты при 37<sup>0</sup>С. В качестве индуктора агрегации в кювету вносили 30 мкл АДФ (НПО РЕНАМ, Россия) в концентрации 5 мкМ. Калибровку прибора осуществляли по PRP с добавлением 10 мкл ЭДТА в концентрации 0,037 мг/мл (ООО «Агат-Мед», Россия). Степень агрегации тромбоцитов определяли как максимальное приращение светопропускания после добавления индуктора и выражали в процентах, скорость агрегации – как максимальный наклон кривой светопропускания (%/мин).

*Изучение показателей плазменно-коагуляционного звена* гемостаза осуществляли на программируемом оптико-механическом коагулометре – АПГ2-01 Минилаб 701 (ООО «Эйлитон», Россия) с использованием тест-наборов для определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), протромбинового времени (ПВ) и концентрации фибриногена (ФГ) (НПО РЕНАМ, Россия). Для определения АЧТВ к 50 мкл исследуемой плазмы добавляли 50 мкл реагента, который представляет собой водный раствор эллаговой кислоты в комплексе с фосфолипидами. Спустя 3 минуты инкубации при 37<sup>0</sup>С добавляли 50 мкл 0,025 М раствора кальция хлорида и фиксировали время образования сгустка. При исследовании ПВ к 50 мкл цитратной плазмы (37<sup>0</sup>С) добавляли реактив, содержащий избыток тканевого тромбопластина и ионов кальция и фиксировали время образования сгустка. Концентрацию фибриногена определяли по калибровочной кривой с известным содержанием фибриногена. Для этого к 100 мкл разведенной в имидазоловом буфере плазме (10 мкл плазмы : 90 мкл рабочего раствора имидазолового буфера) добавляли 50 мкл раствора тромбина.

**Для получения митохондрий клеток сердца и головного мозга** органы извлекали, промывали ледяным физиологическим раствором и гомогенизировали

в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвейема на льду с добавлением сахарозной среды выделения в соотношении 1:3 (для мозга) и 1:5 (для сердца). Состав среды выделения, мМ: трис-сульфатный буфер – 20,0, pH 7,4; сахароза – 70,0; маннит – 220,0; ЭДТА – 2,0, а также 0,9% раствор NaCl (все реактивы – Реахим, Россия). Полученные гомогенаты органов центрифугировали 10 мин с охлаждением (центрифуга РС-6, «Поликом», Россия) при 600 g для осаждения клеточного дебриса и неразрушенных клеток. Надосадочную жидкость осторожно отбирали и вновь центрифугировали 20 минут с охлаждением при 8000 g. Полученный супернатант использовали для определения концентрации конечных метаболитов оксида азота, а осадок ресуспендировали в 1 мл среды выделения и использовали в качестве фракции митохондрий [Lanza I.R. et al., 2009]. На всех этапах температура окружающей среды поддерживалась на уровне +4-8°C.

**Изучение дыхательной функции митохондрий** проводили полярографическим методом измерения концентрации кислорода в ячейке с помощью электрода Кларка на приборе "Эксперт-001-4(01)" ("Эконикс-Эксперт", Россия). Функциональное состояние I и II комплексов дыхательной цепи оценивали путем определения интенсивности потребления кислорода после добавления соответствующих субстратов окисления (5 мМ малат + 5 мМ глутамат, 5 мМ сукцинат соответственно, Sigma, США).

Исследование проводили по следующей схеме: после заполнения ячейки объемом 1 мл полярографической средой и после выравнивания линии на графике зависимости силы тока (мкА) от времени, последовательно добавляли в ячейку 100 мкл субстрата окисления (малат/глутамат или сукцинат), 100 мкл суспензии митохондрий, 100 мкл АДФ (200 мкМ, Sigma, США). На всем протяжении измерения использовали магнитную мешалку. Состав среды полярографии, мМ:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 5,0; сахароза – 300,0; KCl – 10,0; ЭДТА – 1,0 (Реахим, Россия).

Скорость дыхания выражали в нмоль  $\text{O}_2$  / мин / мг белка митохондрий и регистрировали в следующих метаболических состояниях:  $V_3$  – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием в присутствии АДФ,  $V_4$  – скорость дыхания

после исчерпания добавленного АДФ. Кроме того рассчитывался коэффициент дыхательного контроля как отношение  $V_3/V_4$  [Brand M.D. et al., 2011].

**Интенсивность процессов ПОЛ** определяли по концентрации первичных (диеновые конъюгаты (ДК)) и вторичных (дикетоны, малоновый диальдегид (МДА)) продуктов и активности антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГлП)) в полученных митохондриальных фракциях из гомогенатов исследуемых органов.

**Определение уровня диеновых конъюгатов и дикетонов** производили по модифицированной методике Placer Z. [Ушкалова В.Н. и др., 1993]. Метод основан на спектрофотометрическом определении концентрации ДК и дикетонов в гептан-изопропанольных экстрактах из суспензии митохондрий в ультрафиолетовой области спектра. Для этого к 2,0 мл смеси гептан-изопропанол добавляли 400 мкл дистиллированной воды и 100 мкл биоматериала. Полученную смесь встряхивали в течение 10 минут, а затем центрифугировали при 1000 об / мин в течение 10 минут. Органическую фазу отбирали и фотометрировали при длине волны 233 нм (ДК) и 278 нм (дикетоны) на спектрофотометре Helios (Великобритания). Полученные результаты выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка.

**Концентрацию малонового диальдегида** определяли по методике Стальной И.Д. [Стальная И.Д. и др., 1977], основанной на образовании окрашенных комплексов МДА с тиобарбитуровой кислотой. К смеси, содержащей 600 мкл 1,3% раствора ортофосфорной кислоты и 40 мкл раствора сульфата железа (II) добавляли 200 мкл суспензии митохондрий и смесь тщательно перемешивали. Затем вносили по 200 мкл 0,7% раствора тиобарбитуровой кислоты и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. После охлаждения под проточной водой полученную смесь центрифугировали 10 минут при 8000 об/мин. После этого отбирали супернатант и фотометрировали при 532 нм на спектрофотометре Helios (Великобритания). Концентрацию МДА рассчитывали с помощью молярного коэффициента экстинкции ( $1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) и выражали в ммоль / л / мг белка.

**Активность каталазы** оценивали по методу Королюка М.А. [Королюк М.А. и др., 1988]. Данная методика основана на образовании окрашенного комплекса пероксида водорода и соли аммония. Для этого к 1,0 мл 0,03% раствора пероксида водорода в Na-P-буфере (рН 6,8) добавляли 250 мкл суспензии митохондрий и 250 мкл дистиллированной воды. После инкубации 20 минут при 37<sup>0</sup>С в пробирки вносили по 500 мкл 4,0% раствора молибдата аммония и центрифугировали 20 минут при 8000 об/мин. Оптическую плотность супернатанта определяли на спектрофотометре Helios (Великобритания) при длине волны 410 нм. Расчёт производили по формуле, вычисленной по калибровочной кривой. Активность каталазы выражали в мг H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 1 мин / мг белка.

**Суммарную активность супероксиддисмутазы** определяли по степени торможения реакции окисления кверцетина [Костюк В.А. и др., 1990]. К 3,4 мл фосфатного буфера (рН 7,8), который содержит 0,08 мМ этилендиаминтетраацетата и 0,8 мМ тетраметилэтилендиамина, добавляли 100 мкл раствора кверцетина в диметилсульфоксиде (ДМСО) (0,2 мг/мл) и 150 мкл суспензии митохондрий. Измеряли исходную оптическую плотность проб и через 20 минут при  $\lambda = 406$  нм. Расчет процента торможения производили по формуле:

$$I = 100 - ((A_{\text{оп}}0' - A_{\text{оп}}20') / (A_{\text{контр}}0' - A_{\text{контр}}20')) \times 100,$$

где I – процент ингибирования;  $A_{\text{оп}}0'$  и  $A_{\text{оп}}20'$  - исходная оптическая плотность опытной пробы и через 20 минут инкубации соответственно;  $A_{\text{контр}}0'$  и  $A_{\text{контр}}20'$  - исходная оптическая плотность контрольной пробы и через 20 минут инкубации соответственно.

Активность СОД выражали в условных единицах на 1 мг белка.

**Определение активности глутатионпероксидазы** производили по методу Моина В.М. (1986), который основан на изменении концентрации восстановленного глутатиона в реакции с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБК). Для этого в две серии пробирок, содержащих по 400 мкл буферного раствора (0,1 Н трис-НСl, рН 8,5, содержащего 4,8 мМ восстановленного глутатиона), вносили по 50 мкл исследуемого объекта, в

контрольной пробе осаждали белок добавлением 100 мкл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем добавляли по 50 мкл свежеприготовленного 10 мМ раствора гидроперекиси трет-бутила. После 5 минут инкубации при комнатной температуре в пробирки с опытными пробами добавляли по 100 мкл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Далее отбирали по 50 мкл надосадочной жидкости и добавляли в нее по 2,0 мл буферного раствора и по 50 мкл реактива Элмана (10 мМ раствора ДТНБК в этаноле). Фотометрировали после 5 минут инкубации при комнатной температуре при длине волны 412 нм на спектрофотометре Helios (Великобритания). Активность фермента определяли по разности концентраций GSH в опытной и контрольной пробах. Расчёт активности ГлП проводили по калибровочной кривой и выражали в ммоль GSH за 1 мин на 1 мг белка.

#### ***Определение концентрации белка***

Концентрацию белка определяли методом Lowry О.Н. и соавт. [Lowry, О.Н., 1951]. Для этого 100 мкл суспензии митохондрий смешивали с 1 мл 1М NaOH и кипятили 10 мин до появления прозрачного раствора, доводили до 10 мл дистиллированной водой, отбирали 250 мкл, добавляли 2 мл биуретового реактива, 10 минут инкубировали, добавляли 0,1 мл реактива Фолина – Чокальтеу, инкубировали 30 мин и колориметрировали при 750 нм в двух повторностях. Концентрацию белка определяли по калибровочному графику, который строился по разведениям стандартного раствора белка в концентрациях 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5 мг.

**Определение концентрации конечных метаболитов оксида азота** в сыворотке крови и гомогенатах сердца и головного мозга проводили скрининг-методом в модификации Метельской В.А. [Метельская В.А. и др., 2005]. Метод основан на одновременном восстановлении нитратов в нитриты с помощью хлорида ванадия (III) (Sigma, США) и реакции диазотирования нитритом сульфаниламида с развитием окраски раствора и последующей спектрофотометрией. Для этого в опытные и контрольные лунки 96-луночного планшета с плоским дном отдельно вносили по 100 мкл сыворотки крови и

гомогенатов органов после депротеинизации 95% раствором этанола в соотношении 1:2 (200 мкл сыворотки : 400 мкл этанола), добавляли по 100 мкл хлорида ванадия (III) в 1н соляной кислоте в концентрации 8 мг/мл. Далее в опытные лунки добавляли по 100 мкл реактива Грисса, состоящего из равных частей раствора I (0,05% раствор N-нафтилэтилендиамина в воде) и раствора II (1% раствор сульфаниламида в 30% уксусной кислоте), в контрольные лунки добавляли раствор II. После 30-минутной инкубации спектрофотометрировали при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре вертикального сканирования (Тесан, Австрия). Концентрацию конечных метаболитов NO определяли по калибровочной кривой с использованием 1 мМ раствора нитрита натрия и выражали в мкмоль/л.

### **2.3 Изучение *in vitro* и *ex vivo* влияния исследуемых соединений на экспрессию индуцибельной NO-синтазы в перитонеальных макрофагах мышей**

Эксперименты проведены на 60 белых нелинейных мышах-самцах. Для получения активированных перитонеальных макрофагов создавали асептическое воспаление путем внутрибрюшинного введения 1 мл 3% раствора ферментативного пептона (Диа-М, Россия) по методике Fortier А.Н. и соавт. [Fortier А.Н. et al., 1982]. Мышей экспонировали в течение 72 часов, после чего декапитировали и фиксировали на препаровальном столике. Место предполагаемого разреза обрабатывали 95% раствором этанола и послойно рассекали ткани. Кожные покровы отсепаровывали «конвертом», обнажая стенку брюшной полости. После асептического вскрытия брюшины двукратно промывали брюшную полость охлажденным (до +4°С) раствором питательной среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ПанЭко, Россия) в объеме 5-10 мл. Пробирки с суспензиями перитонеальных макрофагов держали на льду для предотвращения адгезии клеток к пластиковой стенке. Суспензию клеток трижды центрифугировали при 600g в течение 10 минут. Полученный супернатант

отбирали, а осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM с добавлением 10% раствора фетальной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 0,05 mM 2-меркаптоэтанола и гентамицина (конечная концентрация 100 мкг/мл). После подсчета количества жизнеспособных клеток в камере Горяева с использованием 0,4% раствора трипанового синего (Invitrogen, США), их концентрацию доводили до  $2-3 \cdot 10^7$  в 1 мл. Количество жизнеспособных клеток составляло не менее 95 %. Полученную суспензию макрофагов в объеме 500 мкл высевали в плоскодонный 24-луночный планшет для клеточных культур, формировали интактную, контрольную и опытные группы из расчета по 9 лунок планшета для культивирования на группу. Макрофаги в контрольной и опытной группах активировали добавлением липополисахарида *E. coli* (ЛПС) (Sigma, США) в каждую лунку в концентрации 100 нг/мл [Mu L. et al., 2017]. В лунки с клетками опытных групп отдельно добавляли глуфимет и фенибут в концентрации  $10^{-5}$  M. После инкубации в течение 24 часов в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> при 95% влажности осторожно отбирали культуральную среду для последующего определения уровня конечных метаболитов NO. В лунки с оставшимся монослоем макрофагов добавляли раствор трипсин-ЭДТА для снятия клеток с культурального пластика, «отмывали» и ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 7,4). Полученную суспензию делили на равные части (по 100 мкл) для последующего определения в лизатах этих клеток концентрации индуцибельной изоформы NO-синтазы и цГМФ методом ИФА.

Для исследования *ex vivo* были сформированы следующие группы животных: 1) положительный контроль – интактная, n = 6; 2) отрицательный контроль – ЛПС + физ. раствор, n = 6; 3) ЛПС + глуфимет, n = 6; 4) ЛПС + фенибут, n = 6. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно два раза в день утром и вечером в течение всего времени экспонирования, ЛПС в дозе 100 мкг/кг – однократно внутрибрюшинно [Тюренков И.Н. и др., 2014]. Получение и культивирование макрофагов перитонеального экссудата проводили по выше описанной методике, за исключением добавления ЛПС и исследуемых соединений в лунки планшета для культивирования. Полученные клетки

лизировали и использовали для определения концентрации индуцибельной изоформы NO-синтазы и цГМФ методом ИФА.

**Определение концентрации конечных метаболитов оксида азота** в среде культивирования проводили по методу Vodovotz Y., и соавт. с использованием реактива Грисса [Vodovotz Y. et al., 1994].

**Определение концентрации iNOS и цГМФ** проводили методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) с помощью наборов «Cloud-Clone Corp» (США) и «Thermo Fisher Scientific» (США) с использованием микропланшетного фотометра вертикального сканирования (Tecan, Австрия).

#### **2.4 Изучение центрального NO-ергического компонента механизма действия исследуемых соединений**

Эксперименты были проведены на 20 крысах-самцах. Измеряли уровень систолического АД (сАД) после введения исследуемых веществ в боковые желудочки мозга наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг внутривенно) животных на фоне блокады NOS и ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Для этого катетеризировали бедренную артерию и соединяли катетер с гепариновым замком с ртутным манометром. После этого крысу переворачивали, крепили голову в головодержателе с помощью ушных фиксаторов, зубного держателя и носового зажима настольного цифрового стереотаксического аппарата (Shenzhen RWD Life Science Co, Китай). В области предполагаемого разреза кожи на голове удаляли шерсть, скальпировали череп хирургическими ножницами и скальпелем очищали кость от надкостницы. После остановки кровотечения и тщательного высушивания ватным тампоном определяли точку пересечения швов черепа (bregma). С помощью бормашины РЭСТАР-03 (ООО «РЭСТАР», Россия) в лобной кости черепа правого полушария высверливали трепанационное отверстие. С помощью микроманипулятора вводили исследуемые вещества в полость бокового желудочка головного мозга по координатам стереотаксического атласа относительно брегмы: 1,40 мм латеральнее, 0,36 мм дистальнее в лобно-



## 2.5 Методы статистической обработки

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 10». Предварительная проверка выборок данных на нормальность распределения осуществлялась по W-критерию Шапиро-Уилка. Различия между выборками оценивались по параметрическому t-критерию Стьюдента для парных сравнений и по критерию Ньюмена-Кейлса – для множественных. Статистически достоверными различия считали при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В МОДУЛЯЦИИ ПРОИЗВОДНЫМИ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ СИМПАТИЧЕСКИХ И ПАРАСИМПАТИЧЕСКИХ ВЛИЯНИЙ НА СЕРДЦЕ

#### 3.1 Изучение *in vitro* влияния глүфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных крыс при активации симпатической и парасимпатической системы и блокаде NOS

Основной системой, участвующей в регуляции сократительной функции сердца, является вегетативная нервная система. Активация симпатического отдела сопровождается положительным ино-, хроно-, дромо-, батмотропным эффектом, стимуляция холинорецепторов сердца оказывает противоположное действие. Симпатические и парасимпатические влияния на сердце способны модулировать оксид азота, причем существенную роль в этот механизм вносят ионы кальция [Насырова А.Г. и др., 2005; Robertson D. et al., 2011; Абрамочкин Д.В. и др., 2012].

Таким образом, целесообразным представлялось изучение *in vitro* влияний производного глүтаминовой кислоты и ГАМК на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных и стрессированных крыс при активации симпатической и парасимпатической систем и при неселективном ингибировании NO-синтаз при различной частоте навязанного ритма.

При частоте электростимуляции 150 имп/мин прирост сократимости изолированных предсердий крыс после добавления глүфимета был на 8,6% ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с таковым без производного глүтамата. Фенибут оказывал аналогичное действие: увеличение сократимости при активации симпатической системы после его введения оказалось на 9,5% ( $p < 0,05$ ) ниже относительно данного параметра без добавления фенибута. Прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий на фоне ингибирования NO-синтаз L-NAME при стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов был почти в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ) выше такового без блокады NOS. Добавление в ванночку с раствором Кребса глүфимета и фенибута на фоне блокады NOS не приводило к достоверному снижению

прироста сократимости при активации симпатической системы по сравнению с аналогичным показателем без введения исследуемых соединений, что, вероятно, свидетельствует о наличии NO-ергического компонента в механизме действия изучаемых производных нейроактивных аминокислот (Таблица 1).

При стимуляции с частотой 180 имп/мин выраженный прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий на фоне блокады NOS при активации симпатической системы был на 122,8% ( $p < 0,05$ ) выше такового только после добавления дофамина. Исследуемые соединения, добавленные в раствор Кребса после L-NAME, также значимо не изменяли увеличение сократимости изолированных предсердий по сравнению с аналогичным параметром на фоне ингибирования синтеза NO (Таблица 1).

При частоте стимуляции 210 имп/мин отмечено снижение прироста изучаемого показателя после добавления глуфимета на 15,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковым без глуфимета. Прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий после введения в раствор фенибута при стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов был на 19,5% ( $p < 0,05$ ) ниже такового только после добавления дофамина. Увеличение сократимости при активации симпатической системы после добавления L-NAME было на 113,7% ( $p < 0,05$ ) выше относительно данного параметра без дефицита оксида азота. Производные нейроактивных аминокислот на фоне ингибирования NOS так же, как и при других частотах навязанного ритма, не оказывали существенного влияния на прирост сократимости после стимуляции инотропной функции дофамином по сравнению с таковым без введения исследуемых веществ (Таблица 1).

Таблица 1. Влияние *in vitro* глуфимета и фенибута на изменение сократимости изолированных предсердий интактных крыс при активации симпатической и парасимпатической систем и блокаде NO-синтаз ( $M \pm \sigma$ ).

<b>Прирост сократимости при активации адренорецепторов дофамином, %</b>						
Частота электростимуляции, имп/мин	Исход	Глуфимет	Фенибут	L-NAME	L-NAME+глуфимет	L-NAME+фенибут
150	44,0 ± 4,1	40,2 ± 2,4* (-8,6%)	39,8 ± 2,5* (-9,5%)	99,0 ± 7,5* (+125,0%)	94,1 ± 4,3 (-4,9%)	95,7 ± 5,4 (-3,3%)
180	39,5 ± 3,1	36,2 ± 3,2 (-8,3%)	36,0 ± 2,5 (-8,9%)	88,0 ± 3,6* (+122,8%)	84,5 ± 6,3 (-4,0%)	86,1 ± 5,6 (-2,1%)
210	34,4 ± 4,3	29,0 ± 3,0* (-15,7%)	27,7 ± 2,7* (-19,5%)	73,5 ± 3,8* (+113,7%)	69,5 ± 4,9 (-5,4%)	71,3 ± 3,0 (-3,0%)
240	28,6 ± 3,0	22,1 ± 2,5* (-22,7%)	21,2 ± 3,3* (-25,9%)	58,7 ± 3,0* (+105,2%)	53,2 ± 3,6 <sup>#</sup> (-9,4%)	55,3 ± 3,2 (-5,8%)
270	23,1 ± 3,0	17,1 ± 3,6* (-26,0%)	16,6 ± 1,5* (-28,1%)	45,7 ± 2,9* (+97,8%)	42,1 ± 3,9 (-7,9%)	41,1 ± 4,7 (-10,1%)
300	20,2 ± 3,0	16,1 ± 2,1* (-20,3%)	15,5 ± 1,8* (-23,3%)	41,6 ± 3,4* (+105,9%)	37,7 ± 3,7 (-9,4%)	35,9 ± 4,4 <sup>#</sup> (-13,7%)
<b>Снижение сократимости при активации холинорецепторов ацетилхолином, %</b>						
Частота электростимуляции, имп/мин	Исход	Глуфимет	Фенибут	L-NAME	L-NAME+глуфимет	L-NAME+фенибут
150	23,7 ± 3,0	20,6 ± 1,6 (-13,1%)	25,4 ± 2,1 (+7,2%)	24,7 ± 2,4 (+4,2%)	25,0 ± 2,8 (+1,2%)	25,8 ± 1,4 (+4,4%)
180	24,5 ± 3,0	19,7 ± 1,7 (-19,6%)	24,3 ± 1,9 (-0,8%)	28,6 ± 2,0* (+16,7%)	26,6 ± 0,9 (-7,0%)	25,9 ± 2,3 (-9,4%)

Продолжение таблицы 1.

Снижение сократимости при активации холинорецепторов ацетилхолином, %						
Частота электростимуляции, имп/мин	Исход	Глуфимет	Фенибут	L-NAME	L-NAME+глуфимет	L-NAME+фенибут
210	23,3 ± 1,1	20,1 ± 1,9 (-13,7%)	21,3 ± 1,5 (-8,6%)	29,6 ± 1,8* (+27,0%)	26,8 ± 1,9 (-9,4%)	26,5 ± 3,0 (-10,5%)
240	20,6 ± 2,2	18,7 ± 2,0 (-9,2%)	21,8 ± 1,9 (+5,8%)	30,5 ± 3,5* (+48,0%)	26,5 ± 2,7 (-13,1%)	28,2 ± 1,8 (-7,5%)
270	17,5 ± 1,8	17,6 ± 1,5 (+0,6%)	17,6 ± 2,3 (+0,6%)	29,3 ± 2,2* (+67,4%)	25,8 ± 2,5 (-11,9%)	27,4 ± 2,2 (-6,5%)
300	15,6 ± 1,7	16,9 ± 2,0 (+8,3%)	16,5 ± 2,3 (+5,8%)	23,1 ± 1,7* (+48,1%)	24,1 ± 2,5 (+4,3%)	23,8 ± 2,0 (+3,0%)

Примечание:

\* - изменения достоверны относительно исходных показателей изменения сократимости (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

В скобках представлены проценты изменения в группах:

- показателей после добавления глуфимета или фенибута – относительно исходных значений прироста/снижения сократимости;
- показателей после добавления глуфимета или фенибута на фоне блокады NOS – относительно прироста/снижения сократимости после добавления L-NAME.

Увеличение сократимости изолированных предсердий крыс на активацию адренорецепторов при стимуляции с частотой 240 имп/мин на фоне добавления глуфимета было ниже на 22,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем без введения изучаемого соединения. Прирост сократимости при активации симпатической системы после добавления фенибута снижался на 25,9% ( $p < 0,05$ ) относительно данного параметра без производного ГАМК. Увеличение амплитуды сокращений изолированных предсердий на фоне введения L-NAME при активации адренорецепторов было на 105,2% ( $p < 0,05$ ) выше такового только после добавления дофамина. Глуфимет и фенибут практически не снижали процент увеличения сократимости после добавления L-NAME относительно такового без исследуемого соединения (Таблица 1).

При частоте стимуляции 270 имп/мин дофамин вызывал прирост изучаемого показателя на 23,1%, а после добавления глуфимета – на 17,1%, что на 26,0% ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с таковым без глуфимета. Прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий после введения в раствор фенибута при стимуляции адренорецепторов оказался на 28,1% ( $p < 0,05$ ) ниже такового только после добавления дофамина. Увеличение сократимости при активации симпатической системы после добавления L-NAME было почти в 2 раза ( $p < 0,05$ ) выше относительно данного параметра без ингибирования NO-синтаз. Глуфимет и фенибут на фоне блокады синтеза оксида азота не вызывали изменения прироста сократимости после стимуляции дофамином по сравнению с таковым без введения исследуемых соединений (Таблица 1).

Повышение инотропной функции изолированных предсердий крыс на активацию адренорецепторов при стимуляции с частотой 300 имп/мин на фоне добавления глуфимета было на 20,3% ( $p < 0,05$ ), фенибута – на 23,3% ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с этим показателем без производных нейроактивных аминокислот. Увеличение амплитуды сокращений изолированных предсердий на фоне введения L-NAME в условиях стимуляции адренорецепторов составляло было на 105,9% ( $p < 0,05$ ) выше такового только после добавления дофамина. Глуфимет, введенный в раствор Кребса при блокаде NO-синтаз, значительно не

снижал процент увеличения сократимости, а фенибут приводил к уменьшению прироста на 13,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным параметром на фоне ингибирования NOS (Таблица 1).

Достоверные изменения снижения сократимости изолированных предсердий крыс на активацию холинорецепторов наблюдались только после добавления L-NAME: при частоте навязанного ритма 180 имп/мин изучаемый показатель был выше такового без дефицита NO на 16,7% ( $p < 0,05$ ), при 210 имп/мин – 27,0% ( $p < 0,05$ ), при 240 имп/мин – 48,0% ( $p < 0,05$ ), при 270 имп/мин – 67,4% ( $p < 0,05$ ), при 300 имп/мин – 48,1% ( $p < 0,05$ ) (Таблица 1).

После добавления изучаемых соединений уменьшалось смещение от изолинии амплитуды сокращений относительно исходного значения, что свидетельствует об улучшении расслабления миокарда при увеличении частоты навязанного ритма. При дефиците оксида азота, вызванном введением в ванночку с раствором Кребса L-NAME, наблюдалось выраженное увеличение исследуемого показателя, что говорит о снижении расслабления. При добавлении глуфимета и фенибута на фоне неселективного ингибирования NOS изучаемый параметр не отличался от такового только после введения L-NAME (Рисунок 9).

Таким образом, при различной частоте навязанного ритма неселективное ингибирование NO-синтаз приводит к усилению инотропной реакции изолированных предсердий интактных крыс в условиях *in vitro* при стимуляции  $\beta$ -адренорецепторов дофамином. Глуфимет и фенибут способствуют снижению данного показателя, причем этот эффект не наблюдался при дефиците NO. Также блокада NOS потенцирует снижение сократимости препарата предсердий в ответ на активацию парасимпатической системы. Глуфимет и фенибут улучшают расслабление миокарда препарата изолированных предсердий, однако, при ингибировании NOS данный эффект не наблюдали.

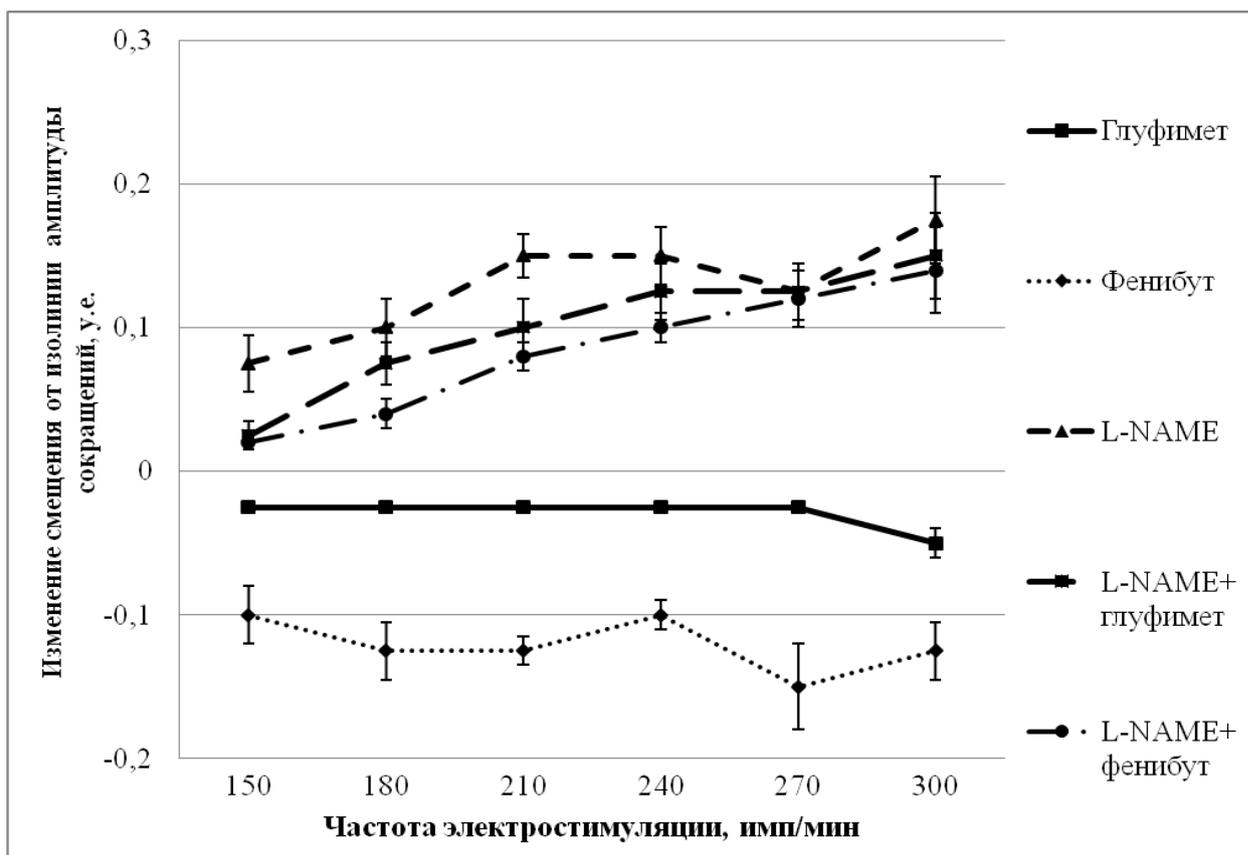


Рисунок 9. Изменение смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий крыс исследуемых групп относительно исходных значений.

### 3.2. Изучение *ex vivo* влияния глуфимета и фенибута на сократимость изолированных предсердий интактных крыс при блокаде NOS в условиях активации симпатической и парасимпатической системы

При изучении *in vitro* влияния производных глутаминовой кислоты и ГАМК на холино- и  $\beta_1$ -опосредуемую инотропную реакцию изолированных предсердий интактных крыс было обнаружено, что они ограничивают избыточное увеличение сократимости при активации симпатической системы, причем этот эффект был менее выражен при ингибировании NO-синтаз. В связи с этим, представлялась целесообразной оценка влияния изучаемых производных нейроактивных аминокислот, вводимых внутрибрюшинно, на инотропию миокарда в условиях

активации  $\beta_1$ - и холинорецепторов и блокады NOS при различной частоте электростимуляции.

Выявлено, что у животных, которым вводили глуфимет, прирост сократимости изолированных предсердий после добавления дофамина при частоте навязанного ритма 150 имп/мин был на 8,1% ( $p < 0,05$ ) меньше, а у самок, получавших фенибут, значимых отличий исследуемого показателя от такового интактной группы животных не обнаружено. L-NAME, который вводили крысам внутрибрюшинно, приводил к увеличению инотропной реакции препарата предсердий в условиях стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов на 117,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным параметром контрольных самок. У животных, получавших производные глутаминовой кислоты и ГАМК на фоне ингибирования NOS, при активации симпатической системы прирост сократимости изолированных предсердий был ниже на 58,4% ( $p < 0,05$ ) и 52,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно относительно изучаемого показателя крыс, которым вводили только L-NAME (Таблица 2).

Увеличение сократимости изолированных предсердий интактных самок на активацию адренорецепторов при стимуляции с частотой 180 имп/мин составило 42,3%, а у животных, которым вводили глуфимет и фенибут – 26,5% и 34,6%, что было ниже на 37,3% ( $p < 0,05$ ) и 18,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с показателем контрольных крыс. Прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий у животных, получавших L-NAME, при активации симпатической системы снижался на 77,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковым у крыс интактной группы. У самок, которым вводили глуфимет при блокаде NO-синтаз, исследуемый показатель был ниже на 47,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным параметром на фоне ингибирования NOS. Аналогичные результаты наблюдали у крыс, получавших фенибут и L-NAME: при стимуляции адренорецепторов увеличение сократимости предсердий было на 43,5% ( $p < 0,05$ ) ниже относительно данного показателя животных, не получавших производное ГАМК (Таблица 2).

При частоте стимуляции 210 имп/мин прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий у самок, получавших глуфимет, был ниже на 32,3% ( $p < 0,05$ ), а фенибут – на 21,2% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковым животных контрольной группы. Повышение изучаемого параметра при активации симпатической системы у животных с дефицитом NO составило 76,6% ( $p < 0,05$ ) относительно крыс без ингибирования NO-синтаз. Глуфимет и фенибут, которые вводили животным на фоне блокады синтеза оксида азота, вызывали снижение прироста сократимости изолированных предсердий после стимуляции дофамином на 45,6% ( $p < 0,05$ ) и 46,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с таковым у крыс, не получавших исследуемые вещества (Таблица 2).

У животных, которым вводили глуфимет, прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий после добавления дофамина при частоте навязанного ритма 240 имп/мин был на 44,2% ( $p < 0,05$ ) меньше, чем у самок контрольной группы. У крыс, получавших фенибут, наблюдали снижение инотропной реакции предсердий на стимуляцию адренорецепторов на 23,7% ( $p < 0,05$ ) относительно таковой интактных самок. L-NAME, вводимый крысам внутривентриально, вызывал увеличение инотропии препарата предсердий в условиях стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов на 51,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным параметром контрольных самок. У животных, получавших производные глутаминовой кислоты и ГАМК на фоне ингибирования NOS и при активации симпатической системы, прирост сократимости изолированных предсердий был на 38,5% ( $p < 0,05$ ) и 40,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно меньше изучаемого показателя крыс, которым вводили только L-NAME (Таблица 2).

Таблица 2. Влияние *ex vivo* глужфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных крыс при активации симпатической и парасимпатической систем и блокаде NO-синтаз ( $M \pm \sigma$ ).

<b>Прирост сократимости при активации адренорецепторов дофамином, %</b>						
Частота электростимуляции, имп/мин	Группы животных					
	Интактная (n = 7)	Глужфимет (n = 7)	Фенибут (n = 7)	L-NAME (n = 6)	L-NAME+глужфимет (n = 7)	L-NAME+фенибут (n = 7)
150	44,5 ± 3,0	40,9 ± 4,4* (-8,1%)	46,7 ± 3,0 (+4,9%)	96,6 ± 7,5* (+117,1%)	40,2 ± 3,0 <sup>#</sup> (-58,4%)	45,5 ± 3,7 <sup>#</sup> (-52,9%)
180	42,3 ± 5,4	26,5 ± 2,9* (-37,3%)	34,6 ± 3,9* (-18,2%)	75,1 ± 4,3* (+77,5%)	39,4 ± 3,9 <sup>#</sup> (-47,5%)	42,4 ± 3,6 <sup>#</sup> (-43,5%)
210	35,9 ± 3,5	24,3 ± 3,1* (-32,3%)	28,3 ± 4,2* (-21,2%)	63,4 ± 4,4* (+76,6%)	34,5 ± 4,0 <sup>#</sup> (-45,6%)	33,8 ± 2,5 <sup>#</sup> (-46,7%)
240	32,1 ± 4,1	17,9 ± 3,4* (-44,2%)	24,5 ± 4,0* (-23,7%)	48,6 ± 3,8* (+51,4%)	29,9 ± 4,2 <sup>#</sup> (-38,5%)	29,1 ± 2,3 <sup>#</sup> (-40,1%)
270	29,5 ± 3,4	16,6 ± 2,8* (-43,7%)	16,1 ± 3,2* (-45,4%)	43,4 ± 2,6* (+47,1%)	26,9 ± 3,9 <sup>#</sup> (-38,0%)	30,8 ± 4,0 <sup>#</sup> (-29,0%)
300	27,6 ± 3,5	16,3 ± 2,6* (-40,9%)	15,1 ± 3,5* (-45,3%)	42,2 ± 2,8* (+52,9%)	25,7 ± 4,0 <sup>#</sup> (-39,1%)	27,1 ± 4,2 <sup>#</sup> (-35,8%)
<b>Снижение сократимости при активации холинорецепторов ацетилхолином, %</b>						
Частота электростимуляции, имп/мин	Группы животных					
	Интактная (n = 7)	Глужфимет (n = 7)	Фенибут (n = 7)	L-NAME (n = 6)	L-NAME+глужфимет (n = 7)	L-NAME+фенибут (n = 7)
150	22,2 ± 2,7	16,8 ± 1,7* (-24,3%)	26,2 ± 3,3* (+18,0%)	22,6 ± 3,9 (+1,8%)	27,4 ± 3,3 <sup>#</sup> (+21,2%)	23,4 ± 3,4 (+3,5%)
180	22,2 ± 3,7	18,5 ± 3,4 (-16,7%)	23,1 ± 3,3 (+4,0%)	24,2 ± 3,1 (+9,0%)	26,8 ± 3,1 (+10,7%)	21,5 ± 2,4 (-11,1%)
210	21,1 ± 3,2	17,7 ± 1,6* (-16,1%)	22,2 ± 2,0 (+5,2%)	25,1 ± 4,7 (+19,0%)	23,6 ± 3,7 (-6,0%)	19,3 ± 2,4 (-23,1%)

Продолжение таблицы 2.

Снижение сократимости при активации холинорецепторов ацетилхолином, %						
Частота электростимуляции, имп/мин	Группы животных					
	Интактная (n = 7)	Глуфимет (n = 7)	Фенибут (n = 7)	L-NAME (n = 6)	L-NAME+глуфимет (n = 7)	L-NAME + фенибут (n = 7)
240	17,5 ± 1,5	18,0 ± 2,7 (+2,9%)	16,3 ± 1,9 (-6,9%)	26,9 ± 4,0* (+53,7%)	23,3 ± 3,0 (-13,4%)	20,2 ± 2,6# (-24,9%)
270	15,7 ± 2,4	18,7 ± 3,7* (+19,1%)	15,7 ± 1,8 (0,0%)	25,2 ± 1,2* (+60,5%)	21,1 ± 2,6# (-16,3%)	20,7 ± 3,3# (-17,9%)
300	13,0 ± 2,2	15,4 ± 1,8 (+18,5%)	13,1 ± 2,7 (+0,8%)	22,7 ± 2,5* (+74,6%)	22,7 ± 2,7 (0,0%)	18,4 ± 3,0# (-18,9%)

Примечание:

\* - изменения достоверны относительно показателей крыс интактной группы (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны по сравнению с показателями группы животных, которым вводили L-NAME (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В скобках представлены проценты изменения в группах:

- животных, получавших глуфимет или фенибут – относительно значений интактной группы;
- крыс, которым вводили глуфимет или фенибут на фоне блокады NOS – относительно значений группы самок, получавших только L-NAME.

Увеличение сократимости изолированных предсердий самок, которым вводили производные глутаминовой кислоты и ГАМК, на стимуляцию адренорецепторов при частоте навязанного ритма 270 имп/мин было ниже на 43,7% ( $p < 0,05$ ) и 45,4% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с показателем интактных крыс. Прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий у животных с блокадой NOS, при активации симпатической системы повышался на 47,1% ( $p < 0,05$ ) относительно такового крыс контрольной группы. У самок с дефицитом NO, которым вводили глуфимет, исследуемый показатель был ниже на 38,0% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным параметром на фоне неселективного ингибирования NO-синтаз. Схожие результаты регистрировали и у крыс, получавших производное ГАМК и L-NAME: при стимуляции адренорецепторов увеличение сократимости предсердий было на 29,0% ( $p < 0,05$ ) ниже относительно данного показателя животных, не получавших фенибут (Таблица 2).

При частоте электростимуляции 300 имп/мин прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий крыс, получавших глуфимет на 40,9% ( $p < 0,05$ ) был ниже по сравнению с таковым животных контрольной группы. Повышение сократимости предсердий при стимуляции адренорецепторов у самок, которым вводили фенибут, оказался на 45,3% ( $p < 0,05$ ) ниже этого показателя крыс интактной группы. Увеличение изучаемого параметра при активации симпатической системы у животных с блокадой NOS составило 52,9% ( $p < 0,05$ ) относительно самок без дефицита NO. Производные глутаминовой кислоты и ГАМК, которые вводили животным на фоне ингибирования синтеза NO, способствовали снижению прироста сократимости препарата предсердий после стимуляции агонистом  $\beta$ -адренорецепторов на 39,1% ( $p < 0,05$ ) и 35,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с таковым у крыс, не получавших глуфимет и фенибут (Таблица 2).

Снижение инотропной функции изолированных предсердий крыс, получавших глуфимет, на активацию холинорецепторов при электростимуляции с частотой 150 имп/мин было на 24,3% ( $p < 0,05$ ) ниже, а у самок, которым вводили

фенибут – на 18,0% меньше по сравнению с данным показателем самок интактной группы. Снижение амплитуды сокращений препарата предсердий у животных, получавших L-NAME, в условиях стимуляции холинорецепторов практически не отличалось от аналогичного параметра крыс контрольной группы. Глуфимет, который вводили животным внутривенно при ингибировании NO-синтаз, способствовал еще большему уменьшению сократимости на 21,2% ( $p < 0,05$ ), а фенибут достоверно не изменял инотропную реакцию по сравнению с аналогичным параметром только на фоне блокады NOS (Таблица 2).

При частоте навязанного ритма 180 имп/мин достоверных отличий анализируемого показателя в исследуемых группах животных отмечено не было (Таблица 2).

Снижение амплитуды сокращений изолированных предсердий интактных крыс, получавших глуфимет, на стимуляцию холинорецепторов при частоте ритма 210 имп/мин было достоверно ниже на 16,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с изучаемым параметром контрольных самок. Процент снижения инотропии изолированных предсердий у животных с ингибированием NOS в условиях стимуляции холинорецепторов составил оказался на 19,0% выше такового интактных крыс. У самок, которым вводили фенибут и L-NAME, уменьшение сократимости препарата предсердий было на 23,1% ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с аналогичным показателем животных с блокадой NO-синтаз. В остальных исследуемых группах достоверных отличий обнаружено не было (Таблица 2).

Изучаемые производные нейроактивных аминокислот, которые вводили крысам внутривенно, не приводили к изменению инотропной реакции изолированных предсердий интактных самок при частоте электростимуляции 240 имп/мин и активации парасимпатической системы. Однако у животных, получавших неселективный ингибитор NO-синтаз, наблюдали усиление снижения сократимости предсердий в данных условиях на 53,7% ( $p < 0,05$ ) относительно такового интактных крыс. Глуфимет при ингибировании NO-синтаз уменьшал изучаемый показатель на 13,4%, а фенибут – на 24,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным параметром на фоне блокады NOS (Таблица 2).

При частоте навязанного ритма 270 имп/мин достоверное снижение амплитуды сокращений препарата предсердий в условиях стимуляции холинорецепторов наблюдалось у самок с блокадой NOS: изучаемый показатель был на 60,5% ( $p < 0,05$ ) выше по сравнению с аналогичным параметром крыс контрольной группы. Изучаемые соединения, которые вводили животным с блокадой NOS, снижали процент уменьшения сократимости: глуфимет – на 16,3% ( $p < 0,05$ ), а фенибут – на 17,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным показателем на фоне ингибирования NO-синтаз (Таблица 2).

Снижение инотропной функции изолированных предсердий крыс, которым вводили L-NAME, на активацию холинорецепторов при стимуляции с частотой 300 имп/мин было на 74,6% ( $p < 0,05$ ) выше относительно такового интактных самок. Глуфимет, который вводили животным внутрибрюшинно при ингибировании NO-синтаз, достоверно не изменял, а фенибут – снижал анализируемый показатель на 18,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным параметром только на фоне блокады NOS. В остальных группах самок достоверных отличий не наблюдали (Таблица 2).

У животных, получавших производные нейроактивных аминокислот, не наблюдали значимого смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий, а у крыс, которым вводили L-NAME, была отмечена тенденция к повышению исследуемого показателя относительно интактных самок, что говорит о нарушении расслабления миокарда. В группах животных, получавших глуфимет и фенибут на фоне дефицита NO, изучаемый параметр практически не отличался от такового крыс с блокадой NOS, что, вероятно, свидетельствует о наличии NO-ергического компонента в механизме их действия (Рисунок 10).

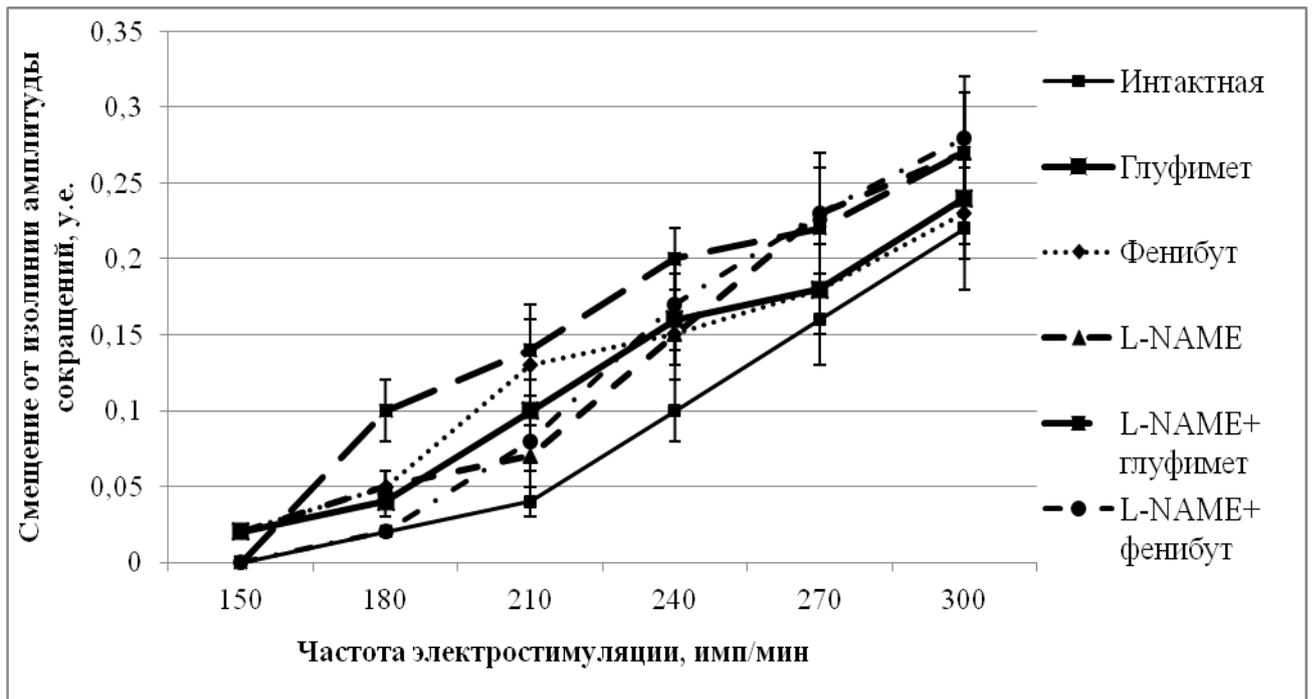


Рисунок 10. Изменение смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий крыс исследуемых групп.

Таким образом, полученные результаты согласуются с данными *in vitro*, и свидетельствуют о том, что дефицит оксида азота приводит к усилению инотропной реакции изолированных предсердий крыс при стимуляции симпатического и парасимпатического отдела нервной системы. Исследуемые производные глутаминовой кислоты и ГАМК ограничивают чрезмерную активацию симпатической системы. Однако при неселективном ингибировании NO-синтазы глуфимет и фенибут также оказывали свое действие, вероятно, в условиях *in vivo* реализуя его через другие механизмы, не связанные с NO. Вместе с тем, на фоне блокады NOS, изучаемые производные не улучшали расслабление, что, вероятно, свидетельствует о наличии NO-ергического компонента в механизме их действия.

### **3.3. Изучение *ex vivo* влияния глутимета и фенибута на сократимость изолированных предсердий крыс при стрессорном повреждении сердца в условиях блокады NOS и стимуляции адрено- и холинорецепторов**

Известно, что нервная система обеспечивает ответ сердечно-сосудистой системы на стрессорное воздействие через симпатические и парасимпатические влияния, которые могут модулироваться оксидом азота [Ulrich-Lai Y.M. et al., 2009; Schultz H.D., 2009]. Кроме того, система NO является стресс-лимитирующей и ограничивает стрессорные повреждения различных тканей, в том числе и миокарда [Манухина Е.Б. и др., 2000]. В связи с этим интерес представляло изучение влияния исследуемых производных нейроактивных аминокислот на инотропную реакцию изолированных предсердий стрессированных крыс в условиях блокады синтеза NO и стимуляции адрено- и холинорецепторов.

Выявлено, что у стрессированных животных прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий на фоне стимуляции дофамином при частоте навязанного ритма 150 имп/мин был на 27,4% больше ( $p < 0,05$ ), чем у интактных самок. У животных, которым до стресса вводили глутимет и фенибут, наблюдали снижение инотропной реакции предсердий на стимуляцию адренорецепторов на 13,6% ( $p < 0,05$ ) и 19,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно относительно таковой стрессированных самок, которым не вводили изучаемые соединения. Блокада синтеза NO на фоне стресса приводила к увеличению прироста сократимости предсердий на 29,6% ( $p < 0,05$ ) в условиях активации симпатической системы по сравнению с аналогичным параметром стрессированных крыс. У животных, получавших до подвешивания производные глутаминовой кислоты и ГАМК на фоне ингибирования NOS и при добавлении дофамина, исследуемый показатель был на 38,2% ( $p < 0,05$ ) и 17,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно меньше относительно такового крыс, которым вводили только L-NAME (Таблица 3).

Таблица 3. Влияние *ex vivo* глуфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий стрессированных крыс при активации симпатической и парасимпатической систем и блокаде NO-синтаз ( $M \pm \sigma$ ).

Прирост сократимости при активации адренорецепторов дофамином, %							
Частота стимуляции, имп/мин	Группы животных						
	Интактная (n = 7)	Стресс + физ.р-р (n = 7)	Стресс + глуфимет (n = 7)	Стресс + фенибут (n = 6)	Стресс + L-NAME (n = 7)	Стресс + L-NAME + глуфимет (n = 7)	Стресс + L-NAME + фенибут (n = 7)
150	44,5 ± 3,0	56,7 ± 2,7* (+27,4%)	49,0 ± 3,9# (-13,6%)	45,8 ± 2,0# (-19,2%)	73,5 ± 2,6# (+29,6%)	45,4 ± 3,7^ (-38,2%)	60,5 ± 2,2^ (-17,7%)
180	42,3 ± 5,4	55,4 ± 2,4* (+31,0%)	42,2 ± 2,0# (-23,8%)	30,4 ± 3,1# (-45,1%)	54,6 ± 3,6 (-1,4%)	40,5 ± 3,8^ (-25,8%)	45,3 ± 1,8^ (-17,0%)
210	35,9 ± 3,5	48,2 ± 2,9* (+34,3%)	41,5 ± 2,7# (-13,9%)	24,7 ± 2,6# (-48,7%)	41,6 ± 2,2# (-13,7%)	39,4 ± 4,4 (-5,3%)	37,1 ± 2,9^ (-10,8%)
240	32,1 ± 4,1	43,1 ± 3,5* (+34,3%)	38,9 ± 4,5 (-9,7%)	24,9 ± 3,3# (-42,2%)	31,3 ± 3,2# (-27,4%)	36,0 ± 3,9 (+15,0%)	28,4 ± 2,3 (-9,3%)
270	29,5 ± 3,4	38,7 ± 2,9* (+31,2%)	31,2 ± 2,8# (-19,4%)	24,5 ± 1,8# (-36,7%)	28,6 ± 3,5# (-26,1%)	24,1 ± 3,1 (-15,7%)	24,3 ± 2,7 (-15,0%)
300	27,6 ± 3,5	35,3 ± 2,7* (+27,9%)	29,4 ± 2,8# (-16,7%)	23,7 ± 2,4# (-32,9%)	22,5 ± 2,5# (-36,3%)	24,6 ± 2,6 (+9,3%)	25,1 ± 2,5 (+11,5%)
Снижение сократимости при активации холинорецепторов ацетилхолином, %							
Частота стимуляции, имп/мин	Группы животных						
	Интактная (n = 7)	Стресс + физ.р-р (n = 7)	Стресс + глуфимет (n = 7)	Стресс + фенибут (n = 6)	Стресс + L-NAME (n = 7)	Стресс + L-NAME + глуфимет (n = 7)	Стресс + L-NAME + фенибут (n = 7)
150	22,1 ± 2,7	23,9 ± 3,6 (+8,1%)	22,9 ± 3,4 (-4,2%)	29,5 ± 2,7# (+23,4%)	23,2 ± 2,1 (-2,9%)	19,2 ± 3,6^ (-17,2%)	30,0 ± 2,4^ (+29,3%)
180	22,2 ± 3,7	24,2 ± 1,6 (+9,0%)	24,0 ± 3,3 (-0,8%)	26,8 ± 3,7 (+10,7%)	23,6 ± 2,5 (-2,5%)	18,4 ± 2,8^ (-22,0%)	31,0 ± 3,2^ (+31,3%)
210	21,1 ± 3,2	24,9 ± 3,2* (+18,0%)	24,6 ± 3,6 (-1,2%)	28,9 ± 2,4# (+16,1%)	19,2 ± 2,0# (-22,9%)	17,9 ± 2,3 (-6,8%)	30,9 ± 3,0^ (+60,9%)

Продолжение таблицы 3.

Снижение сократимости при активации холинорецепторов ацетилхолином, %							
Частота стимуляции, имп/мин	Группы животных						
	Интактная (n = 7)	Стресс + физ.р-р (n = 7)	Стресс + глуфимет (n = 7)	Стресс + фенибут (n = 6)	Стресс + L-NAME (n = 7)	Стресс + L-NAME + глуфимет (n = 7)	Стресс + L-NAME + фенибут (n = 7)
240	17,5 ± 1,5	22,5 ± 2,0* (+28,6%)	19,8 ± 2,2# (-12,0%)	26,5 ± 2,0# (+17,8%)	17,3 ± 1,0# (-23,1%)	17,9 ± 2,2 (+3,5%)	26,8 ± 1,4^ (+54,9%)
270	15,7 ± 2,4	20,3 ± 2,8* (+29,3%)	21,6 ± 2,4 (+6,4%)	24,8 ± 2,1# (+22,2%)	18,7 ± 1,5 (-7,9%)	17,9 ± 2,7 (-4,3%)	21,5 ± 2,2 (+15,0%)
300	13,0 ± 2,2	20,0 ± 2,8* (+53,8%)	18,4 ± 2,3 (-8,0%)	20,8 ± 2,4 (+4,0%)	18,6 ± 2,5 (-7,0%)	16,2 ± 2,0 (-12,9%)	14,5 ± 2,0^ (-22,0%)

Примечание:

\* - изменения достоверны относительно показателей крыс интактной группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны по сравнению с показателями группы стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

^ - изменения достоверны по сравнению с показателями стрессированных животных, получавших L-NAME (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В скобках представлены проценты изменения в группах:

- стрессированных самок - относительно аналогичных показателей интактных крыс;
- животных, получавших глуфимет или фенибут – относительно значений стрессированных самок;
- крыс, которым вводили глуфимет или фенибут на фоне блокады NOS – относительно значений группы животных, получавших только L-NAME.

Увеличение сократимости изолированных предсердий стрессированных самок на стимуляцию адренорецепторов при частоте навязанного ритма 180 имп/мин было на 31,0% выше ( $p < 0,05$ ), чем этот параметр интактных крыс. У животных, которым до подвешивания вводили глуфимет и фенибут, обнаружено снижение исследуемого показателя на 23,8% ( $p < 0,05$ ) и 45,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с изучаемым показателем стрессированных самок. Прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий у животных, получавших L-NAME, при активации симпатической системы существенно не отличался от такового крыс группы негативного контроля. У самок, которым вводили изучаемые вещества при ингибировании NOS, исследуемый показатель был ниже на 25,8% (глуфимет,  $p < 0,05$ ) и 17,0% (фенибут,  $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным параметром на фоне блокады NO-синтаз (Таблица 3).

При частоте электростимуляции 210 имп/мин прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий стрессированных крыс был на 34,3% ( $p < 0,05$ ) выше по сравнению с таковым самок контрольной группы. Увеличение амплитуды сократимости предсердий при стимуляции адренорецепторов у животных после стрессорного воздействия, которым вводили исследуемые соединения, было на 13,9% ( $p < 0,05$ ) и 48,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно ниже изучаемого показателя крыс группы негативного контроля. Инотропная реакция препарата предсердий при активации симпатической системы у самок с блокадой NOS оказалась меньше на 22,9% ( $p < 0,05$ ) относительно крыс без дефицита NO. Производные глутаминовой кислоты и ГАМК, которые вводили стрессированным животным на фоне ингибирования синтеза NO, способствовали снижению прироста сократимости предсердий после стимуляции агонистом  $\beta$ -адренорецепторов на 5,3% и 10,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с крысами, не получавшими глуфимет и фенибут (Таблица 3).

Иммобилизационно-болевое воздействие приводило к увеличению прироста амплитуды сократимости изолированных предсердий в условиях активации симпатической системы и при частоте навязанного ритма 240 имп/мин на 34,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковым интактных животных. Снижение исследуемого

показателя самок, получавших глуфимет и фенибут, составило 9,7% и 42,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно относительно стрессированных животных контрольной группы. Прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий у крыс с блокадой NOS при активации симпатической системы был на 27,4% ( $p < 0,05$ ) ниже такового самок группы негативного контроля. У животных с дефицитом NO, которым вводили глуфимет и фенибут, исследуемый показатель достоверно не отличался от аналогичного параметра на фоне ингибирования NO-синтаз (Таблица 3).

При частоте стимуляции 270 имп/мин прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий у стрессированных крыс был на 31,2% ( $p < 0,05$ ) больше по сравнению с таковым интактных животных. Глуфимет и фенибут приводили к снижению инотропной реакции препарата предсердий самок после стрессорного воздействия при стимуляции агонистом адренорецепторов на 19,4% ( $p < 0,05$ ) и 36,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно относительно этого показателя стрессированных животных. Снижение изучаемого параметра при активации симпатической системы у крыс с дефицитом NO составило 26,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с анализируемым показателем самок без ингибирования NOS. Производные нейроактивных аминокислот, которые вводили животным на фоне блокады синтеза оксида азота до стрессирования, достоверно не изменяли исследуемый параметр, однако была отмечена его тенденция к снижению относительно такового у крыс, не получавших глуфимет и фенибут (Таблица 3).

У стрессированных крыс прирост амплитуды сокращений изолированных предсердий на фоне стимуляции дофамином при частоте навязанного ритма 300 имп/мин был на 27,9% ( $p < 0,05$ ) выше, чем у животных группы положительного контроля. У самок, которые до стресса получали глуфимет и фенибут, наблюдали снижение инотропной реакции предсердий на стимуляцию адренорецепторов на 16,7% ( $p < 0,05$ ) и 32,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно относительно таковой стрессированных самок, которым не вводили исследуемые вещества. Дефицит оксида азота на фоне стресса приводил к снижению прироста сократимости предсердий в условиях активации симпатической системы на 36,3% ( $p < 0,05$ ) по

сравнению с аналогичным параметром стрессированных животных. У крыс, получавших до иммобилизационно-болевого воздействия производные глутаминовой кислоты и ГАМК на фоне ингибирования NOS и при стимуляции адренорецепторов дофамином, исследуемый показатель достоверно не отличался от такового крыс, которым вводили только L-NAME (Таблица 3).

При активации парасимпатической системы ацетилхолином процент снижения сократимости изолированных предсердий стрессированных крыс при частоте навязанного ритма 150 и 180 имп/мин достоверно не отличался от такового интактных животных, однако при более высокой частоте электростимуляции исследуемый показатель был выше: при частоте 210 имп/мин он был больше на 18,0% ( $p < 0,05$ ), при 240 имп/мин – на 28,6% ( $p < 0,05$ ), при 270 имп/мин – на 29,3% ( $p < 0,05$ ), при 300 имп/мин – на 53,8% ( $p < 0,05$ ). Глуфимет, который вводили животным до стрессирования, не оказывал значимого влияния на инотропную реакцию препарата предсердий при активации холинорецепторов, за исключением частоты стимуляции 240 имп/мин – изучаемый параметр был ниже на 12,0% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с самками группы негативного контроля. У животных, получавших производное ГАМК, было отмечено увеличение инотропного ответа на добавление ацетилхолина при всех частотах навязанного ритма относительно стрессированных крыс, которым не вводили фенибут (Таблица 3).

Блокада синтеза NO приводила к достоверному ослаблению инотропной реакции при активации парасимпатической системы только при частоте электростимуляции 210 и 240 имп/мин (на 22,9% и 23,1% соответственно,  $p < 0,05$ ), при остальных частотах – была отмечена тенденция к снижению по сравнению с анализируемым параметром стрессированных животных. При введении крысам до стрессирования глуфимета на фоне ингибирования NO-синтаз было отмечено понижение инотропной реакции изолированных предсердий после добавления ацетилхолина при частоте навязанного ритма 150 и 180 имп/мин, которое составило 17,2% ( $p < 0,05$ ) и 22,0% ( $p < 0,05$ ) соответственно относительно таковой стрессированных самок, получавших только L-NAME; при остальных частотах

наблюдалась тенденция к снижению. Уменьшение амплитуды сокращений изолированных предсердий стрессированных крыс, которым вводили фенибут и L-NAME, на стимуляцию холинорецепторов было достоверно выше, чем у животных с блокадой NOS при частоте ритма 150 имп/мин на 29,3% ( $p < 0,05$ ), при 180 имп/мин – на 31,3% ( $p < 0,05$ ), 210 имп/мин – 60,9% ( $p < 0,05$ ), 240 имп/мин – 54,9% ( $p < 0,05$ ), 270 имп/мин – 15,0% ( $p < 0,05$ ). При частоте электростимуляции 300 имп/мин изучаемый параметр был ниже на 22,0% ( $p < 0,05$ ) такового стрессированных самок с дефицитом NO (Таблица 3).

У крыс, подвергшихся стрессорному воздействию, наблюдалось увеличение смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий при увеличении частоты навязанного ритма по сравнению с интактными самками. Введение животным изучаемых производных глутамата и ГАМК приводило к снижению исследуемого показателя, что свидетельствует об улучшении расслабления миокарда. Блокада синтеза NO вызывала значительное увеличение изучаемого параметра по сравнению с таковым стрессированных крыс. У животных, получавших глуфимет и фенибут на фоне ингибирования NOS, смещение от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий при увеличении частоты навязанного ритма значимо не отличалось от аналогичного показателя самок, которым вводили L-NAME (Рисунок 11).

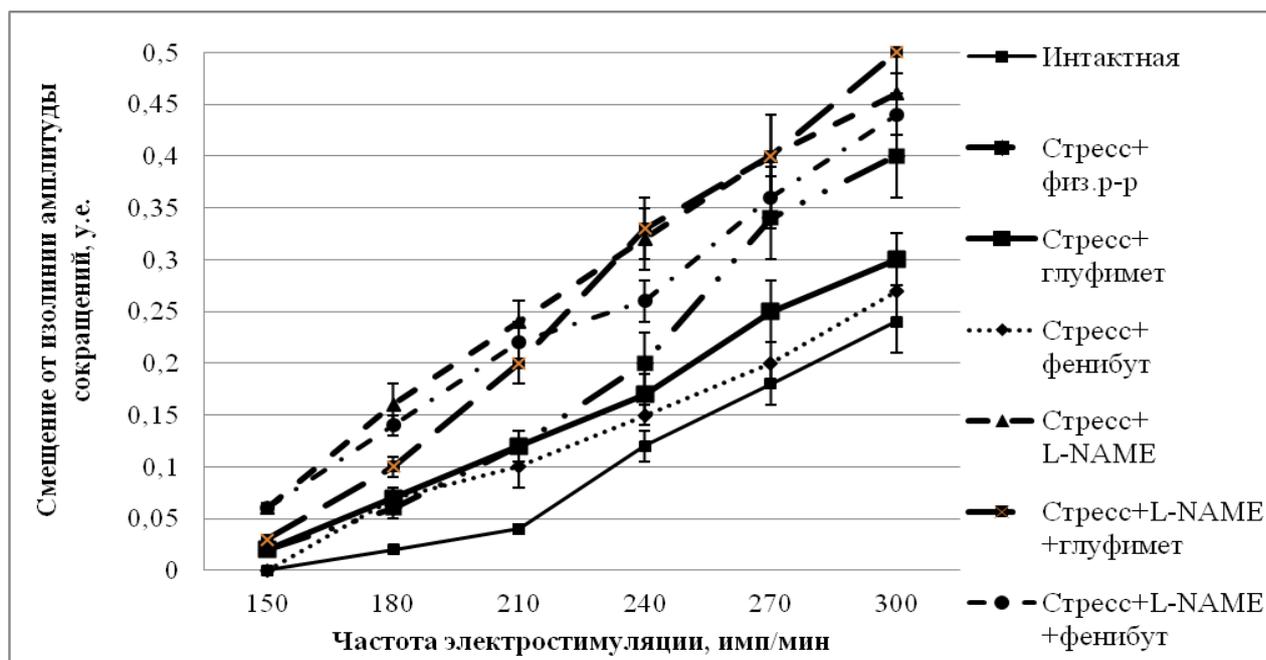


Рисунок 11. Изменение смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий крыс исследуемых групп.

Таким образом, острое стрессорное воздействие приводит к усилению инотропного ответа при стимуляции симпатической и парасимпатической системы и ухудшению расслабления миокарда изолированных предсердий, а исследуемые соединения ограничивают эту реакцию. Блокада NO-синтаз вызывает повышение сократимости при стимуляции адренорецепторов на малой частоте навязанного ритма, с увеличением последней – снижение относительно таковой стрессированных животных, не получавших L-NAME, что, вероятно, связано с ухудшением расслабления миокарда. Дефицит NO на фоне иммобилизационно-болевого воздействия также ослабляет и реакцию препарата предсердий при активации парасимпатической системы. Производные глутаминовой кислоты и ГАМК реализовывали свои эффекты и при неселективном ингибировании NO-синтаз, однако в этих условиях не влияли на расслабление изолированных предсердий.

## **ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ NO-ЕРГИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА В МЕХАНИЗМЕ СТРЕССПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ**

В следующей серии экспериментов были исследованы механизмы стресспротекторного действия производных нейроактивных аминокислот в условиях селективной блокады NO-синтаз. В ранее проведенных исследованиях выявлено, что новое производное глутаминовой кислоты – глуфимет и производное ГАМК – фенибут сохраняют инотропные резервы стрессированного миокарда при проведении нагрузочных тестов (пробы на адренореактивность и максимальной изометрической нагрузки) [Тюренков И.Н. и др., 2014; Перфилова В.Н. и др., 2016]. Также было показано изменение кардиопротекторного действия глуфимета и фенибута на фоне дефицита оксида азота, что позволяет предположить наличие NO-ергического компонента в механизме их действия [Тюренков И.Н. и др., 2015; Тюренков И.Н. и др., 2015].

Оксид азота обладает широким спектром биологических свойств. Он участвует в поддержании сосудистого гомеостаза, регуляции сократимости миокарда, ограничивает ремоделирование сердца после инфаркта, оказывает модулирующее влияние на функционирование митохондрий кардиомиоцитов [Tousoulis D. et al., 2012; Медведев Д.В. и др., 2014]. Кроме того, система NO является мощной стресс-лимитирующей системой, ограничивает на центральном и периферическом уровне секрецию стресс-гормонов [Puzserova A. et al., 2016].

### **4.1 Влияние глуфимета и фенибута на концентрацию конечных метаболитов NO в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга стрессированных крыс в условиях блокады различных NO-синтаз**

Как известно, при стрессорном воздействии увеличивается активность индуцибельной NO-синтазы, производящей в больших количествах оксид азота, который повреждает клеточные структуры [Olivenza R. et al., 2000]. nNOS

оказывает протекторное действие, играет ключевую роль в защите миокарда при окислительном стрессе, систолической/диастолической дисфункции, структурном ремоделировании и аритмиях. Динамическая локализация и различные механизмы реализации защитных эффектов nNOS опосредуют регуляцию функционирования миокарда при стрессе [Zhang Y.H. et al., 2014].

Вследствие этого представляло интерес изучение влияния глуфимета и фенибута на концентрацию конечных метаболитов NO в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга стрессированных животных при блокаде nNOS и iNOS.

Обнаружено, что уровень нитрит- и нитрат-ионов в сыворотке крови интактных животных составил 21,6 мкмоль/л, стрессированных – 31,1 мкмоль/л, что на 44,0% ( $p < 0,05$ ) выше показателя интактных самок; в гомогенатах сердца и головного мозга этот параметр равнялся 32,8 и 18,0 мкмоль/л и также был достоверно на 40,2% ( $p < 0,05$ ) и 23,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно выше по сравнению с группой позитивного контроля. У стрессированных животных, получавших глуфимет, концентрация конечных метаболитов NO составила в крови – 22,7 мкмоль/л, в гомогенате сердца – 21,8 мкмоль/л, головного мозга – 16,4 мкмоль/л, что было на 27,0% ( $p < 0,05$ ), 33,5% ( $p < 0,05$ ) и 8,9% соответственно меньше относительно крыс группы негативного контроля. Фенибут, который вводили самкам до стрессирования, вызывал снижение изучаемого показателя в сыворотке крови на 37,6% (19,4 мкмоль/л,  $p < 0,05$ ), в сердце на 24,7% (24,7 мкмоль/л,  $p < 0,05$ ). В гомогенате мозга, где концентрация конечных метаболитов NO составила 18,6 мкмоль/л, достоверных изменений по сравнению со стрессированными животными контрольной группы не наблюдали (Таблица 4).

Таблица 4. Влияние глуфимета и фенибута на концентрацию конечных метаболитов NO в сыворотке крови и гомогенатах сердца и головного мозга стрессированных животных в условиях блокады различных NOS ( $M \pm \sigma$ ).

Группы животных	Концентрация конечных метаболитов NO, мкмоль/л		
	Сыворотка крови	Гомогенат сердца	Гомогенат головного мозга
Интактная (n = 8)	21,6 ± 2,7	23,4 ± 2,6	14,6 ± 1,7
Стресс + физ.р-р (n = 8)	31,1 ± 2,8* (+44,0%)	32,8 ± 2,8* (+40,2%)	18,0 ± 0,7* (+23,3%)
Стресс + глуфимет (n = 8)	22,7 ± 3,5# (-27,0%)	21,8 ± 2,9# (-33,5%)	16,4 ± 1,9 (-8,9%)
Стресс + фенибут (n = 8)	19,4 ± 2,2# (-37,6%)	24,7 ± 3,5# (-24,7%)	18,6 ± 2,9 (+3,3%)
Стресс + 7-нитроиндазол (n = 8)	25,6 ± 2,3# (-17,7%)	29,3 ± 2,1 (-10,7%)	20,4 ± 2,5 (+13,3%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глуфимет (n = 8)	24,6 ± 3,4 (-3,9%)	25,1 ± 1,6^ (-14,3%)	14,2 ± 2,2^ (-30,4%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут (n = 8)	26,7 ± 2,5 (+4,3%)	23,4 ± 2,4^ (-20,1%)	16,7 ± 1,7^ (-18,1%)
Стресс + амингуанидин (n = 8)	17,8 ± 2,2# (-42,8%)	18,9 ± 2,7# (-42,4%)	15,1 ± 0,8# (-16,1%)
Стресс + амингуанидин + глуфимет (n = 8)	20,7 ± 2,0 (+16,3%)	21,1 ± 2,9& (+11,6%)	17,4 ± 2,8 (+15,2%)
Стресс + амингуанидин + фенибут (n = 8)	16,5 ± 3,2 (-7,3%)	20,5 ± 2,3 (+8,5%)	16,5 ± 1,6 (+9,3%)

Примечание:

Изменения статистически достоверны относительно аналогичных показателей:

\* - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

^ - самок, получавших 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

& - животных, которым вводили ингибитор iNOS амингуанидин (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В скобках представлены % изменения показателей в группе:

- стрессированных животных – относительно интактных крыс;
- самок, получавших глуфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных;
- крыс, которым вводили и исследуемое соединение, и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор.

Блокада синтеза оксида азота нейрональной NO-синтазой приводила к достоверному снижению уровня метаболитов NO только в сыворотке крови на

17,7% ( $p < 0,05$ ), в гомогенате сердца была отмечена тенденция к снижению, в мозге исследуемый параметр был несколько выше такового стрессированных крыс. Введение самкам 7-нитроиндазола и исследуемых соединений не вызывало достоверных изменений изучаемого параметра в сыворотке крови, а в гомогенате сердца он был ниже на 14,3% у животных, получавших глуфимет, и на 20,1% у крыс, получавших фенибут, относительно анализируемого показателя стрессированных самок с блокадой nNOS. Уровень метаболитов NO в гомогенате мозга крыс, которым вводили и 7 нитроиндазол, и глуфимет, составил 14,2 мкмоль/л, 7-нитроиндазол и фенибут – 16,7 мкмоль/л, что было на 30,4% ( $p < 0,05$ ) и 18,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно ниже исследуемого параметра стрессированных животных с блокадой нейрональной NO-синтазы (Таблица 4).

У самок, подвергшихся иммобилизационно-болевному воздействию и получавших ингибитор iNOS амингуанидин, суммарная концентрация нитрит- и нитрат-ионов составила: в крови – 17,8 мкмоль/л, в гомогенате сердца – 18,9 мкмоль/л, в клетках головного мозга – 15,1 мкмоль/л, что было ниже на 42,8% ( $p < 0,05$ ), 42,4% ( $p < 0,05$ ) и 16,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с животными группы негативного контроля. Глуфимет, который вводили самкам до стрессирования на фоне блокады iNOS, вызывал повышение изучаемого показателя в сыворотке крови на 16,3% (20,7 мкмоль/л), в сердце на 11,6% (21,1 мкмоль/л,  $p < 0,05$ ), в мозге на 15,2% (17,4 мкмоль/л) относительно такового стрессированных крыс с блокадой iNOS. У животных, получавших производное ГАМК и амингуанидин, исследуемый параметр в сыворотке крови оказался несколько ниже (на 7,3%), а в гомогенатах сердца и головного мозга незначительно выше (на 8,5% и 9,3% соответственно), чем у самок, которым до стрессирования вводили только амингуанидин (Таблица 4).

Таким образом, стрессорное воздействие приводит к повышению уровня конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга животных, а изучаемые производные глутаминовой кислоты и ГАМК снижают таковой по сравнению со стрессированными крысами. Блокада iNOS приводит к значительному уменьшению исследуемого параметра в органах,

а блокада nNOS – существенно не изменяет его. У животных, получавших до стрессирования 7-нитроиндазол и изучаемые соединения, отмечали тенденцию к снижению уровня нитрит- и нитрат-ионов в сыворотке крови, сердце и головном мозге. Совместное введение до стрессирования исследуемых соединений и ингибитора iNOS не приводило к достоверным изменениям показателя относительно крыс, получавших только амингуанидин.

#### **4.2 Оценка антиоксидантного действия производных нейроактивных аминокислот в условиях стресса при блокаде nNOS и iNOS**

Увеличение синтеза оксида азота при стрессе приводит к его реакции со свободными радикалами и образованию пероксинитрита, который взаимодействует с липидами, ДНК и белками с развитием оксидативного стресса. *In vivo* генерация пероксинитрита представляет важнейшее звено в патогенезе инсульта, инфаркта миокарда, хронической сердечной недостаточности, воспалительных заболеваний и др. Соединения, обладающие антиоксидантным действием, могут в будущем представлять собой мощные терапевтические инструменты для лечения и профилактики различных заболеваний и патологических состояний [Pacher P. et al., 2007]. В связи с этим, было проведено исследование влияние глуфимета и фенибута на концентрацию первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов в митохондриях сердца и головного мозга стрессированных крыс в условиях блокады различных NOS.

Обнаружено, что стрессорное воздействие приводит к повышению концентрации как первичных (диеновые конъюгаты), так и вторичных (МДА, дикетоны) продуктов ПОЛ в митохондриях сердца и головного мозга: уровень ДК был соответственно выше на 21,6% ( $p < 0,05$ ) и 27,3% ( $p < 0,05$ ) (3,27 и 2,61 D<sub>233</sub>/мг белка), дикетонов – на 15,3% ( $p < 0,05$ ) и 31,7% ( $p < 0,05$ ) (0,83 и 0,54 D<sub>278</sub>/мг белка), МДА – на 48,7% ( $p < 0,05$ ) и 56,2% ( $p < 0,05$ ) (9,92 и 18,11 ммоль/мг белка) по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс. У животных,

получавших до стрессирования глутимет, концентрация ДК в сердце составила 2,42 D<sub>233</sub>/мг белка, дикетонов – 0,65 D<sub>278</sub>/мг белка, МДА – 7,57 ммоль/мг белка, что было меньше таковых самок группы негативного контроля на 26,0% (p<0,05), 21,7% и 23,7% (p<0,05) соответственно. В мозге животных, которым вводили производное глутаминовой кислоты, уровень ДК был ниже на 21,5% (2,05 D<sub>233</sub>/мг белка, p<0,05), дикетонов – на 18,5% (0,44 D<sub>278</sub>/мг белка), МДА – на 29,8% (12,72 ммоль/мг белка, p<0,05) относительно изучаемых параметров стрессированных крыс контрольной группы. Фенибут также снижал концентрацию продуктов ПОЛ в митохондриях сердца и головного мозга самок после иммобилизационно-болевого воздействия: уровень ДК был ниже на 15,9% и 36,0% (p<0,05) (2,75 и 1,67 D<sub>233</sub>/мг белка), дикетонов – на 19,3% и 27,8% (p<0,05) (0,67 и 0,39 D<sub>278</sub>/мг белка), МДА – на 17,5% и 38,9% (p<0,05) (8,18 и 11,06 ммоль/мг белка) соответственно по сравнению с группой стрессированных крыс (Таблица 5).

Таблица 5. Влияние глуфимета и фенибута на концентрацию продуктов ПОЛ в митохондриях клеток сердца и головного мозга стрессированных животных в условиях блокады nNOS и iNOS ( $M \pm \sigma$ ).

Группы животных	Исследуемый показатель					
	Диеновые конъюгаты, D <sub>233</sub> /мг белка		Дикетоны, D <sub>278</sub> /мг белка		Малоновый диальдегид, ммоль/мг белка	
	Сердце	Мозг	Сердце	Мозг	Сердце	Мозг
Интактная (n = 8)	2,69 ± 0,16	2,05 ± 0,20	0,72 ± 0,02	0,41 ± 0,03	6,67 ± 1,50	11,59 ± 0,50
Стресс + физ.р-р (n = 8)	3,27 ± 0,12* (+21,6%)	2,61 ± 0,18* (+27,3%)	0,83 ± 0,04* (+15,3%)	0,54 ± 0,03* (+31,7%)	9,92 ± 1,11* (+48,7%)	18,11 ± 0,75* (+56,2%)
Стресс + глуфимет (n = 8)	2,42 ± 0,26# (-26,0%)	2,05 ± 0,23# (-21,5%)	0,65 ± 0,05 (-21,7%)	0,44 ± 0,04 (-18,5%)	7,57 ± 0,51# (-23,7%)	12,72 ± 2,16# (-29,8%)
Стресс + фенибут (n = 8)	2,75 ± 0,09 (-15,9%)	1,67 ± 0,22# (-36,0%)	0,67 ± 0,08 (-19,3%)	0,39 ± 0,06# (-27,8%)	8,18 ± 0,3 (-17,5%)	11,06 ± 2,48# (-38,9%)
Стресс + 7-нитроиндазол (n = 8)	4,34 ± 0,32# (+32,7%)	2,39 ± 0,12 (-8,4%)	1,17 ± 0,16# (+41,0%)	0,60 ± 0,05 (+11,1%)	11,03 ± 0,89 (+11,2%)	18,71 ± 1,38 (+3,3%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глуфимет (n = 8)	3,29 ± 0,29^ (-24,2%)	1,92 ± 0,09^ (-19,7%)	0,84 ± 0,10^ (-28,2%)	0,48 ± 0,05 (-20,0%)	8,63 ± 0,84^ (-21,8%)	17,29 ± 1,84 (-7,6%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут (n = 8)	3,11 ± 0,14^ (-28,3%)	2,02 ± 0,17 (-15,5%)	0,75 ± 0,04^ (-35,9%)	0,48 ± 0,04 (-20,0%)	8,35 ± 0,65^ (-24,3%)	13,22 ± 1,27^ (-29,3%)
Стресс + аминоксантидин (n = 8)	2,98 ± 0,17 (-8,9%)	1,73 ± 0,19# (-33,7%)	0,77 ± 0,03 (-7,2%)	0,42 ± 0,04# (-22,2%)	8,53 ± 0,62 (-14,0%)	14,90 ± 1,40# (-17,7%)
Стресс + аминоксантидин + глуфимет (n = 8)	2,99 ± 0,11 (+0,3%)	1,69 ± 0,29 (-2,3%)	0,71 ± 0,05 (-7,8%)	0,39 ± 0,03 (-7,1%)	8,52 ± 0,99 (-0,1%)	11,36 ± 2,10& (-23,8%)
Стресс + аминоксантидин + фенибут (n = 8)	3,01 ± 0,12 (+1,0%)	1,95 ± 0,17 (+12,7%)	0,72 ± 0,05 (-6,5%)	0,44 ± 0,04 (+4,8%)	7,39 ± 0,83 (-13,4%)	15,50 ± 1,43 (+4,0%)

Примечание:

Изменения статистически достоверны относительно аналогичных показателей: \* - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); # - группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ); ^ - самок, получавших ингибитор nNOS 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ); & - животных, которым вводили аминоксантидин (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В скобках представлены % изменения показателей в группе:

- стрессированных животных – относительно интактных крыс;
- самок, получавших глуфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных;
- крыс, которым вводили исследуемое соединение и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор

Блокада nNOS приводила к интенсификации процессов ПОЛ: в митохондриях сердца концентрация ДК составляла 4,34 D<sub>233</sub>/мг белка, дикетонов – 1,17 D<sub>278</sub>/мг белка, МДА – 11,03 ммоль/мг белка, что было на 32,7% (p<0,05), 41,0% (p<0,05) и 11,2% соответственно выше относительно таковых стрессированных животных; в мозге отмечена тенденция к повышению ДК. У крыс, получавших до стрессирования производное глутаминовой кислоты и 7-нитроиндазол, концентрация ДК в митохондриях сердца составила 3,29 D<sub>233</sub>/мг белка, дикетонов – 0,84 D<sub>278</sub>/мг белка, МДА – 8,63 ммоль/мг белка, что было меньше исследуемых параметров самок группы негативного контроля с блокадой nNOS на 24,2% (p<0,05), 28,2% (p<0,05) и 21,8% (p<0,05) соответственно. В мозге самок, которым вводили глуфимет и ингибитор нейрональной NO-синтазы, уровень ДК был ниже на 19,7% (1,92 D<sub>233</sub>/мг белка, p<0,05), дикетонов – на 20,0% (0,48 D<sub>278</sub>/мг белка), МДА – на 7,6% (17,29 ммоль/мг белка) относительно изучаемых показателей стрессированных животных, получавших только 7-нитроиндазол. У крыс, которым вводили фенибут и блокатор nNOS, в митохондриях сердца и головного мозга самок после стрессирования уровень ДК был ниже на 28,3% (p<0,05) и 15,5% (3,11 и 2,02 D<sub>233</sub>/мг белка), дикетонов – на 35,9% (p<0,05) и 20,0% (0,75 и 0,48 D<sub>278</sub>/мг белка), МДА – на 24,3% (p<0,05) и 29,3% (p<0,05) (8,35 и 13,22 ммоль/мг белка) соответственно по сравнению с группой стрессированных крыс с блокадой nNOS (Таблица 5).

Введение животным до стрессирования ингибитора индуцибельной NOS вызывало статистически достоверное снижение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ только в митохондриях головного мозга: уровень диеновых конъюгатов равнялся 1,73 D<sub>233</sub>/мг белка, дикетонов – 0,42 D<sub>278</sub>/мг белка, малонового диальдегида – 14,90 ммоль/мг белка, что было ниже показателей стрессированных самок на 33,7% (p<0,05), 22,2% (p<0,05) и 17,7% (p<0,05) соответственно; в сердце регистрировали тенденцию к снижению показателя. Существенных изменений концентрации продуктов ПОЛ в митохондриях сердца и головного мозга стрессированных крыс с блокадой iNOS, получавших

исследуемые соединения, по сравнению с животными, которым до стрессирования вводили только аминогуанидин, отмечено не было (Таблица 5).

Функционирование антиоксидантных ферментов также изменялось. При иммобилизационно-болевым воздействии наблюдалось снижение активности СОД в митохондриях сердца и головного мозга на 39,7% ( $p < 0,05$ ) и 25,8% (32,7 и 18,4 у.е./мг белка), каталазы - на 37,8% ( $p < 0,05$ ) и 10,3% (8,4 и 7,8 мг  $H_2O_2$ /мин/мг белка), ГлП – на 51,7% ( $p < 0,05$ ) и 33,7% ( $p < 0,05$ ) (26,6 и 11,6 мМ GSH/мин/мг белка) соответственно по сравнению с анализируемыми параметрами интактных самок. У крыс, которым до стрессирования вводили производное глутаминовой кислоты, активность СОД в сердце составила 42,1 у.е./мг белка, каталазы – 13,6 мг  $H_2O_2$ /мин/мг белка, глутатионпероксидазы – 37,0 мМ GSH/мин/мг белка, что было выше аналогичных показателей животных группы негативного контроля на 28,7%, 61,9% ( $p < 0,05$ ) и 39,1% соответственно. В мозге крыс, получавших глумет, активность СОД была больше на 22,3% (22,5 у.е./мг белка), каталазы – на 12,8% (8,8 мг  $H_2O_2$ /мин/мг белка), ГлП – на 34,5% (15,6 мМ GSH/мин/мг белка) относительно таковых стрессированных самок контрольной группы. Производное ГАМК повышало активность антиоксидантных ферментов в митохондриях сердца и головного мозга крыс после стрессорного воздействия: у супероксиддисмутазы она была выше на 64,8% ( $p < 0,05$ ) и 53,8% ( $p < 0,05$ ) (53,9 и 28,3 у.е./мг белка), каталазы – на 54,8% ( $p < 0,05$ ) и 10,3% (13,0 и 8,6 мг  $H_2O_2$ /мин/мг белка), ГлП – на 113,9% ( $p < 0,05$ ) и 55,2% ( $p < 0,05$ ) (56,9 и 18,0 мМ GSH/мин/мг белка) соответственно, чем у животных группы негативного контроля (Таблица 6).

Введение самкам до стрессирования ингибитора нейрональной NO-синтазы вызывало статистически достоверное увеличение активности антиоксидантных ферментов как в митохондриях сердца, так и головного мозга: исследуемый показатель супероксиддисмутазы в сердце равнялся 43,9 у.е./мг белка, каталазы – 14,7 мг  $H_2O_2$ /мин/мг белка, ГлП – 39,7 мМ GSH/мин/мг белка, что было соответственно больше аналогичных параметров стрессированных самок контрольной группы на 34,2% ( $p < 0,05$ ), 75,0% ( $p < 0,05$ ) и 49,2% ( $p < 0,05$ ); в мозге активность СОД составила 34,0 у.е./мг белка, каталазы – 9,7 мг  $H_2O_2$ /мин/мг

белка, ГлП – 17,0 мМ GSH/мин/мг белка, что было на 84,8% ( $p < 0,05$ ), 24,3% и 46,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно выше относительно таковых стрессированных животных без блокады nNOS. Глуфимет, который крысы получали до стрессирования на фоне ингибирования нейрональной NOS, приводил к статистически достоверному изменению активности исследуемых ферментов только в митохондриях сердца: увеличивал активность супероксиддисмутазы – на 23,0% (54,0 у.е./мг белка), активность каталазы и ГлП были на 18,4% ( $p < 0,05$ ) и 19,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно ниже по сравнению с изучаемыми параметрами стрессированных самок с блокадой nNOS, не получавших производное глутаминовой кислоты. Фенибут в аналогичных условиях достоверно изменял только активность каталазы в сердце: она была меньше на 25,8% ( $p < 0,05$ ) относительно таковой животных, не получавших производное ГАМК; остальные показатели имели тенденцию к снижению (Таблица 6).

Таблица 6. Влияние глуфимета и фенибута на активность антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток сердца и головного мозга стрессированных животных в условиях блокады nNOS и iNOS ( $M \pm \sigma$ ).

Группы животных	Исследуемый показатель					
	Супероксиддисмутаза, у.е./мг белка		Каталаза, мг H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин/мг белка		Глутатионпероксидаза, мМ GSH/мин/мг белка	
	Сердце	Мозг	Сердце	Мозг	Сердце	Мозг
Интактная (n = 8)	54,2 ± 3,3	24,8 ± 4,2	13,5 ± 1,5	8,7 ± 0,8	55,1 ± 5,9	17,5 ± 1,0
Стресс + физ.р-р (n = 8)	32,7 ± 4,1* (-39,7%)	18,4 ± 1,5 (-25,8%)	8,4 ± 0,8* (-37,8%)	7,8 ± 1,6 (-10,3%)	26,6 ± 2,9* (-51,7%)	11,6 ± 1,1* (-33,7%)
Стресс + глуфимет (n = 8)	42,1 ± 3,5 (+28,7%)	22,5 ± 3,8 (+22,3%)	13,6 ± 0,6# (+61,9%)	8,8 ± 1,6 (+12,8%)	37,0 ± 3,1 (+39,1%)	15,6 ± 3,5 (+34,5%)
Стресс + фенибут (n = 8)	53,9 ± 3,9# (+64,8%)	28,3 ± 5,2# (+53,8%)	13,0 ± 1,4# (+54,8%)	8,6 ± 1,6 (+10,3%)	56,9 ± 5,5# (+113,9%)	18,0 ± 3,1# (+55,2%)
Стресс + 7-нитроиндазол (n = 8)	43,9 ± 4,0# (+34,2%)	34,0 ± 4,4# (+84,8%)	14,7 ± 0,5# (+75,0%)	9,7 ± 1,0 (+24,3%)	39,7 ± 3,0# (+49,2%)	17,0 ± 3,5# (+46,5%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глуфимет (n = 8)	54,0 ± 6,1 (+23,0%)	36,4 ± 6,0 (+7,1%)	12,0 ± 0,6^ (-18,4%)	9,9 ± 1,7 (+2,1%)	32,1 ± 2,9^ (-19,1%)	17,6 ± 3,3 (+3,5%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут (n = 8)	43,5 ± 5,5 (-0,9%)	26,0 ± 4,5 (-23,5%)	10,9 ± 0,6^ (-25,8%)	8,0 ± 1,3 (-17,5%)	35,1 ± 5,8 (-11,6%)	17,8 ± 5,0 (+4,7%)
Стресс + амингуанидин (n = 8)	44,7 ± 3,5# (+36,7%)	27,1 ± 3,8# (+47,3%)	11,9 ± 1,2# (+41,7%)	8,0 ± 1,9 (+2,6%)	39,9 ± 7,6# (+50,0%)	16,2 ± 3,1# (+39,6%)
Стресс + амингуанидин + глуфимет (n = 8)	39,6 ± 6,9 (-11,4%)	29,9 ± 4,5 (+10,3%)	10,7 ± 0,8 (-10,1%)	7,4 ± 1,0 (-7,5%)	42,5 ± 6,5 (+6,5%)	18,0 ± 4,3 (+11,1%)
Стресс + амингуанидин + фенибут (n = 8)	44,8 ± 6,7 (+0,2%)	25,4 ± 4,4 (-6,3%)	9,3 ± 1,6& (-21,8%)	8,0 ± 1,3 (0,0%)	34,6 ± 6,8 (-13,3%)	15,9 ± 3,0 (-1,8%)

Примечание:

Изменения статистически достоверны относительно аналогичных показателей: \* - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); # - группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ); ^ - самок, получавших ингибитор nNOS 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ); & - животных, которым вводили амингуанидин (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В скобках представлены % изменения показателей в группе:

- стрессированных животных – относительно интактных крыс;
- самок, получавших глуфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных;
- крыс, которым вводили исследуемое соединение и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор.

У стрессированных животных, получавших ингибитор iNOS, наблюдали значительное увеличение активности антиоксидантных ферментов в митохондриях сердца и головного мозга: активность СОД соответственно была выше на 36,7% ( $p < 0,05$ ) и 47,3% ( $p < 0,05$ ) (44,7 и 27,1 у.е./мг белка), каталазы – на 41,7% ( $p < 0,05$ ) в сердце (11,9 мг  $H_2O_2$ /мин/мг белка), ГлП – на 50,0% ( $p < 0,05$ ) и 39,6% ( $p < 0,05$ ) (39,9 и 16,2 мМ GSH/мин/мг белка) по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс. В группах животных, подвергшихся иммобилизационно-болевному стрессу и получавших исследуемые соединения на фоне ингибирования iNOS, статистически достоверных изменений активности антиоксидантных ферментов в митохондриях сердца и головного мозга обнаружено не было относительно самок, которым до стрессирования вводили только аминугуанидин (Таблица 6).

Таким образом, стрессорное воздействие приводило к повышению концентрации первичных и вторичных ПОЛ и уменьшению активности антиоксидантных ферментов, а исследуемые производные глутаминовой кислоты и ГАМК вызывали снижение уровня диеновых конъюгатов, дикетонов и малонового диальдегида, а также увеличивали активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в митохондриях сердца и головного мозга стрессированных животных. При блокаде нейрональной NOS нарастала концентрация продуктов липопероксидации, однако повышалась и активность антиоксидантных ферментов в митохондриях изучаемых органов; глуфимет и фенибут в аналогичных условиях приводили к снижению уровня ДК, дикетонов и МДА. У крыс, которым до стрессирования вводили ингибитор iNOS аминугуанидин, наблюдали снижение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ и повышение активности антиоксидантных ферментов в митохондриях сердца и головного мозга, а у животных, получавших на фоне блокады iNOS исследуемые соединения, достоверных отличий относительно самок без блокады iNOS обнаружено не было.

### 4.3 Влияние глуфимета и фенибута на дыхательную функцию митохондрий сердца и головного мозга стрессированных животных при блокаде различных NO-синтаз

Выше было показано, что стрессорное воздействие приводит к активации процессов липопероксидации, сопровождающихся увеличением концентрации продуктов ПОЛ и снижением активности антиоксидантных ферментов в митохондриях сердца и головного мозга. Митохондрии являются не только главным источником АФК в клетках, но и первичной мишенью повреждения для свободных радикалов [Cui H. et al., 2012; Zorov D.V. et al., 2014]. В результате описанных процессов развивается митохондриальная дисфункция, являющаяся патогенетическим звеном многих заболеваний [Murphy M.P., 2013]. В связи с этим, была изучена дыхательная функция митохондрий сердца и головного мозга стрессированных крыс в условиях блокады различных NO-синтаз, а также влияние производных нейроактивных аминокислот на изучаемые параметры.

При измерении скорости поглощения кислорода митохондриями без АДФ в присутствии только субстратов окисления (состояние  $V_4$  по Чансу) были получены следующие результаты. Стрессорное воздействие приводит к увеличению нестимулированной скорости потребления  $O_2$  митохондриями клеток сердца животных при использовании субстрата первого дыхательного комплекса на 28,8% (17,0 нМ  $O_2$ /мин/мг белка,  $p < 0,05$ ), второго – на 37,4% (18,0 нМ  $O_2$ /мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) относительно таковых интактных крыс (13,2 и 13,1 нМ  $O_2$ /мин/мг белка соответственно). Анализируемый показатель у самок, получавших до подвешивания глуфимет, был ниже на 14,1% (14,6 нМ  $O_2$ /мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) и на 22,2% (14,0 нМ  $O_2$ /мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) при использовании малата/глутамата и сукцината соответственно, а у животных, которым вводили фенибут – на 17,1% и 28,3% соответственно (14,1 и 12,9 нМ  $O_2$ /мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) по сравнению с изучаемыми параметрами стрессированных крыс контрольной группы (Рисунок 12).

Блокада nNOS практически не влияла на  $V_4$  митохондрией клеток сердца при использовании обоих субстратов, а получение в этих условиях животными производных нейроактивных аминокислот приводило к снижению  $V_4$ : при введении глуфимета на 16,7% ( $p < 0,05$ ) при активации первого дыхательного комплекса и на 50,3% ( $p < 0,05$ ) при активации второго (15,0 и 9,3 нМ  $O_2$ /мин/мг белка соответственно), при введении фенибута – на 15,0% ( $p < 0,05$ ) и 31,0% ( $p < 0,05$ ) соответственно (15,3 и 12,9 нМ  $O_2$ /мин/мг белка) относительно стрессированных крыс, получавших только 7-нитроиндазол (Рисунок 12).

Скорость потребления кислорода митохондриями клеток сердца крыс с блокадой индуцибельной NOS, была ниже, чем у самок группы негативного контроля на 21,2% ( $p < 0,05$ ) при использовании малата/глутамата и равнялась 13,4 нМ  $O_2$ /мин/мг белка, сукцината – на 22,2% ( $p < 0,05$ ) и составляла 14,0 нМ  $O_2$ /мин/мг белка. Изучаемые соединения, которые вводили животным с блокадой iNOS до стрессирования, значимо не изменяли исследуемые показатели по сравнению с группой крыс, получавших только аминогуанидин (Рисунок 12).

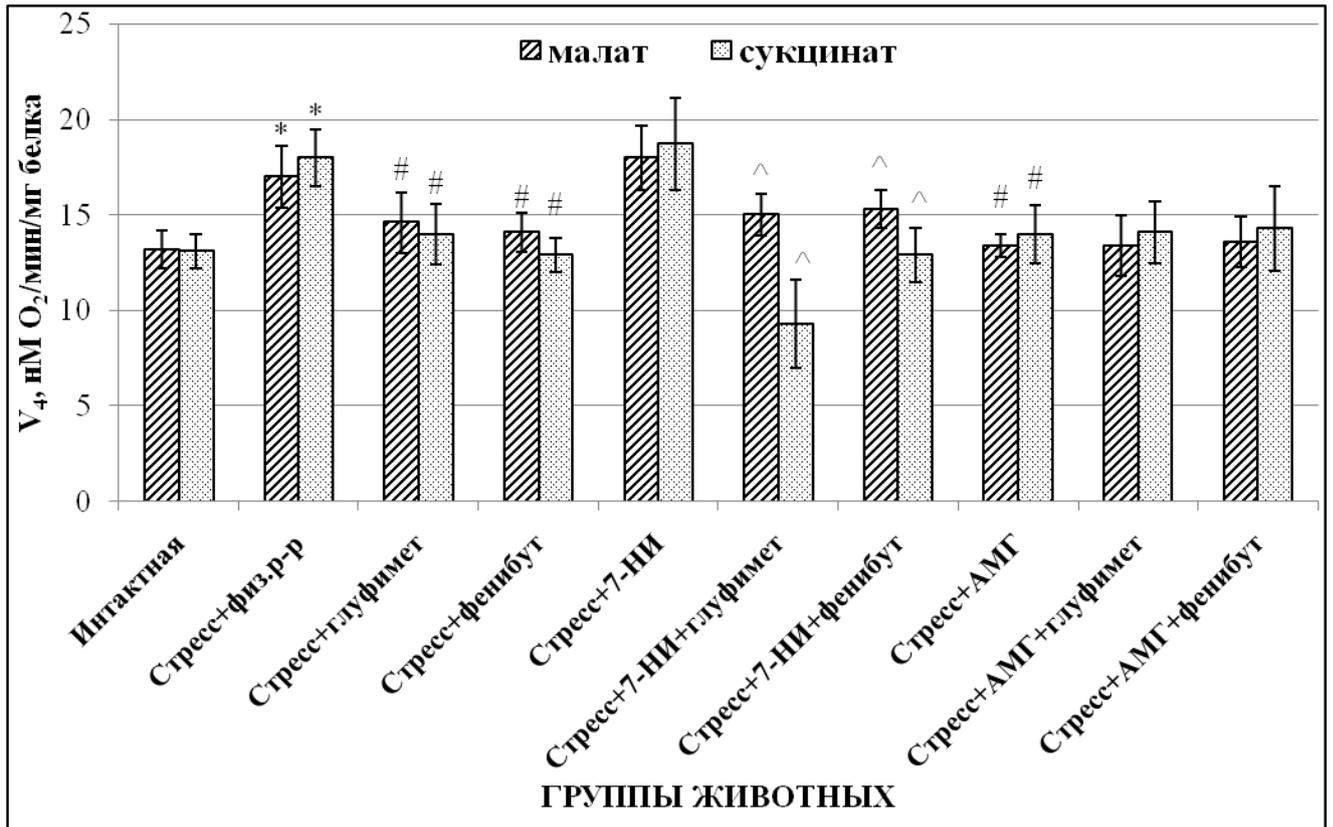


Рисунок 12. Нестимулированная скорость поглощения кислорода ( $V_4$ ) митохондриями клеток сердца животных исследуемых групп при использовании различных субстратов дыхательной цепи ( $M \pm \sigma$ ).

Примечание: 7-НИ - 7-нитроиндазол; АМГ - амингуанидин.

Изменения статистически достоверны относительно:

\* - животных интактной группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - стрессированных крыс контрольной группы (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

^ - стрессированных самок, получавших только 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Скорость потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга при стрессорном воздействии также изменялась: при использовании малата/глутамата она составила  $10,2 \text{ O}_2/\text{мин}/\text{мг}$  белка, сукцината –  $9,1 \text{ O}_2/\text{мин}/\text{мг}$  белка, что было на 32,5% ( $p < 0,05$ ) и 18,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно выше, чем таковые интактных самок ( $7,7 \text{ O}_2/\text{мин}/\text{мг}$  белка для обоих субстратов). Глуфимет и фенибут не приводили к достоверному снижению исследуемых показателей по сравнению с крысами группы негативного контроля, однако была отмечена тенденция к снижению (Рисунок 13).

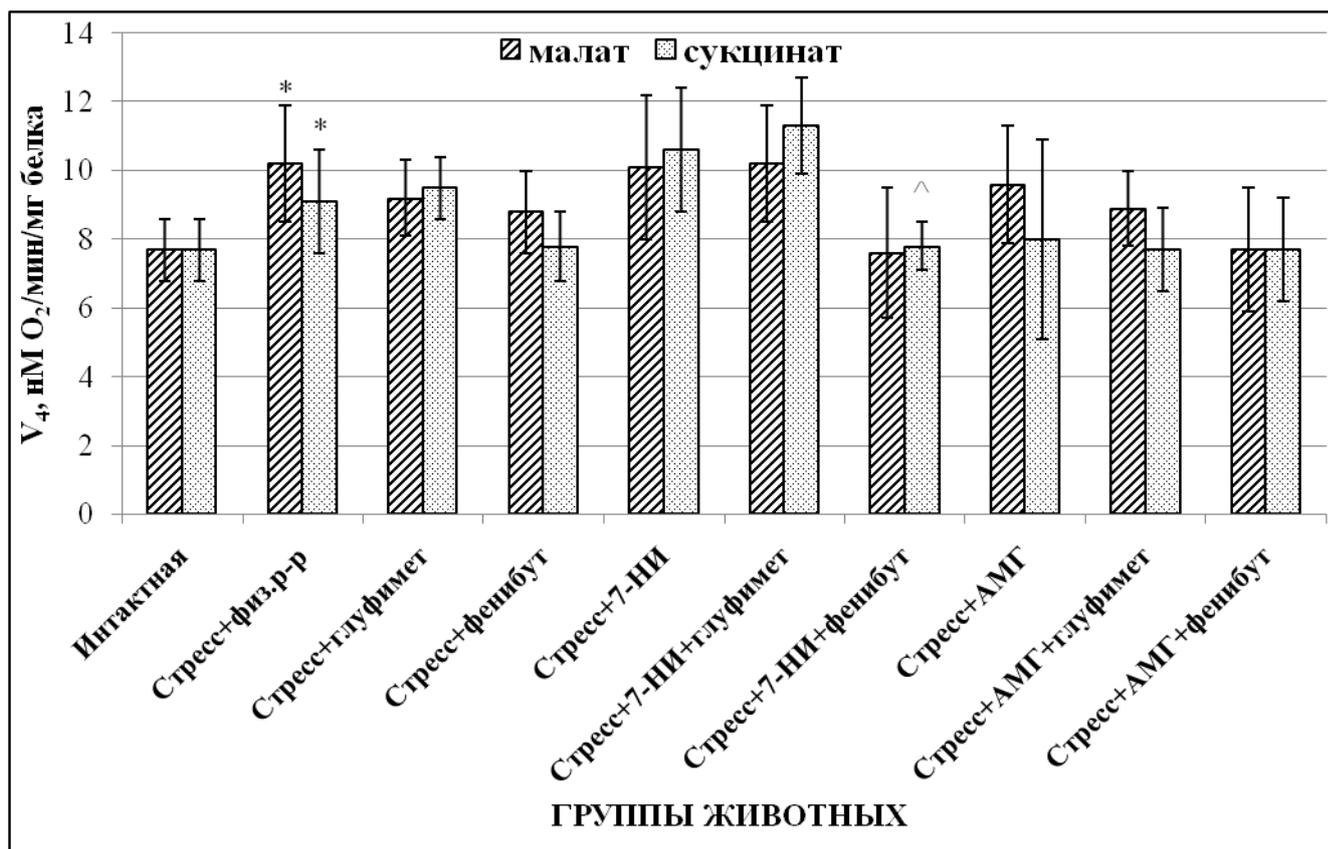


Рисунок 13. Нестимулированная скорость поглощения кислорода ( $V_4$ ) митохондриями клеток головного мозга животных исследуемых групп при использовании различных субстратов дыхательной цепи ( $M \pm \sigma$ ).

Примечание: 7-НИ - 7-нитроиндазол; АМГ - амингуанидин.

Изменения статистически достоверны относительно:

\* - животных интактной группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

<sup>^</sup> - стрессированных самок, получавших 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Ингибирование нейрональной NO-синтазы повышало  $V_4$  митохондрий клеток головного мозга только при использовании активатора второго дыхательного комплекса на 16,5% (10,6 нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка) относительно стрессированных крыс. Глуфимет, который вводили животным на фоне блокады nNOS, не изменял, а фенибут снижал нестимулированную скорость поглощения кислорода митохондриями головного мозга на 24,7% (7,6 нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка) при использовании малата/глутамата и на 26,4% (7,8 нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) при добавлении сукцината по сравнению с аналогичными параметрами группы стрессированных животных, получавших только 7-нитроиндазол (Рисунок 13).

Блокада iNOS приводила к недостоверному снижению изучаемых параметров в митохондриях клеток головного мозга (на 5,9% при активации первого дыхательного комплекса и на 12,1% при активации второго) относительно крыс группы негативного контроля. Исследуемый показатель у самок, получавших до стрессирования производное глутаминовой кислоты и амингуанидин, был ниже на 7,3% (8,9 нМ  $O_2$ /мин/мг белка) при использовании малата/глутамата и на 3,7% (8,0 нМ  $O_2$ /мин/мг белка) при добавлении сукцината в полярографическую ячейку, а у животных, которым вводили фенибут в аналогичных условиях – на 19,8% и 3,7% соответственно (7,7 нМ  $O_2$ /мин/мг белка при использовании обоих субстратов) по сравнению с изучаемыми параметрами стрессированных крыс с блокадой iNOS (Рисунок 13).

При добавлении в ячейку полярографии АДФ (состояние  $V_3$  по Чансу) скорость поглощения кислорода митохондриями клеток сердца и головного мозга увеличивалась.

В митохондриях сердца стимулированное дыхание при использовании малата/глутамата было меньше на 17,1% (72,9 нМ  $O_2$ /мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) у стрессированных животных, чем у интактных крыс (88,0 нМ  $O_2$ /мин/мг белка), а при использовании сукцината снижение было более выражено и составило 20,6% ( $p < 0,05$ ) (у стрессированных животных – 65,4 нМ  $O_2$ /мин/мг белка, у интактных – 82,4 нМ  $O_2$ /мин/мг белка). Глуфимет значительного влияния на исследуемый показатель не оказывал, хотя была отмечена тенденция к его повышению; достоверно увеличивал  $V_3$  у стрессированных самок только фенибут при использовании субстрата первого дыхательного комплекса – на 20,4% (87,8 нМ  $O_2$ /мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) по сравнению с таковым крыс группы негативного контроля (Рисунок 14).

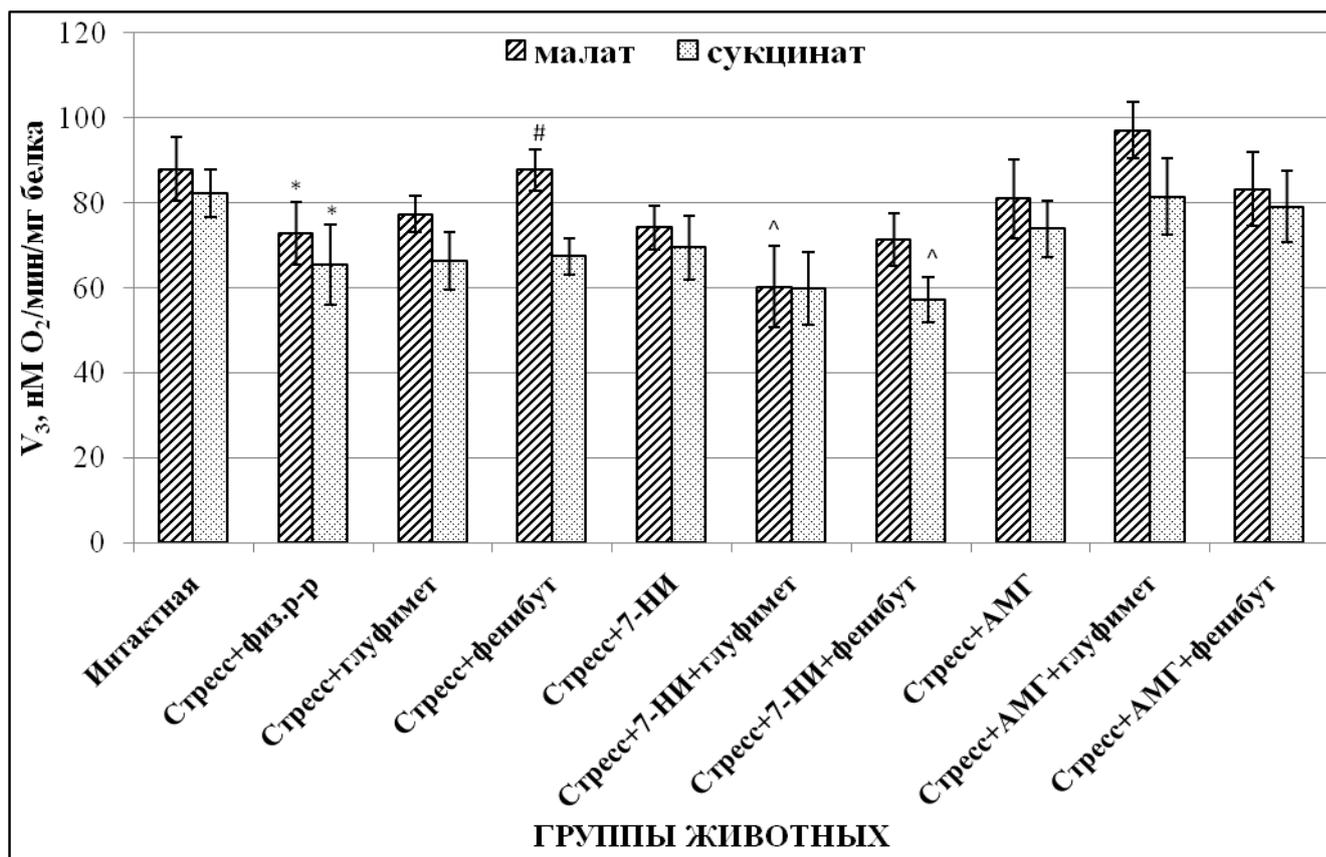


Рисунок 14. Скорость поглощения кислорода митохондриями клеток сердца животных исследуемых групп после добавления АДФ ( $V_3$ ) при использовании субстратов I и II комплексов дыхательной цепи ( $M \pm \sigma$ ).

Примечание: 7-НИ - 7-нитроиндазол; АМГ - амингуанидин.

Изменения статистически достоверны относительно:

\* - животных интактной группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - стрессированных крыс контрольной группы (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

^ - стрессированных самок, получавших только 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Введение самкам 7-нитроиндазола до стрессирования не вызывало изменений  $V_3$  в сердце, а у животных, получавших глуфимет на фоне блокады nNOS, регистрировали снижение ее на 18,7% ( $p < 0,05$ ) при активации первого дыхательного комплекса и на 13,9% при активации второго (60,3 и 59,8 нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка соответственно), при введении фенибута – только второго – на 17,7% соответственно (57,2 нМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) по отношению к таковому стрессированных самок, которые получали только ингибитор nNOS (Рисунок 14).

Блокада индуцибельной NO-синтазы вызывала недостоверное увеличение стимулированной скорости потребления кислорода митохондриями клеток сердца животных при использовании малата/глутамата на 11,1% (81,0 нМ  $O_2$ /мин/мг белка), сукцината – на 13,0% (73,9 нМ  $O_2$ /мин/мг белка) относительно таковых стрессированных крыс. Исследуемый параметр у самок, получавших до подвешивания и глуфимет, и аминугуанидин, был выше на 19,9% (97,1 нМ  $O_2$ /мин/мг белка) при использовании активатора первого дыхательного комплекса и на 10,3% (81,5 нМ  $O_2$ /мин/мг белка) при активации второго, а у животных, которым вводили фенибут на фоне ингибирования iNOS, регистрировали увеличение только при использовании сукцината на 7,0% (79,1 нМ  $O_2$ /мин/мг белка) по сравнению с изучаемыми показателями стрессированных крыс с блокадой iNOS (Рисунок 14).

В митохондриях мозга стимулированная скорость окисления субстратов практически не отличалась при сравнении животных контрольных групп и самок, получавших изучаемые соединения. У крыс, которым вводили ингибитор nNOS, была отмечена тенденция к снижению  $V_3$  при использовании малата/глутамата и сукцината, у животных, получавших в данных условиях глуфимет, наблюдали достоверное увеличение исследуемого параметра на 47,2% при активации первого дыхательного комплекса (60,8 нМ  $O_2$ /мин/мг белка) и на 73,5% при активации второго (58,3 нМ  $O_2$ /мин/мг белка,  $p < 0,05$ ) по сравнению с таковыми стрессированных крыс с блокадой nNOS (41,3 и 33,6 нМ  $O_2$ /мин/мг белка соответственно). У самок, получавших фенибут и 7-нитроиндазол, наблюдали тенденцию к повышению изучаемого показателя (48,8 и 43,4 нМ  $O_2$ /мин/мг белка соответственно) (Рисунок 15).

Ингибирование iNOS приводило к увеличению скорости потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга при использовании различных субстратов окисления, однако достоверной разницы отмечено не было. Аналогичная картина наблюдалась и у самок, получавших и аминугуанидин, и глуфимет. У животных, которым вводили ингибитор iNOS и фенибут до

стрессирования, регистрировали незначительное снижение изучаемого параметра относительно крыс, подвергавшихся стрессу, с блокадой iNOS (Рисунок 15).

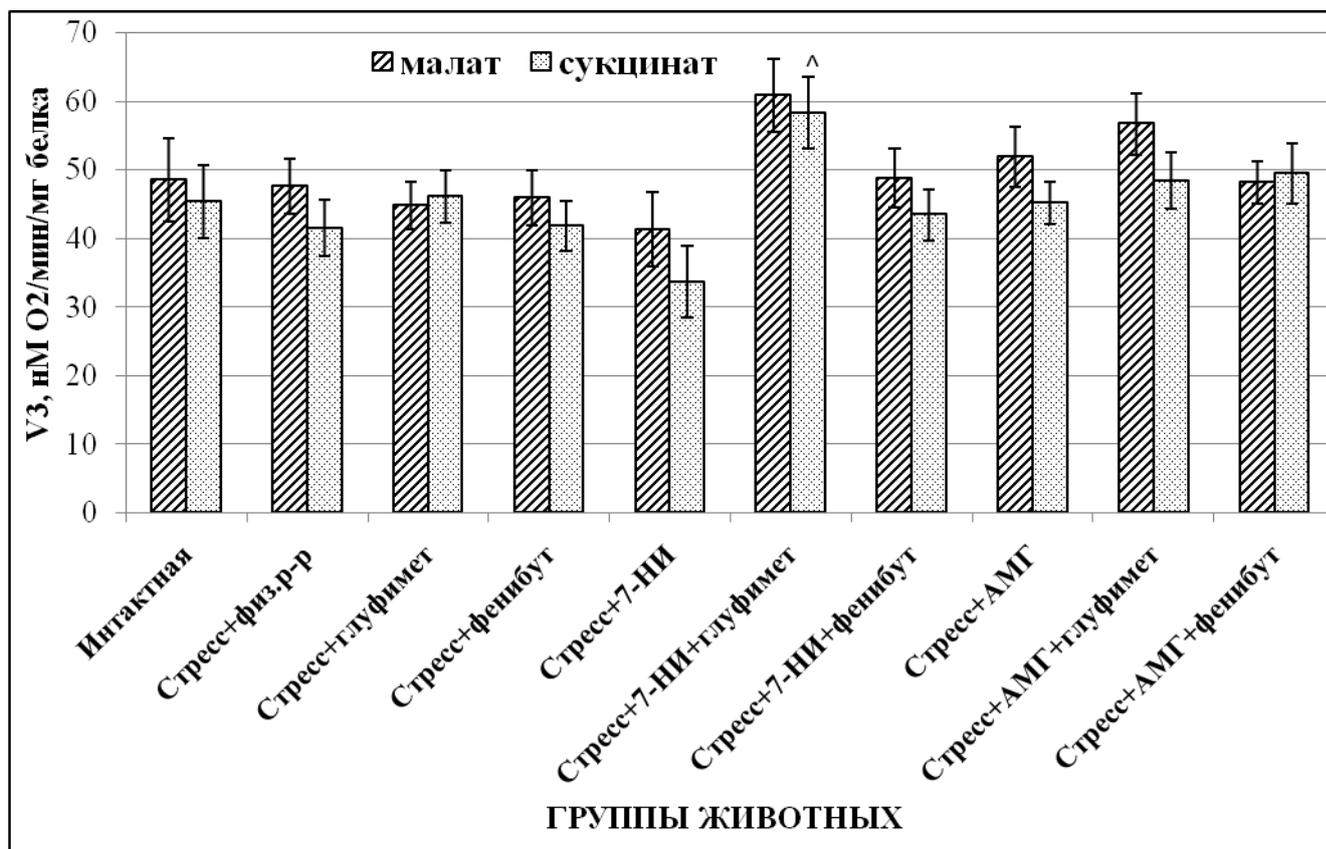


Рисунок 15. Скорость поглощения кислорода митохондриями клеток головного мозга животных исследуемых групп после добавления АДФ ( $V_3$ ) при использовании субстратов I и II комплексов дыхательной цепи ( $M \pm \sigma$ ).

Примечание: 7-НИ - 7-нитроиндазол; АМГ - амингуанидин.

Изменения статистически достоверны относительно:

<sup>^</sup> - стрессированных самок, получавших только 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Для оценки функционального состояния митохондрий и сопряжения процессов дыхания и окислительного фосфорилирования был рассчитан коэффициент дыхательного контроля, который представляет собой отношение  $V_3$  к  $V_4$ . В сердце у стрессированных животных он составлял  $4,3 \pm 0,6$  при использовании малата/глутамата и  $3,6 \pm 0,6$  при использовании сукцината, что было на 35,8% ( $p < 0,05$ ) и 43,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно ниже относительно таковых интактных крыс. Глуфимет и фенибут вызывали увеличение данного показателя по сравнению с самками группы негативного контроля: при введении

животным до подвешивания глүфимета он был на 23,2% ( $p < 0,05$ ) ( $5,3 \pm 0,3$ ) при активации первого дыхательного комплекса и на 33,3% ( $p < 0,05$ ) при активации второго ( $4,8 \pm 0,9$ ), а у крыс, получавших фенибут – на 44,2% ( $p < 0,05$ ) и 44,4% ( $p < 0,05$ ) соответственно ( $6,2 \pm 0,5$  и  $5,2 \pm 0,5$ ) (Таблица 7).

Блокада нейрональной NO-синтазы значимо не приводил к изменению коэффициента дыхательного контроля в митохондриях сердца стрессированных животных, а введение на этом фоне глүфимета вызывало достоверное увеличение только при использовании субстрата второго дыхательного комплекса – на 84,6% ( $7,2 \pm 2,0$ ;  $p < 0,05$ ) относительно таковых самок, не получавших 7-нитроиндазол. У животных, которым вводили ингибитор nNOS и производное ГАМК, была отмечена тенденция к повышению изучаемого параметра по сравнению с аналогичными показателями группы стрессированных крыс, получавших только 7-нитроиндазол (Таблица 7).

Блокада iNOS достоверно увеличивала КДК в митохондриях сердца: на 41,9% ( $p < 0,05$ ) при использовании малата/глутамата ( $6,1 \pm 0,8$ ) и на 50,0% ( $p < 0,05$ ) при использовании сукцината ( $5,4 \pm 0,9$ ) относительно таковых стрессированных самок, которым не вводили аминогуанидин. Глүфимет, который животные получали на фоне блокады iNOS, приводил к увеличению коэффициента дыхательного контроля на 19,7% ( $p < 0,05$ ) при активации первого комплекса митохондрий ( $7,3 \pm 0,7$ ) и на 9,3% при активации второго ( $5,9 \pm 1,2$ ); фенибут практически не изменял исследуемый показатель (Таблица 7).

В митохондриях клеток головного мозга КДК был ниже у стрессированных крыс на 25,0% ( $p < 0,05$ ) при использовании малата/глутамата ( $4,8 \pm 1,0$ ) и на 20,3% ( $p < 0,05$ ) при использовании сукцината ( $4,7 \pm 0,9$ ) по сравнению с аналогичными параметрами интактных самок ( $6,4 \pm 1,2$  и  $5,9 \pm 1,1$  соответственно). У животных, получавших изучаемые соединения, коэффициент дыхательного контроля достоверно не отличался от такового крыс контрольной группы (Таблица 7).

Таблица 7. Значения коэффициента дыхательного контроля в митохондриях клеток сердца и головного мозга животных исследуемых групп ( $M \pm \sigma$ ).

Группы животных	Митохондрии клеток сердца		Митохондрии клеток головного мозга	
	Малат	Сукцинат	Малат	Сукцинат
Интактная (n = 8)	6,7 ± 0,9	6,4 ± 0,7	6,4 ± 1,2	5,9 ± 1,1
Стресс + физ.р-р (n = 8)	4,3 ± 0,6* (-35,8%)	3,6 ± 0,6* (-43,7%)	4,8 ± 1,0* (-25,0%)	4,7 ± 0,9* (-20,3%)
Стресс + глүфимет (n = 8)	5,3 ± 0,3 <sup>#</sup> (+23,2%)	4,8 ± 0,9 <sup>#</sup> (+33,3%)	4,9 ± 0,5 (+2,1%)	4,8 ± 0,5 (+2,1%)
Стресс + фенибут (n = 8)	6,2 ± 0,5 <sup>#</sup> (+44,2%)	5,2 ± 0,5 <sup>#</sup> (+44,4%)	5,3 ± 0,7 (+10,4%)	5,3 ± 0,9 (+12,8%)
Стресс + 7-нитроиндазол (n = 8)	4,2 ± 0,4 (-2,3%)	3,9 ± 0,7 (+8,3%)	4,4 ± 1,4 (-8,3%)	3,2 ± 0,7 <sup>#</sup> (-31,9%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глүфимет (n = 8)	4,0 ± 0,8 (-4,8%)	7,2 ± 2,0 <sup>^</sup> (+84,6%)	6,3 ± 1,8 <sup>^</sup> (+43,2%)	5,2 ± 0,4 <sup>^</sup> (+62,5%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут (n = 8)	4,7 ± 0,5 (+11,9%)	4,5 ± 0,7 (+15,4%)	6,4 ± 1,0 <sup>^</sup> (+45,4%)	5,9 ± 1,3 <sup>^</sup> (+84,4%)
Стресс + аминугуанидин (n = 8)	6,1 ± 0,8 <sup>#</sup> (+41,9%)	5,4 ± 0,9 <sup>#</sup> (+50,0%)	6,0 ± 1,0 (+25,0%)	6,1 ± 1,7 <sup>#</sup> (+29,8%)
Стресс + аминугуанидин + глүфимет (n = 8)	7,3 ± 0,7 <sup>&amp;</sup> (+19,7%)	5,9 ± 1,2 (+9,3%)	6,4 ± 1,2 (+6,7%)	6,6 ± 2,3 (+8,2%)
Стресс + аминугуанидин + фенибут (n = 8)	6,1 ± 0,5 (0,0%)	5,5 ± 0,6 (+1,8%)	6,6 ± 2,5 (+10,0%)	6,6 ± 1,4 (+8,2%)

Примечание:

Изменения статистически достоверны относительно аналогичных показателей:

\* - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

<sup>^</sup> - самок, получавших ингибитор nNOS 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

& - животных, которым вводили аминугуанидин (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В скобках представлены % изменения показателей в группе:

- стрессированных животных – относительно интактных крыс;
- самок, получавших глүфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных;
- крыс, которым вводили и исследуемое соединение, и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор.

Блокада nNOS уменьшала КДК митохондрий клеток мозга при использовании обоих субстратов (на 8,3% и 31,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно), а получение животными в этих условиях производных нейроактивных аминокислот приводило к его повышению: при введении глүфимета на 43,2% ( $p < 0,05$ ) при активации первого дыхательного комплекса и на 62,5% ( $p < 0,05$ ) при активации

второго ( $6,3 \pm 1,8$  и  $5,2 \pm 0,4$  соответственно), при введении фенибута – на 45,4% ( $p < 0,05$ ) и 84,4% ( $p < 0,05$ ) соответственно ( $6,4 \pm 1,0$  и  $5,9 \pm 1,3$ ) относительно стрессированных крыс, получавших только 7-нитроиндазол (Таблица 7).

В митохондриях клеток головного мозга животных с блокадой индуцибельной NOS коэффициент дыхательного контроля при использовании малата/глутамата был выше на 25,0% ( $6,0 \pm 1,0$ ), чем у стрессированных крыс, а при использовании сукцината увеличение составило 29,8% ( $p < 0,05$ ) ( $6,1 \pm 1,7$ ). Производные глутаминовой кислоты и ГАМК, которые вводили до стрессирования самкам с ингибированием iNOS, способствовали незначительному повышению изучаемых параметров по сравнению с таковыми группы животных, не получавших аминуганидин (Таблица 7).

В результате проведенной серии экспериментов выявлено, что стрессорное воздействие приводит к разобщению процессов дыхания митохондрий сердца и головного мозга и фосфорилирования, что выражалось в увеличении нестимулированной скорости поглощения кислорода, снижении стимулированной и коэффициента дыхательного контроля при использовании различных субстратов. Глуфимет и фенибут улучшали показатели функционального состояния митохондрий, увеличивая сопряжение процессов окисления субстратов и синтеза АТФ в митохондриях. Блокада нейрональной NOS значимо не изменяла дыхание митохондрий сердца и головного мозга стрессированных крыс, а введение животным на этом фоне изучаемых соединений достоверно увеличивало исследуемые показатели. Блокада индуцибельной NOS также улучшала функционирование митохондрий сердца и головного мозга, глуфимет и фенибут на этом фоне достоверно не изменяли анализируемые параметры относительно стрессированных самок, получавших только аминуганидин.

#### **4.4 Изучение влияния производных нейроактивных аминокислот на уровень артериального давления стрессированных животных при блокаде nNOS и iNOS**

Повреждение митохондрий свободными радикалами в клетках эндотелия сосудов провоцирует их дисфункцию, что является основой для развития таких патологических состояний, как атеросклероз и артериальная гипертензия [Tang X. et al., 2014]. Кроме того известно, что в результате действия гормонов симпатической нервной системы при стрессе происходит увеличение сосудистого тонуса, усиление агрегации тромбоцитов, а также активация ренин-ангиотен-альдостероновой системы, что усугубляет дисфункцию эндотелия [Toda N. et al., 2011; Carda A.P.P. et al., 2015]. Повышение активности стресс-системы вызывает развитие гипертонии [Бузуева И.И. и др., 2010]. Вследствие этого, было изучено влияние глуфимета и фенибута на уровень среднего артериального давления животных в условиях стрессорного воздействия и блокады различных NO-синтаз.

Выявлено, что у интактных самок уровень среднего артериального давления не изменялся и составлял 100,4 мм рт.ст. (исход) и 99,8 мм рт.ст. через 24 часа. Стрессорное воздействие вызывало повышение исследуемого показателя у 5 животных из 8 на 18,9% (среднее значение 120,4 мм рт.ст.) относительно исходных значений (101,7 мм рт.ст.), а у остальных 3 самок АД снижалось к 24 часу подвешивания на 16,4% (83,8 мм рт.ст.). Введение крысам до стрессирования исследуемых соединений предотвращало прирост анализируемого параметра: у животных, получавших глуфимет, исходное срАД составило 103,1 мм рт.ст. и 103,2 мм рт.ст. после иммобилизационно-болевого воздействия, фенибут – 102,8 и 102,1 мм рт.ст. соответственно (Рисунок 16).

У всех стрессированных самок с блокадой нейрональной NOS наблюдалось снижение уровня срАД на 14,1% относительно исхода ( $p < 0,05$  по сравнению с аналогичным показателем стрессированных крыс): до стрессорного воздействия оно равнялось 102,6 мм рт.ст., а после него – 88,0 мм рт.ст. Введение животным

изучаемых веществ и 7-нитроиндазола не вызывало изменений прироста срАД относительно исходных данных (Рисунок 16).

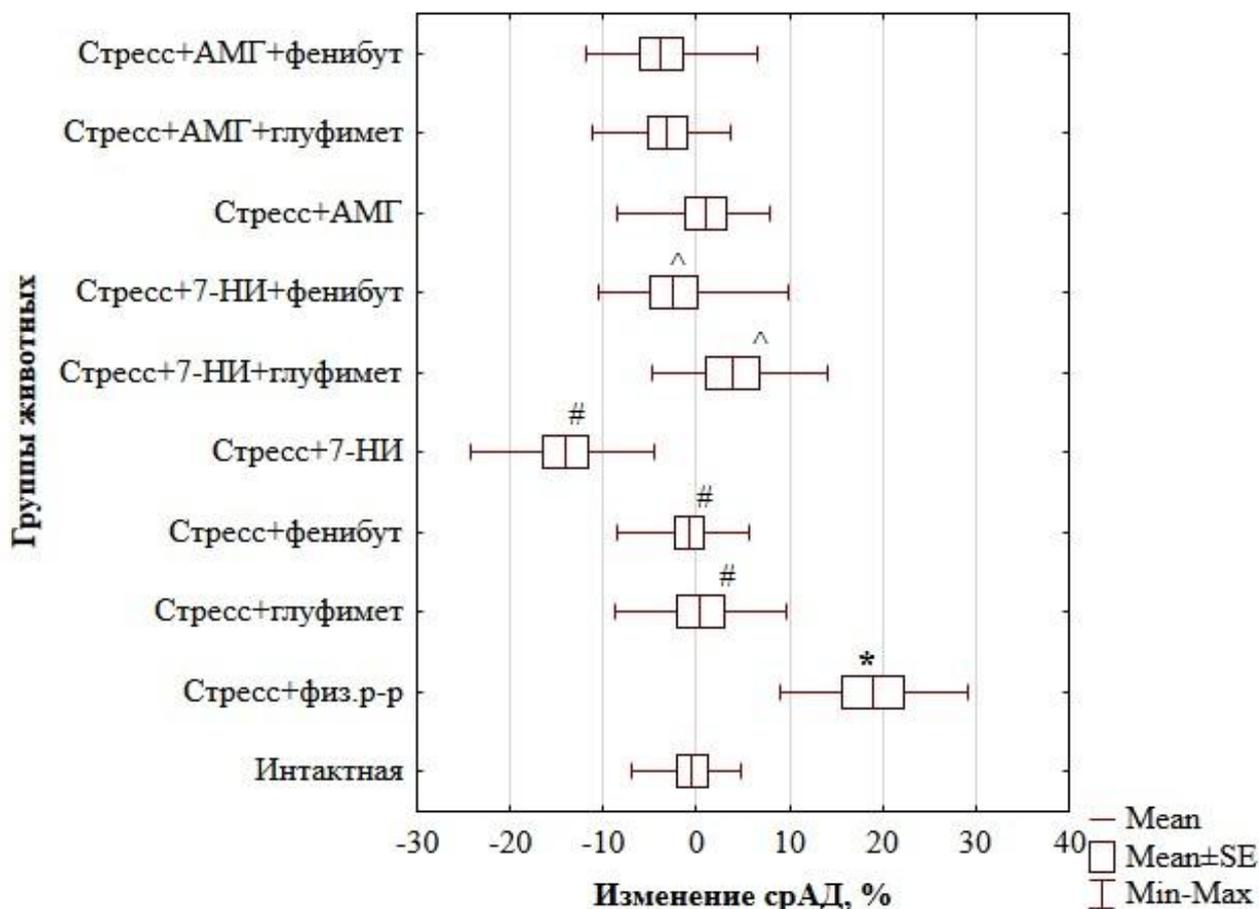


Рисунок 16. Изменение прироста уровня среднего артериального давления у животных исследуемых групп в %.

Примечание: 7-НИ – 7-нитроиндазол, АМГ – амингуанидин.

\* - изменения достоверны относительно животных интактной группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных самок (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

^ - изменения достоверны относительно группы стрессированных крыс, получавших 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Блокада iNOS, так же, как и введение глуфимета и фенибута на ее фоне, не вызывали изменение уровня артериального давления по сравнению с исходными значениями (Рисунок 16).

Таким образом, иммобилизационно-болевого стресс приводил к увеличению уровня артериального давления относительно исхода, а блокада nNOS – к резкому снижению такового. Изучаемые производные нейроактивных аминокислот,

которые вводили как на фоне блокады NO-синтаз, так и без нее, предотвращали изменение уровня срАД. У животных, получавших аминогуанидин, также не регистрировали изменения исследуемого показателя по сравнению с фоновыми значениями.

#### **4.5 Оценка показателей системы гемостаза стрессированных животных и влияния на них производных нейроактивных аминокислот в условиях блокады различных NO-синтаз**

Эндотелий, помимо участия в регуляции артериального давления, контролирует процессы гемостаза и реологические свойства крови. Неповрежденные эндотелиоциты препятствуют свертыванию крови и процессам тромбогенеза [van Hinsbergh V.W., 2012]. Катехоламины, выброс которых усиливается при стрессорном воздействии, способны повреждать эндотелий, приводить к его дисфункции и сдвигу антикоагулянтного потенциала в сторону прокоагулянтного [Johansson P.I. et al., 2015]. В связи с этим было изучено влияние глуфимета и фенибута на показатели сосудисто-тромбоцитарного и плазменно-коагуляционного звеньев гемостаза у стрессированных животных и в условиях блокады различных NOS.

Обнаружено, что у стрессированных животных увеличивались степень и скорость агрегации тромбоцитов на 24,4% ( $p < 0,05$ ) и 42,5% ( $p < 0,05$ ), которые составляли 31,1% и 35,2%/мин соответственно по сравнению с интактными самками (25,0% и 24,7 %/мин). АЧТВ и ПВ были меньше таковых крыс группы позитивного контроля на 19,6% ( $p < 0,05$ ) и 19,5% ( $p < 0,05$ ) (13,1 с и 18,6 с) соответственно, а концентрация фибриногена выше на 60,6% (5,3 г/л) ( $p < 0,05$ ). Введение самкам до стрессирования изучаемых соединений снижало степень и скорость агрегации тромбоцитов: у животных, получавших глуфимет, исследуемые параметры были ниже на 24,1% ( $p < 0,05$ ) и 27,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно (23,6% и 25,4%/мин), а получавших фенибут – на 23,8% ( $p < 0,05$ ) и 30,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно (23,7% и 24,4 %/мин) относительно

стрессированных крыс. Глуфимет достоверно снижал только концентрацию фибриногена на 13,2% (4,6 г/л,  $p < 0,05$ ), а фенибут – повышал АЧТВ на 8,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковыми самок группы негативного контроля (Таблица 8).

Введение самкам 7-нитроиндазола до стрессирования не приводило к изменению исследуемых параметров, а у животных, получавших изучаемые соединения на фоне блокады nNOS, регистрировали снижение степени и скорости агрегации тромбоцитов по отношению к таковым стрессированных самок, которые получали только ингибитор nNOS: при введении глуфимета – на 14,4% ( $p < 0,05$ ) и 21,6% ( $p < 0,05$ ) (26,2% и 27,6%/мин) соответственно, при введении фенибута – на 5,9% и 23,9% ( $p < 0,05$ ) соответственно (28,8% и 26,8%/мин). АЧТВ достоверно было выше у животных, получавших 7-нитроиндазол и фенибут на 9,3% (14,1 с,  $p < 0,05$ ), а ПВ – 7-нитроиндазол и глуфимет на 20,2% (21,4 с,  $p < 0,05$ ), в остальном регистрировали тенденцию к повышению (Таблица 8).

Таблица 8. Влияние глуфимета и фенибута на показатели системы гемостаза стрессированных животных в условиях блокады nNOS и iNOS ( $M \pm \sigma$ ).

Группы животных	Степень агрегации, %	Скорость агрегации, %/мин	АЧТВ, с	ПВ, с	Концентрация фибриногена, г/л
Интактная	25,0 ± 2,5	24,7 ± 3,0	16,3 ± 0,9	23,1 ± 5,3	3,3 ± 1,1
Стресс + физ.р-р (n = 8)	31,1 ± 3,5* (+24,4%)	35,2 ± 2,9* (+42,5%)	13,1 ± 0,5* (-19,6%)	18,6 ± 3,7* (-19,5%)	5,3 ± 0,4* (+60,6%)
Стресс + глуфимет (n = 8)	23,6 ± 3,2# (-24,1%)	25,4 ± 2,8# (-27,8%)	13,9 ± 0,9 (+6,1%)	18,2 ± 2,7 (-2,1%)	4,6 ± 1,1# (-13,2%)
Стресс + фенибут (n = 8)	23,7 ± 2,5# (-23,8%)	24,4 ± 3,6# (-30,7%)	14,2 ± 0,7# (+8,4%)	19,7 ± 2,7 (+5,9%)	4,8 ± 1,2 (-9,4%)
Стресс + 7-нитроиндазол (n = 8)	30,6 ± 3,1 (-1,6%)	35,2 ± 4,9 (0,0%)	12,9 ± 1,5 (-1,5%)	17,8 ± 3,9 (-4,3%)	5,1 ± 0,4 (-3,8%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глуфимет (n = 8)	26,2 ± 1,6^ (-14,4%)	27,6 ± 3,7^ (-21,6%)	13,2 ± 2,4 (+2,3%)	21,4 ± 2,4^ (+20,2%)	5,3 ± 0,5 (+3,9%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут (n = 8)	28,8 ± 2,7 (-5,9%)	26,8 ± 1,9^ (-23,9%)	14,1 ± 1,7^ (+9,3%)	18,9 ± 4,2 (+6,2%)	4,8 ± 0,8 (-5,9%)
Стресс + аминугуанидин	24,5 ± 2,8# (-21,2%)	28,2 ± 2,9# (-19,9%)	12,9 ± 1,5 (-1,5%)	18,2 ± 3,1 (-2,1%)	4,9 ± 0,9 (-7,5%)

Продолжение таблицы 8.

Группы животных	Степень агрегации, %	Скорость агрегации, %/мин	АЧТВ, с	ПВ, с	Концентрация фибриногена, г/л
Стресс + амингуанидин + глуфимет (n = 8)	22,3 ± 2,6 (-9,0%)	27,6 ± 3,3 (-2,1%)	13,6 ± 1,8 (+5,4%)	19,0 ± 3,7 (+4,4%)	5,0 ± 0,6 (+2,0%)
Стресс + амингуанидин + фенибут (n = 8)	23,7 ± 1,6 (-3,3%)	27,5 ± 4,5 (-2,5%)	14,0 ± 1,3 (+8,5%)	18,1 ± 2,5 (-0,5%)	4,8 ± 0,9 (-2,0%)

Примечание: изменения статистически достоверны относительно аналогичных показателей: \* - интактной группы животных (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); # - группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ); ^ - самок, получавших ингибитор nNOS 7-нитроиндазол (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ );

В скобках представлены % изменения показателей в группе:

- стрессированных животных – относительно интактных крыс;
- самок, получавших глуфимет, фенибут или ингибитор – относительно группы стрессированных животных;
- крыс, которым вводили и исследуемое соединение, и ингибитор – относительно самок, получавших только соответствующий ингибитор.

У животных с блокадой индуцибельной NO-синтазы снижались степень и скорость агрегации тромбоцитов на 21,2% ( $p < 0,05$ ) и 19,9% ( $p < 0,05$ ), которые составляли 24,5% и 28,2%/мин соответственно по сравнению со стрессированными крысами группы негативного контроля. АЧТВ и ПВ у них значимо не изменялись, а концентрация фибриногена была меньше таковой стрессированных самок на 7,5% (4,9 г/л). Введение самкам до стрессирования изучаемых соединений и амингуанидина снижало степень и скорость агрегации тромбоцитов, но достоверной разницы получено не было относительно таковых животных, не получавших ингибитор iNOS. Глуфимет, который животные получали на фоне блокады iNOS, пролонгировал АЧТВ и ПВ (13,6 с и 19,0 с соответственно), однако достоверных отличий от данных показателей крыс с ингибированием iNOS, зафиксировано не было. Аналогичное влияние оказывал и фенибут. Изменение концентрации фибриногена у самок этих опытных групп относительно животных, получавших только амингуанидин, не наблюдали (Таблица 8).

Таким образом было отмечено, что у стрессированных животных увеличиваются степень, скорость агрегации тромбоцитов и концентрация

фибриногена, а также укорачиваются АЧТВ и ПВ. Глуфимет и фенибут оказывали антиагрегантное действие, однако на показатели плазменного звена гемостаза существенно не влияли. Блокада nNOS существенно не изменяла исследуемые показатели относительно таковых стрессированных животных. Глуфимет и фенибут, которые самки получали совместно с 7-нитроиндазолом, снижали степень, скорость агрегации тромбоцитов и удлиняли АЧТВ и ПВ. Ингибитор iNOS снижал степень и скорость агрегации, на АЧТВ, ПВ и концентрацию фибриногена влияния не оказывал. У крыс, получавших и аминугуанидин, и производные нейроактивных аминокислот, достоверных изменений анализируемых показателей обнаружено не было по сравнению с аналогичными параметрами стрессированных самок с блокадой iNOS.

В результаты серии экспериментов было выявлено, что стрессорное воздействие приводит к увеличению концентрации метаболитов оксида азота в гомогенатах сердца, головного мозга и сыворотке крови, уровня продуктов липопероксидации в митохондриях клеток сердца и головного мозга, а также снижение в них активности антиоксидантных ферментов. Все это вызывает разобщение процессов дыхания и фосфорилирования в митохондриях, развитие эндотелиальной дисфункции, проявляющейся увеличением артериального давления, степени и скорости агрегации тромбоцитов, концентрации фибриногена, а также укорочением АЧТВ и ПВ. Глуфимет и фенибут, вероятно, ограничивали экспрессию iNOS и синтез большого количества NO в сердце и мозге, в результате чего уменьшалась интенсивность процессов ПОЛ, улучшалось дыхание митохондрий и функция эндотелия. Блокада nNOS оказывала негативное действие на исследуемые параметры, а ингибирование iNOS приводило к ограничению повреждающего действия стресса. Исследуемые соединения реализовывали свои эффекты на фоне блокады нейрональной NOS и не оказывали существенного влияния при ингибировании индуцибельной изоформы NO-синтазы, что может свидетельствовать об изменении производными нейроактивных аминокислот экспрессии или активности iNOS.

## **ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЦЕНТРАЛЬНОГО И ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НО-ЕРГИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ**

### **5.1. Изучение центрального NO-ергического компонента в механизме действия глуфимета и фенибута**

ГАМК и глутаминовая кислота реализуют свои эффекты в основном на центральном уровне, являясь транмиттерами различных нейромедиаторных систем. Известно об их тесной функциональной взаимосвязи с NO [Busnardo C. et al., 2010; Kamran M. et al., 2013]. В связи с этим было целесообразным изучение реализации центральных эффектов производных глутамата – глуфимета и ГАМК – фенибута в условиях неселективного ингибирования NO-синтаз и блокады ГАМКа- рецептора.

После введения глуфимета в боковой желудочек мозга у всех животных наблюдали снижение систолического АД (сАД) в среднем на 21,4 мм рт.ст., что составило 26,5% по сравнению с исходным уровнем. Примерно к 40-ой минуте САД достигало начальных значений, после чего вводили ингибитор NO-синтаз L-NAME, регистрировали прирост исследуемого показателя и через 10 минут наблюдали его максимум, который составил в среднем 10,9%. На высоте подъема САД вновь вводили глуфимет, после чего не наблюдали изменение изучаемого параметра (Рисунок 17А).

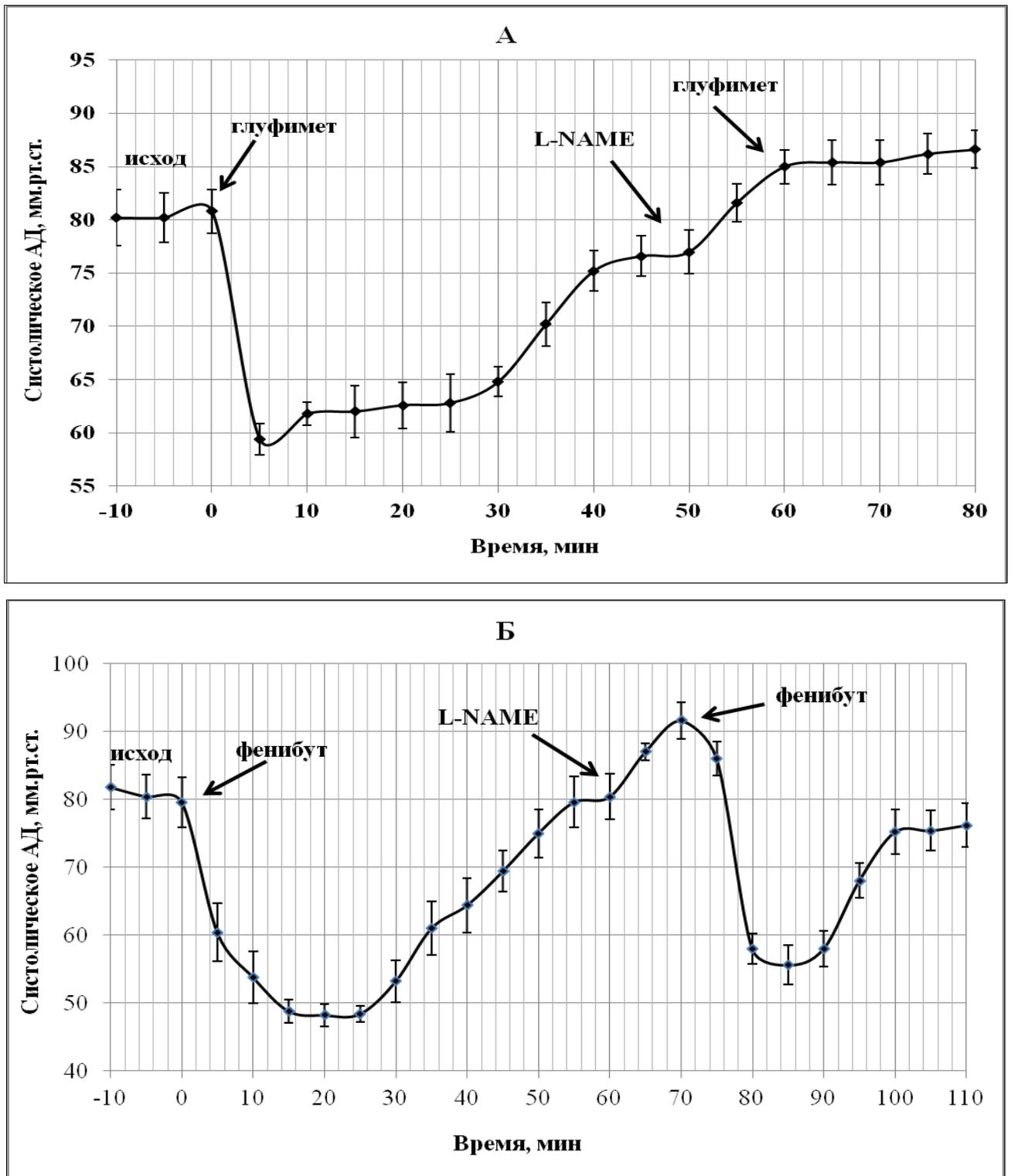


Рисунок 17. Изменение САД после введения глуфимета (А) и фенибута (Б) в боковые желудочки мозга в обычных условиях и на фоне ингибирования NO-синтаз L-NAME ( $M \pm m$ ).

По аналогичной схеме изучали влияние фенибута. Снижение исследуемого показателя к 15-й минуте после его введения составило 39,4% относительно

исходного уровня и к 55-й минуте САД возвращалось к начальным значениям. L-NAME также приводил к приросту изучаемого параметра в среднем на 11,2 мм рт.ст. (13,9%). После повторного введения фенибута вновь наблюдали снижение уровня САД, наиболее выраженное к 15 минуте, на 39,3%, однако, его продолжительность была меньше (Рисунок 17Б).

Известно, что глутаматергическая система тесно взаимодействует с ГАМК-ергической. Глутамат служит основным возбуждающим, а ГАМК – главным тормозным нейротрансмиттером в коре мозга млекопитающих. Кроме того, глутаминовая кислота является метаболическим предшественником ГАМК [Вак Л.К. et al., 2006]. В связи с этим, была исследована реализация эффектов производных нейроактивных аминокислот после их центрального введения на фоне блокады ГАМКа-рецепторов бичукулином.

Глуфимет приводил к снижению уровня САД на 26,8 мм рт.ст. (31,4%) относительно начальных значений, а бичукулин к приросту изучаемого параметра к 5-ой минуте на 18,8 мм рт.ст., что составило 23,6% по сравнению с исходным уровнем. При введении на высоте подъема САД глуфимета регистрировали незначительное снижение исследуемого показателя, наиболее выраженное к 10 минуте, на 6,6 мм рт.ст. (6,7%) (Рисунок 18А).

Фенибут вызывал уменьшение уровня САД на 34,4% (29,4 мм рт.ст.) по сравнению с исходным уровнем. Введение бичукулина в боковой желудочек мозга приводило к увеличению исследуемого показателя на 22,2 мм рт.ст., что составило 25,6% относительно начальных значений. Повторное введение производного ГАМК на высоте подъема САД также сопровождалось снижением изучаемого параметра на 52,8 мм рт.ст. (48,9%), однако оно было менее продолжительным, чем после введения фенибута без блокады ГАМКа-рецепторов (Рисунок 18Б).

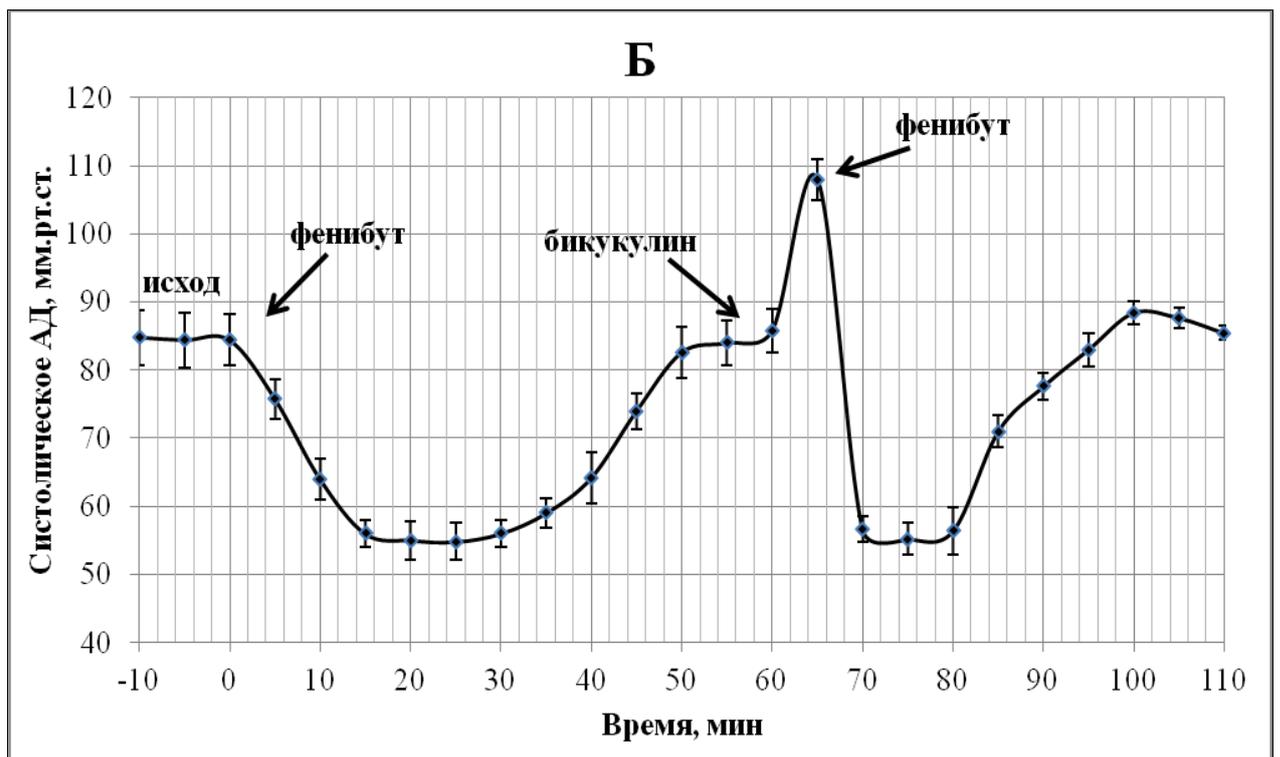
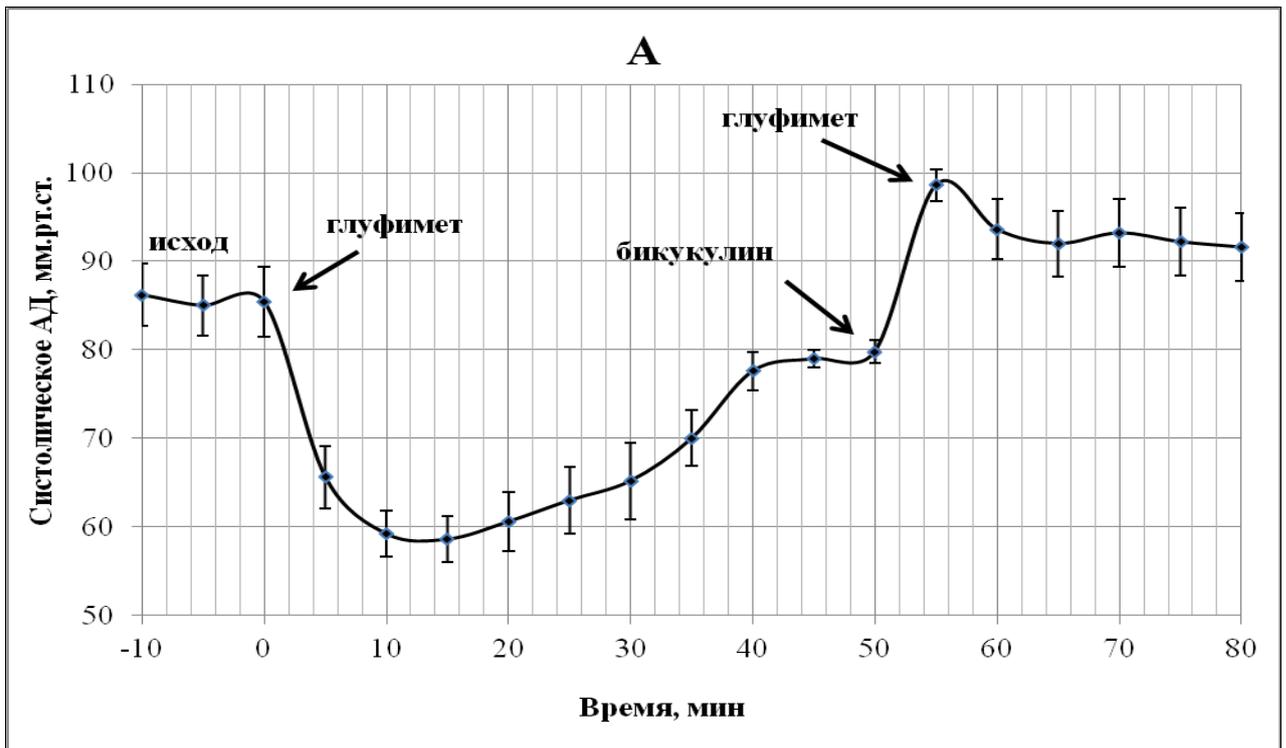


Рисунок 18. Изменение САД после введения глуфимета (А) и фенибута (Б) в боковые желудочки мозга в обычных условиях и на фоне блокады ГАМК-рецепторов бикукулином ( $M \pm m$ ).

Таким образом, исследуемые соединения, которые вводили в боковые желудочки мозга, вызвали уменьшение САД. Введение глуфимета при

ингибировании NO-синтазы не сопровождалось изменением исследуемого показателя, а при блокаде ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов он снижался, причем это изменение было менее выражено, чем без блокады. Фенибут приводил к снижению САД как на фоне введения L-NAME, так и бикикулина.

## **5.2. Изучение *in vitro* влияния глуфимета и фенибута на экспрессию индуцибельной NO-синтазы в перитонеальных макрофагах мышей**

iNOS экспрессируется во многих типах клеток в ответ на действие бактериальных липополисахаридов, цитокинов и других агентов и продуцирует большое количество NO, который участвует в реакциях иммунитета и противоопухолевой защиты [Förstermann U. et al., 2012]. Однако его высокий уровень может быть токсичным и для собственных здоровых тканей. Пероксинитрит, образованный при взаимодействии оксид азота с супероксид-анионом, способен ингибировать дыхательные комплексы митохондрий с развитием дефицита АТФ в клетке [Sarti P. et al., 2012; Chen H.J. et al., 2015]. Он также индуцирует окислительный стресс, взаимодействуя с липидами, ДНК и белками [Gebicka L. et al., 2010]. Все это приводит к развитию некроза или апоптоза. В связи с этим целесообразным является изучение влияния глуфимета и фенибута на экспрессию iNOS.

По результатам исследования выявлено, что концентрация индуцибельной NOS в перитонеальных макрофагах, которые инкубировались с добавлением ЛПС, составляла 2,80 нг/мл и была достоверно на 218,2% ( $p < 0,05$ ) выше по сравнению с аналогичным показателем интактных клеток (0,88 нг/мл). В макрофагах, которые культивировались в лунках с ЛПС и глуфиметом, уровень iNOS равнялся 1,83 нг/мл и был на 34,6% ( $p < 0,05$ ) ниже, чем в клетках контрольной группы. Фенибут, добавленный в питательную среду вместе с ЛПС, приводил к снижению концентрации iNOS в макрофагах на 46,8% (1,49 нг/мл,  $p < 0,05$ ) относительно таковой клеток, которые инкубировались только с ЛПС (Рисунок 19А).

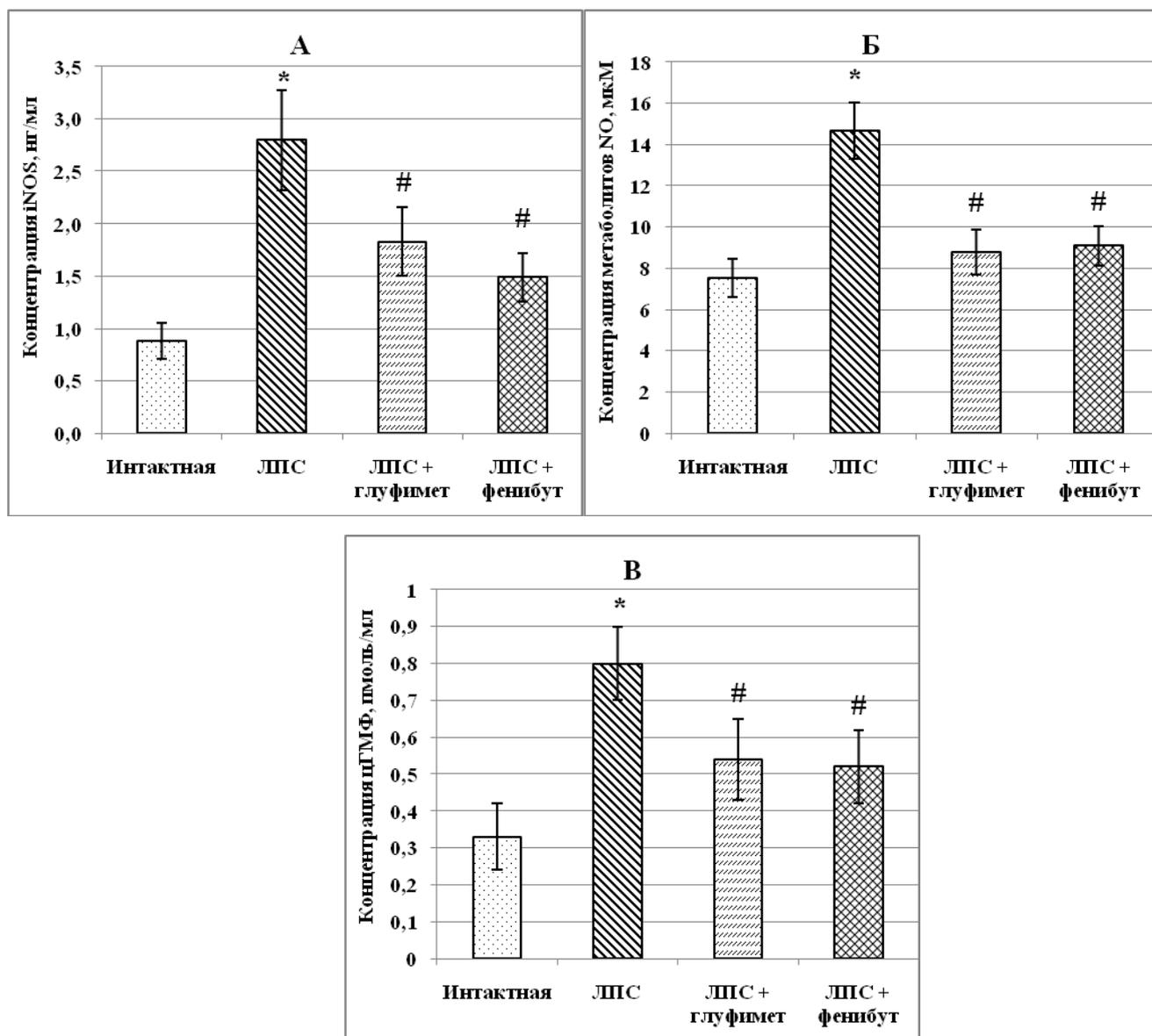


Рисунок 19. Влияние глутимета и фенибута на концентрацию индуцибельной NOS (А), конечных метаболитов оксида азота (Б) и цГМФ (В) в перитонеальных макрофагах мышей ( $M \pm \sigma$ ).

Примечание:

\* - изменения достоверны относительно соответствующих показателей интактной группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны относительно соответствующих показателей контрольной группы (ЛПС) (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Вследствие этого изменялась и концентрация конечных метаболитов оксида азота: в среде культивирования с содержанием ЛПС она составила 14,66 мкмоль/л и была на 94,7% ( $p < 0,05$ ) выше относительно изучаемого параметра клеток интактной группы (7,53 мкмоль/л). При добавлении в питательную среду ЛПС и

глуфимета наблюдалось существенное снижение исследуемого показателя на 40,0% (8,80 мкмоль/л,  $p < 0,05$ ) по сравнению с клетками, которые инкубировались только с ЛПС. Производное ГАМК вызывало аналогичные изменения: уровень конечных метаболитов NO в среде культивирования с ЛПС и фенибутом равнялся 9,09 мкмоль/л и был достоверно ниже такового с содержанием только ЛПС на 38,0% ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 19Б).

Оксид азота увеличивает активность растворимой гуанилатциклазы, производящей цГМФ, ввиду чего концентрация последнего составляла 0,80 пмоль/мл и была достоверно на 142,4% ( $p < 0,05$ ) выше в лизатах макрофагов, которые инкубировались с добавлением в питательную среду ЛПС относительного изучаемого параметра интактных клеток (0,33 пмоль/мл). Глуфимет, добавленный в среду культивирования с ЛПС, снижал уровень цГМФ на 32,5% (0,54 пмоль/мл,  $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным показателем макрофагов контрольной группы. В клетках, которые инкубировались в среде с ЛПС и фенибутом, концентрация цГМФ равнялась 0,52 пмоль/мл и была на 35,0% ( $p < 0,05$ ) ниже, чем в активированных ЛПС макрофагах (Рисунок 19В).

Таким образом, при инкубации перитонеальных макрофагов в питательной среде с содержанием липополисахарида увеличивается экспрессия индуцибельной NO-синтазы, что выражается в увеличении концентрации iNOS и цГМФ в лизатах клеток, а также конечных метаболитов NO в среде их культивирования. Производные нейроактивных аминокислот приводят к снижению концентрации iNOS и цГМФ, а также уровня нитрит- и нитрат-ионов в питательной среде.

### **5.3. Изучение *ex vivo* влияния исследуемых соединений на экспрессию индуцибельной NO-синтазы в перитонеальных макрофагах мышей**

Представленные в предыдущем разделе данные *in vitro* свидетельствуют об уменьшении ЛПС-индуцированной экспрессии iNOS в перитонеальных макрофагах мышей под действием производных нейроактивных аминокислот.

ЛПС, введенный внутривенно, также вызывает активацию макрофагов, увеличение активности индуцибельной NO-синтазы, продукцию в больших концентрациях оксида азота, который проявляет цитотоксические свойства [Филимонова М.В., 2015]. В этой серии экспериментов было изучено *ex vivo* влияние глуфимета и фенибута на экспрессию iNOS активированных макрофагах.

Концентрация индуцибельной NO-синтазы в лизатах перитонеальных макрофагов мышей, которым вводили ЛПС, равнялась 2,33 нг/мл и была на 177,4% ( $p < 0,05$ ) выше относительно таковой клеток интактных самцов (0,84 нг/мл). У животных, получавших глуфимет на фоне ЛПС, исследуемый показатель составил 1,39 нг/мл, что было на 40,3% ( $p < 0,05$ ) ниже, чем в макрофагах мышей, которым вводили только ЛПС. Фенибут также уменьшал концентрацию iNOS: в макрофагах мышей, получавших производное ГАМК и ЛПС, она была меньше на 70,0% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы крыс и равнялась 0,70 нг/мл (Рисунок 20А).

Соответственно изменялась и концентрация конечных метаболитов NO. В ЛПС-активированных макрофагах мышей данный показатель равнялся 19,93 мкмоль/л и был на 62,7% ( $p < 0,05$ ) выше, чем в лизатах клеток интактных самцов (12,25 мкмоль/л). Глуфимет приводил к уменьшению уровня нитрит- и нитрат-ионов, который составлял 15,88 мкмоль/л в макрофагах животных, получавших производное глутаминовой кислоты и ЛПС, что было на 20,3% ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с аналогичным параметром клеток мышей контрольной группы. У животных, которым вводили фенибут и ЛПС, концентрация конечных метаболитов оксида азота составила 13,64 мкмоль/л, что меньше на 31,6% ( $p < 0,05$ ), чем в макрофагах мышей, которые получали только ЛПС (Рисунок 20Б).

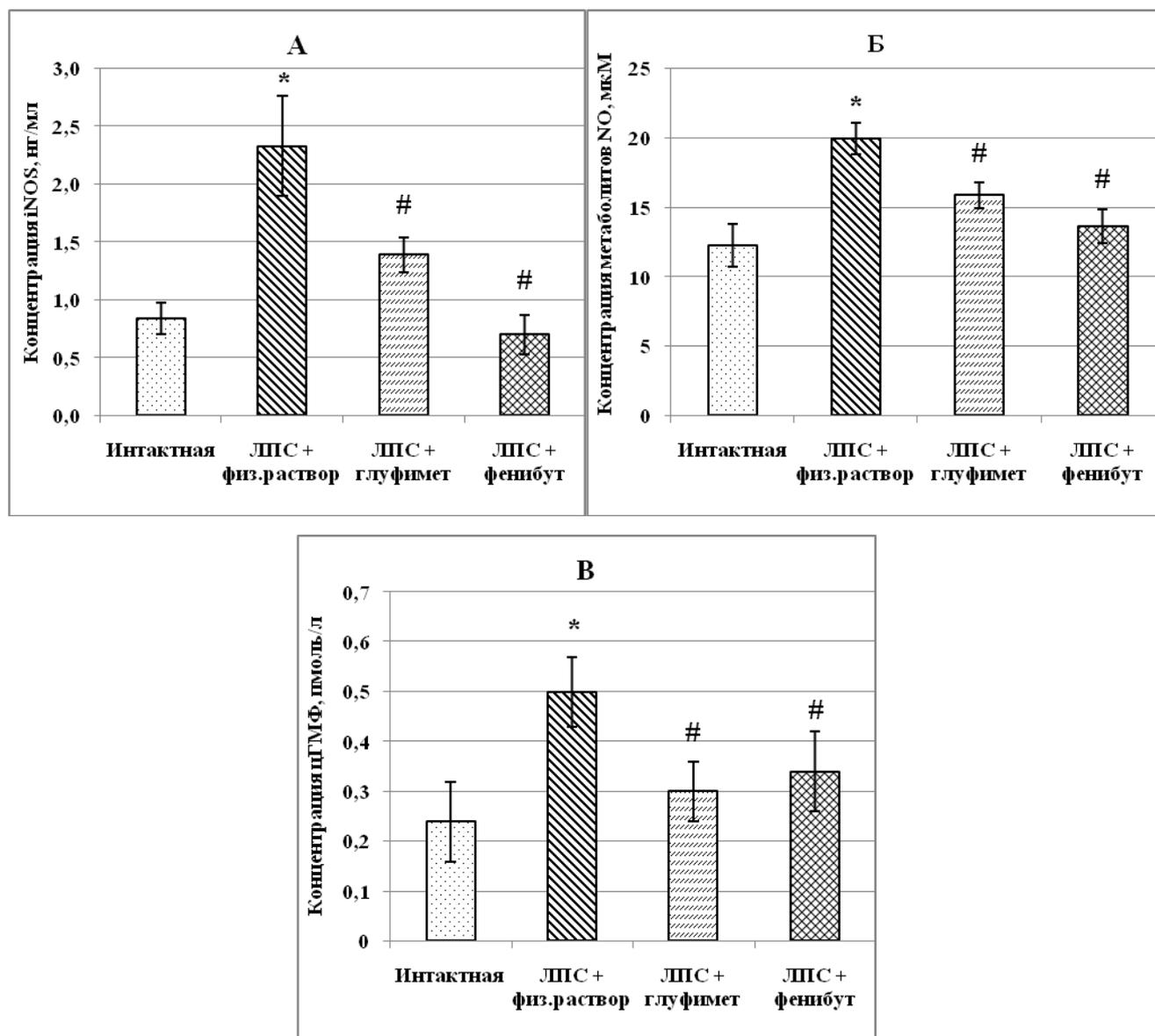


Рисунок 20. Изменение концентрации индуцибельной NOS (А), конечных метаболитов оксида азота (Б) и цГМФ (В) в перитонеальных макрофагах мышей опытных групп ( $M \pm \sigma$ ).

Примечание:

\* - изменения достоверны относительно соответствующих показателей интактной группы (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ );

# - изменения достоверны относительно соответствующих показателей контрольной группы (ЛПС) (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В перитонеальных макрофагах мышей интактной группы концентрация цГМФ равнялась 0,24 пмоль/мл, а аналогичный показатель самцов, получавших ЛПС, на 108,3% ( $p < 0,05$ ) выше и составил 0,50 пмоль/мл. Введение животным глүфимета на фоне ЛПС приводило к снижению уровня цГМФ на 40,0% ( $p < 0,05$ ),

который равнялся 0,30 пмоль/мл. Аналогичная картина наблюдалась и у мышей, получавших фенибут: исследуемый параметр у них составлял 0,34 пмоль/мл и был ниже на 32,0% ( $p < 0,05$ ) относительно животных, которым вводили только ЛПС (Рисунок 20В).

Таким образом, и *in vitro*, и *ex vivo* производные нейроактивных аминокислот – глуфимет и фенибут подавляют экспрессию индуцибельной NO-синтазы, что выражалось в снижении концентрации iNOS и цГМФ в лизатах ЛПС-активированных перитонеальных макрофагов, а также конечных метаболитов оксида азота в среде их культивирования.

В результате проведенного исследования обнаружено, что изучаемые производные нейроактивных аминокислот имеют в механизме своего действия NO-ергический компонент, реализуемый как на центральном, так и на периферическом уровнях. Он заключается в ингибировании экспрессии индуцибельной NO-синтазы, снижении синтеза оксида азота этой изоформой фермента и концентрации цГМФ в ЛПС-активированных макрофагах мышей. Также вероятно влияние исследуемых соединений и на конститутивные изоформы NOS, что выражается в снижении САД при их введении в боковые желудочки мозга крыс, а также отсутствие данного эффекта у глуфимета при неселективном ингибировании NO-синтаз. Фенибут вызывал снижение исследуемого показателя в условиях блокады и NOS и ГАМКа-рецепторов, что, вероятно, связано с вовлечением в механизм его действия других систем или рецепторов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Чрезмерная подверженность стрессовым влияниям окружающей среды относится к группе факторов риска преждевременного развития сердечно-сосудистых заболеваний, которые занимают ведущее место в структуре инвалидизации и смертности населения и представляют большую социально-экономическую проблему не только для России, но и большинства других стран [Телкова И.Л., 2012; Петрухин И.С. и др., 2012; Сайгитов Р.Т. и др., 2015]. В обзоре Kivimaki M. имеются доказательства того, что такие стрессоры, как напряженность работы и длительный рабочий день, с которыми мы сталкиваемся ежедневно, связаны с повышенным риском развития ишемической болезни сердца и инсульта [Kivimaki M. et al., 2015]. Восприимчивость к стрессу индивидуальна, обусловлена длительностью стрессорного воздействия, а также особенностями поведения организма. Предполагают, что в механизмах устойчивости к стрессу ведущую роль играют эпигенетические факторы [Radley J.J. et al., 2011; Stults-Kolehmainen M.A. et al., 2014].

Стресс-система, формирующаяся при чрезмерном по интенсивности и длительности влиянии стрессового фактора, включает центральный и периферический компоненты. Ключевым звеном центрального компонента стресс-реакции является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, повышенная секреция глюкокортикоидов корковым слоем надпочечников, которая с одной стороны направлена на поддержание гомеостаза, с другой – является потенциальной угрозой развития различных патологических состояний [Tatomir A. et al., 2014; Vyas S. et al., 2016]. На периферии в результате симпатoadrenalовой стимуляции происходит выброс гормонов мозговым веществом надпочечников для изменения активности внутренних органов, мышц в рамках реализации быстрого ответа «fight-or-flight», однако, повышение циркулирующих катехоламинов в течение длительного периода времени также может вызвать патологические процессы, такие как гипертрофия миокарда, сердечная недостаточность, артериальная гипертензия [Tank A.W. et al., 2015].

Действие стресс-гормонов на клетки приводит к повышенному образованию активных форм кислорода, интенсификации процессов липопероксидации, повреждению структуры дыхательных комплексов митохондрий, что усиливает образование свободных радикалов [Zorov D.B. et al., 2014]. Нарушение функционирования митохондрий является важным звеном в патогенезе многих заболеваний и патологических состояний, одним из которых считают дисфункцию эндотелия [Murphy M.P., 2013; Tang X. et al., 2014].

Ограничивают развитие стресс-реакции стресс-лимитирующие системы, наиболее мощной из которых является система оксида азота. NO на центральном и периферическом уровне подавляет активность стресс-реакции, ограничивая секрецию гормонов гипоталамуса, гипофиза, коркового и мозгового слоя надпочечников, а также снижая выброс медиатора норадреналина из симпатических нервных окончаний [Малышев И.Ю. и др., 1998; Jang S.J. et al., 2011; Puzserova A. et al., 2016].

Оксид азота также является нейромодулятором, опосредует процессы синаптической передачи, изменение активности NMDA- и ГАМК-рецепторов, регуляцию работы ионных каналов. NO модулирует и влияния вегетативной нервной системы на сердце. Под влиянием оксида азота образуется цГМФ, ингибирующий приток  $Ca^{2+}$  через кальциевые каналы L-типа, что вызывает снижение силы сердечных сокращений. NO является регулятором потребления кислорода в миокарде, модулируя функционирование дыхательной цепи и накопление кальция в митохондриях. [Schultz H.D., 2009; Robertson D. et al., 2011; Абрамочкин Д.В. и др., 2012; Shiva S., 2013]. NO, синтезированный eNOS, регулирует тонус сосудов, оказывает вазопротекторное и антиатеросклеротическое действие, а также модулирует сократительную функцию сердца [Wohlfart P. et al., 2008].

Несмотря на свои протекторные эффекты, NO способен оказывать и повреждающее действие. Известно, что при стрессе активируется индуцибельная изоформа NO-синтазы, производящая оксид азота в больших количествах, из которого образуется пероксинитрит – соединение, обладающее прооксидантными

свойствами. Пероксинитрит повышает интенсивность процессов перекисного окисления липидов и приводит к повреждению ДНК и других макромолекул [Olivenza R. et al., 2000; Chen H.J. et al., 2014].

В связи с этим актуальным является поиск соединений, оказывающих действие на различные патогенетические механизмы стресс-реакции, обуславливающие повреждение сердца, включая влияние на активность стресс-лимитирующих систем, в частности системы оксида азота. В ранее проведенных исследованиях было выявлено кардиопротекторное действие нового производного глутаминовой кислоты – глуфимета и производного ГАМК – фенибута в условиях острого и хронического стрессорного повреждения [Садикова Н.В., 2016]. У стрессированных животных, получавших производные нейроактивных аминокислот, регистрировали более высокий прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, а также левожелудочкового давления и ЧСС при проведении проб с изометрической нагрузкой и пробы на адренореактивность, что свидетельствует об ограничении снижения инотропных резервов сердца крыс после стрессорного воздействия [Перфилова В.Н. и др., 2014; Тюренков И.Н. и др., 2015]. Кроме того было показано, что при блокаде NO-синтаз изменялась выраженность кардиопротекторного действия глуфимета и фенибута, что позволило предположить наличие NO-ергического компонента в механизме их действия [Тюренков И.Н. и др., 2015; Тюренков И.Н. и др., 2015].

В нашем исследовании мы преследовали цель изучить в условиях *in vitro* возможное участие NO-ергической системы в кардиопротекторном действии производных нейроактивных аминокислот на изолированных предсердиях интактных крыс при навязанном ритме. Глуфимет, так же, как и фенибут, снижали прирост амплитуды сокращений при стимуляции  $\beta$ 1-адренорецепторов дофамином, причем этот эффект увеличивался с повышением частоты навязанного ритма. При увеличении числа импульсов в минуту создается повышенная нагрузка на перенос кальция из саркоплазматического ретикулума и с поверхности клетки в цитоплазму кардиомиоцита в систолу и наоборот, степень и полнота расслабления зависит от эффективности переноса  $\text{Ca}^{2+}$  в

саркоплазматический ретикулум и на поверхность кардиомиоцита. Исследуемые соединения, вероятно, могут как прямо влиять на кальциевый гомеостаз, так и опосредовано через систему NO. В поддержку этого свидетельствует тот факт, что исследуемые соединения уменьшают смещение от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий, что говорит об улучшении расслабления миокарда. Оксид азота вызывает увеличение цГМФ и активацию ПК G, которая способствует снижению поступления  $Ca^{2+}$  в клетку и ослаблению инотропного ответа сердца на действие катехоламинов [Paton J.F. et al., 2002]. Блокада синтеза NO приводила к значительному усилению сократимости изолированных предсердий, что согласуется с литературными данными [Насырова А.Г. и др., 2005; Rossi B.R. et al., 2009; Зарипова Р.И. и др., 2016]. При предварительном добавлении неселективного ингибитора NOS в ванночку с раствором Кребса, исследуемые соединения в меньшей степени снижали амплитуду сокращений изолированных предсердий, что свидетельствует о вероятной реализации их действия через NO-систему.

В условиях целого организма, когда и глюфимет, и фенибут вводили животным внутрибрюшинно, также регистрировали снижение прироста сократимости изолированных предсердий, однако при блокаде NO-синтаз не наблюдалось ограничения их инотропного влияния на сердце. Вероятно, производные ГАМК и глутаминовой кислоты при ингибировании NOS реализовывают свои эффекты через другие системы (например, ГАМК-ергическую) и механизмы в условиях целого организма. На величину смещения от изолинии амплитуды сокращений, изучаемые производные нейроактивных аминокислот оказывали действие аналогично *in vitro*, которое нивелировалось блокадой NO-синтаз, что свидетельствует о реализации указанных эффектов через систему NO.

Иммунизационно-болевое воздействие приводило к усилению инотропного ответа изолированных предсердий крыс по сравнению с интактными самками, что, возможно, связано с увеличением экспрессии адренорецепторов в сердце при стрессе. Также имеются данные об увеличении сродства

адренорецепторов к катехоламинам [Baum A. et al., 2010]. Блокада NOS вызывала возрастание амплитуды сокращений предсердий стрессированных животных по сравнению с контрольной группой только при малой частоте навязанного ритма; при увеличении числа импульсов в минуту прирост сократимости на адреностимуляцию был ниже такового самок группы негативного контроля. Как было сказано выше, NO ингибирует высвобождение медиатора из синаптических нервных окончаний. Соответственно, при блокаде его синтеза гиперпродукция катехоламинов приводит к истощению их резервов и снижению активности симпатoadреналовой системы, что и могло послужить причиной к резкому снижению прироста сократимости предсердий при активации симпатической системы [Barnes R.D. et al., 2001]. Кроме того, дефицит NO приводил к значительному ухудшению расслабления миокарда, что, вероятно, является еще одним механизмом уменьшения инотропного ответа при увеличении частоты навязанного ритма. Исследуемые соединения, в отличие от результатов, полученных *in vitro*, снижали усиление инотропного ответа изолированных предсердий на стимуляцию адренорецепторов в условиях острого стрессорного воздействия и на фоне блокады NOS. Возможно, в этих условиях производные нейроактивных аминокислот ограничивают стресс-реакцию на центральном уровне, активируя другие стресс-лимитирующие системы, например ГАМК-ергическую. Однако величина смещения от изолинии амплитуды сокращений изолированных предсердий животных, получавших изучаемые соединения на фоне блокады NOS, не отличалась от таковой самок, получавших только L-NAME, что, вероятно, свидетельствует о реализации этого действия через систему NO.

При активации парасимпатической системы ацетилхолином и добавлении в перфузируемый раствор глуфимета или фенибута достоверного влияния на сократимость изолированных предсердий крыс обнаружено не было. При стрессорном воздействии было отмечено повышение инотропного ответа при добавлении ацетилхолина, что свидетельствует об увеличении рефлекторных холинергических влияний на сердце [Siabro P.I. et al., 1978] Блокада NO-синтаз не

приводила к изменению амплитуды сокращений по сравнению с исходными данными на малой частоте навязанного ритма; при увеличении количества импульсов в секунду было зарегистрировано достоверное повышение данного показателя. Однако известно, что NO усиливает холинергические влияния на инотропную функцию сердца, а также блокирует кальциевые каналы [Насырова А.Г. и др., 2005; Cawley S.M. et al., 2011]. Полученные нами данные по взаимодействию NO- и холинергической систем отличаются от данных литературы, что может быть связано с использованием различных моделей, методов исследования и требуют дальнейшего изучения.

Полученные результаты по оценке роли оксида азота в реализации эффектов на сердце производных нейроактивных аминокислот позволяют предположить наличие NO-ергического компонента в механизме их действия, в связи с чем было изучено их стресспротекторное действие в условиях селективной блокады NO-синтаз.

Выявлено, что стрессорное воздействие приводит к увеличению концентрации конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга, что, вероятно, связано с активацией экспрессии индуцибельной NOS и синтезом большого количества NO [Madrigal J.L et al., 2001; Munhoz C. et al., 2008]. Об этом свидетельствует и отсутствие увеличения данного показателя у животных, которым до стрессирования вводили ингибитор индуцибельной NO-синтазы – аминогуанидин. Блокада nNOS приводила к некоторому снижению уровня нитрит- и нитрат-ионов, однако данный параметр существенно не отличался от контрольной группы стрессированных крыс, что вероятно связано с развитием истощения в результате острого иммобилизационно-болевого воздействия. Изучаемые соединения вызвали снижение концентрации конечных метаболитов NO в исследуемых органах на фоне ингибирования nNOS, вероятно снижая экспрессию iNOS. В поддержку этого свидетельствует отсутствие значимого влияния производных нейроактивных аминокислот на исследуемый показатель при блокаде индуцибельной изоформы NO-синтазы.

NO в большой концентрации вследствие активации iNOS взаимодействует с супероксид-анионом с образованием высокореакционного соединения – пероксинитрита, который реализует свое повреждающее действие на биомолекулы через прямое влияние с развитием перекисного окисления липидов, белков и повреждения ДНК, а также посредством индукции некоторых факторов транскрипции [Korkmaz A. et al., 2009; Kumar A. et al., 2014]. В этой связи целесообразным было изучить влияние глуфимета и фенибута на активность процессов ПОЛ в митохондриях клеток сердца и головного мозга.

У животных после 24-х часового стрессорного воздействия наблюдалось увеличение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ в митохондриях клеток сердца и головного мозга, свидетельствующее об интенсификации процессов липопероксидации, вероятно, в результате увеличения экспрессии индуцибельной NOS. При этом активность антиоксидантных ферментов была достоверно ниже, чем у интактных самок, очевидно являясь причиной повышения уровня АФК. Исследуемые соединения ограничивали интенсивность ПОЛ, снижая концентрацию продуктов и увеличивая активность антиоксидантных ферментов. Это может быть связано с прямым влиянием на свободные радикалы, т.к. глуфимет – производное глутаминовой кислоты, которая обладает антиоксидантным действием и входит в состав трипептида глутатиона, участвующего в окислительно-восстановительных реакциях в клетке [Удинцев Н.А., 1984; Gu M. et al., 2016]. Также можно предположить, что исследуемые производные нейроактивных аминокислот ингибируют iNOS, в результате чего снижается уровень NO, пероксинитрита и интенсивность ПОЛ. Блокада индуцибельной NO-синтазы ограничивала образование АФК и окисление липидов, о чем свидетельствует снижение концентрации продуктов ПОЛ и повышение активности изучаемых ферментов в митохондриях клеток сердца и головного мозга стрессированных крыс относительно контрольных самок. Ингибирование nNOS приводило к достоверному увеличению интенсивности процессов ПОЛ, выражающееся в повышении уровня диеновых конъюгатов, diketонов и МДА. При этом активность антиоксидантных ферментов также была

выше по сравнению с контрольной группой, что можно объяснить потенцирующим влиянием свободных радикалов на исследуемые показатели ферментной системы [Милякова В.Н. и др., 2006]. Производные нейроактивных аминокислот подавляли окислительный стресс на фоне блокады нейрональной NOS и не оказывали влияния у животных, получавших аминугуанидин, что может свидетельствовать об их ингибирующем влиянии на активность или экспрессию iNOS.

Развивающийся при иммобилизационно-болевым воздействием окислительный стресс, вероятно, вследствие гиперпродукции NO и образования пероксинитрита, приводил к нарушению функционирования митохондрий сердца и головного мозга: снижалась скорость АДФ-индуцированного потребления кислорода и увеличивалась после истощения АДФ, что свидетельствует о разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования. Как известно, основным источником АФК и азота в клетке являются митохондрии, которые и сами служат мишенью для их окислительного повреждения [Zorov D.B. et al., 2014; Förstermann U. et al., 2017]. Нарушение функционирования комплексов дыхательной цепи приводит к еще большему производству свободных радикалов и гибели клетки [Chen Y.R. et al., 2014]. У животных, получавших производные нейроактивных аминокислот до стрессирования, отмечалось снижение  $V_4$  и увеличение  $V_3$ , что подтверждается повышением дыхательного контроля. Возможно, это связано со снижением «утечки» электронов из дыхательной цепи и вероятностью образования свободных радикалов, в результате чего увеличивается энергопродукция. Стоит отметить, в головном мозге у крыс, которым вводили фенибут, было обнаружено более выраженное повышение КДК, чем аналогичный показатель у глүфимета, что, вероятно, связано с ограничением производным ГАМК стресс-реакции на центральном уровне. Улучшение дыхательной функции митохондрий сердца и мозга под влиянием изучаемых соединений, вероятно, связано с уменьшением экспрессии iNOS, гиперпродукции NO и ограничением повреждающего действия АФК и азота на митохондрии.

Блокада нейрональной NOS усугубляла дисфункцию митохондрий, наиболее выражено в клетках головного мозга стрессированных животных. nNOS находится в гиппокампе, гипоталамусе, гипофизе и надпочечниках, что предполагает совместную локализацию с гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой осью [Gadek-Michalska A. et al., 2012]. Уменьшение синтеза оксида азота этой изоформой NO-синтазы, по-видимому, является причиной гиперактивации стресс-системы из-за отсутствия регуляторного влияния NO. Также известно, что NO, произведенный nNOS, уменьшает экспрессию рецептора глюкокортикоидов – главной группы стресс-гормонов [Zhu L. et al., 2014]. Глуфимет и фенибут на фоне ингибирования nNOS значительно повышали сопряжение процессов окисления субстратов и синтеза АТФ в митохондриях, наиболее выражено при активации второго дыхательного комплекса сукцинатом. Этот эффект, вероятно, связан со снижением продукции оксида азота iNOS, уменьшением образования АФК и азота и ограничением повреждения молекулярных комплексов дыхательной цепи. В поддержку этого говорит тот факт, что блокада индуцибельной нитрооксидсинтазы приводила к значительному улучшению функционирования митохондрий клеток сердца и головного мозга на фоне стрессорного воздействия. У животных, получавших исследуемые соединения и ингибитор iNOS, отмечена тенденция к повышению дыхательного контроля, однако достоверных изменений зарегистрировано не было. Можно предположить, что изучаемые производные нейроактивных аминокислот реализуют свои протекторные свойства путем снижения синтеза NO индуцибельной NOS, а также посредством активации конститутивных NO-синтаз.

Оксидативный стресс и нарушение функционирования митохондрий играют одну из важнейших ролей в нарушении функции эндотелия [Tang X. et al., 2014]. Эндотелий представляет собой сосудистый слой между кровью и тканями, обеспечивает баланс между тромбообразованием и антикоагуляцией, между вазоконстрикцией и вазодилатацией с целью обеспечения адекватного кровоснабжения органов и тканей [Widmer R.J. et al., 2014]. Все эти его функции тесно связаны с оксидом азота, синтезируемым эндотелиальной NO-синтазой,

снижение биодоступности которого ассоциировано с дисфункцией эндотелия [Yang Z. et al., 2014]. В связи с этим было изучено влияние глуфимета и фенибута на уровень АД и показатели системы гемостаза в условиях стрессорного воздействия и селективной блокады NOS.

У пяти животных из восьми был отмечен прирост уровня артериального давления после стрессирования, который, вероятно, связан с чрезмерным выбросом катехоламинов в кровь и их вазоконстрикторным эффектом. Однако у остальных трех самок АД несколько снижалось к 24-ому часу иммобилизации. Вероятно, это можно объяснить различным уровнем активности стресс-лимитирующих систем, и развитием у этих животных стадии истощения в виду несостоятельности адаптационных возможностей организма. При этом снижается активность симпато-адреналовой системы [Меерсон Ф.З., 1988]. У крыс, получавших глуфимет и фенибут, увеличения уровня АД не наблюдали. Это связано, возможно, с уменьшением повреждения эндотелия сосудов вследствие ограничения стресс-реакции, а также с эндотелиопротекторным действием производных глутаминовой кислоты и ГАМК, обнаруженным в ранее проведенных исследованиях [Воронков А.В., 2011; Мазина Н.В., 2016].

Учитывая дефицит NO, нарушение вазодилатирующей функции эндотелия и отсутствие ограничения стресс-реакции, блокада nNOS должна привести к еще более высокому подъему уровня АД в результате иммобилизационно-болевого воздействия. Однако, у всех самок, которым вводили ингибитор nNOS 7-нитроиндазол, наблюдалось резкое снижение АД после 24-х часового стрессирования. Это, вероятно, свидетельствует об истощении надпочечников в результате отсутствия стресс-лимитирующего действия nNOS. В поддержку этого говорит тот факт, что NO-ергические нейроны находятся в тесном контакте с хромоаффинными клетками мозгового вещества надпочечников, где происходит синтез катехоламинов [Zanchi A. et al., 1995]. В результате бесконтрольного усиленного выброса последних их резервы истощаются. Блокада индуцибельной NOS предотвращала прирост АД, что, вероятно, связано со снижением производства больших количеств NO и пероксинитрита и их негативного

действия на эндотелиоциты. У животных, получавших производные нейроактивных аминокислот как на фоне блокады nNOS, так и iNOS, изменений АД относительно исходного уровня отмечено не было, что свидетельствует об ограничении повреждения эндотелия АФК и азота.

Дисфункцию эндотелия также оценивали и по изменению показателей сосудисто-тромбоцитарного (степень и скорость агрегации тромбоцитов) и плазменно-коагуляционного звеньев системы гемостаза (АЧТВ, ПВ, концентрация фибриногена). У стрессированных животных был отмечен сдвиг антитромботической функции эндотелия в сторону прокоагулянтных свойств, о чем свидетельствует увеличение степени и скорости агрегации тромбоцитов, концентрации фибриногена, а также укорочение АЧТВ и ПВ. Значительный вклад в это вносит окислительный стресс с последующим повреждением эндотелиоцитов, снижением экспрессии eNOS и биодоступности NO, а также повышенная симпатическая активность с нарушением эндотелий-зависимой вазорелаксации и перегрузкой клеток кальцием [Higashi Y. et al., 2009; Tejavathi V. et al., 2013]. У крыс, получавших до стрессирования исследуемые соединения, было отмечено достоверное снижение агрегационной способности тромбоцитов. Протромбиновое время у вышеназванных самок достоверно не изменялось, а АЧТВ и концентрация фибриногена имели тенденцию к улучшению значений. Ранее было выявлено ограничение нарушения гемостаза у животных, получавших производные ГАМК и глутаминовой кислоты на различных экспериментальных моделях повреждения [Тюренков И.Н. и др., 2012; Садикова Н.В. и др., 2014]. Однако имеются данные, показывающие ГАМК- и глутамат-опосредованную индукцию агрегации тромбоцитов в условиях *in vitro* [Morrell C.N. et al., 2008; Kaneez F.S. et al., 2009]. Вероятно, в антиагрегантном действии производных нейроактивных аминокислот ведущая роль принадлежит ограничению повреждения эндотелия.

Блокада nNOS не приводила к изменениям изучаемых показателей системы гемостаза относительно контрольных животных, а препараты, вводимые на ее фоне животным, заметно улучшали антитромботическую функцию эндотелия. У

крыс, получавших ингибитор индуцибельной NO-синтазы, снижались степень и скорость агрегации тромбоцитов, АЧТВ, ПВ и концентрация фибриногена существенно не изменялись. Производные нейроактивных аминокислот значимо не влияли на исследуемые параметры относительно группы животных, которым вводили только амингуанидин. Улучшение показателей гемостаза под действием производных нейроактивных аминокислот при блокаде nNOS и отсутствие такового при ингибировании iNOS свидетельствует о возможном влиянии глуфимета и фенибута на активность или экспрессию индуцибельной NO-синтазы.

В связи с тем, что глуфимет и фенибут реализовывали стресспротекторные эффекты в условиях блокады нейрональной NO-синтазы, логично было предположить, что одним из механизмов действия указанных соединений является прямое ингибирование индуцибельной NOS.

iNOS экспрессируется во многих типах клеток, в частности в тканевых макрофагах, в ответ на действие провоспалительных факторов, одним из которых является бактериальный липополисахарид, и участвует в реакциях иммунной защиты [Förstermann U. et al., 2012]. Вследствие этого нами была выбрана методика изучения экспрессии данной изоформы NOS, основанная на активации перитонеальных макрофагов внутрибрюшинным введением ЛПС, либо *in vitro* добавлением его в питательную среду культуры клеток.

Было подтверждено, что ЛПС, добавленный в культуру макрофагов *in vitro*, усиливал экспрессию iNOS, что выражалось в увеличении ее концентрации. Выше было сказано, что данная изоформа NOS производит большое количество NO, который активирует растворимую форму гуанилатциклазы и синтез цГМФ. В нашей работе мы также наблюдали увеличение концентрации конечных метаболитов оксида азота и цГМФ [Förstermann U. et al., 2012; Chen H.J. et al., 2015]. Аналогичные результаты были получены и на модели *ex vivo*, когда вводили активатор макрофагов – ЛПС мышам внутрибрюшинно.

Усиленная экспрессия iNOS вследствие стимуляции макрофагов ЛПС приводит к увеличенному синтезу свободных радикалов, которые способствуют

индукции митоген-активированных протеинкиназ и фактора транскрипции NF-κB, тем самым еще более повышая экспрессию iNOS [Floden A.M. et al., 2005]. Производные нейроактивных аминокислот ингибировали экспрессию индуцибельной NO-синтазы, снижая уровень iNOS и цГМФ в лизатах макрофагов, а также суммарную концентрацию нитрит- и нитрат-ионов в культуральной среде как в условиях *in vitro*, так и *ex vivo*. При анализе литературных данных известно, что агонист глутаматного рецептора mGluR5 уменьшает активность NF-κB, NADPH-оксидазы и продукцию АФК и азота в макрофагах, что вторично может привести к снижению экспрессии iNOS [Loane D.J. et al., 2013]. Об этом свидетельствуют результаты работы Yao H.H., где показано уменьшение экспрессии iNOS и образования оксида азота в результате активации mGluR группы II или III [Yao H.H. et al., 2005]. На основании этого можно предположить, что механизм действия глүфимета связан с метаботропными рецепторами глүтамата, т.к. стимуляция ионотропного NMDA-рецептора и повышенное поступление кальция в клетку приводит к активации синтеза iNOS [Floden A.M. et al., 2005]. Кроме того, в структуру молекулы глүфимета включен остаток глицина, который также снижает активацию NF-κB и, соответственно, уровень iNOS [Mauriz J.L. et al., 2001].

Производное ГАМК более выражено ингибировало экспрессию iNOS в перитонеальных макрофагах мышей, чем глүфимет. Вероятно, фенибут реализует свое действие и через ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, активация которых снижает ЛПС-индуцированное увеличение синтеза интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли-α [Lee M. et al., 2011]. Также показано угнетающее действие ГАМК на нитроксидергическую передачу [Harvey B.H. et al., 2004]. Кроме того, ГАМК и глүтамат являются центральными нейромедиаторами, в связи с чем было исследовано центральное действие глүфимета и фенибута на систему оксида азота.

Было выявлено, что при введении изучаемого производного глүтамата в боковой желудочек мозга крысы происходит снижение систолического АД, которое предотвращалось неселективной блокадой NO-синтаз, что может

свидетельствовать об участии нитроксидергической системы в механизме действия глуфимета. При блокаде ГАМК<sub>A</sub>-рецептора бикикулином глуфимет оказывал гипотензивное действие, но в значительно меньшей степени. Вероятно, в механизме действия данного производного глутаминовой кислоты определенную роль играет и система ГАМК, т.к. глутамат является ее предшественником.

Фенибут – производное ГАМК, более выражено, чем глуфимет, снижал систолическое АД у анестезированных крыс, как на фоне блокады NOS, так и ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Реализация его центрального действия, вероятно, осуществляется либо через другие ГАМК-рецепторы, либо другие системы.

Таким образом, ограничение глуфиметом и фенибутом повреждающего действия стресса на сердце связано с влиянием на систему оксида азота.

## ВЫВОДЫ

1. Глуфимет и фенибут взаимодействуют с NO-ергической системой на центральном и периферическом уровне при формировании их кардиопротекторного действия у животных, подвергшихся длительному иммобилизационно-болевному стрессу.

2. Глуфимет и фенибут в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  снижают прирост амплитуды сокращений в опытах на изолированных предсердиях интактных крыс в условиях стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов дофамином в разведении  $1 \times 10^{-6}$  максимально на 26,0% и 28,1% соответственно при частоте навязанного ритма 270 имп/мин. Неселективная блокада NO-синтаз предотвращает действие соединений. В таких же условиях эксперимента глуфимет и фенибут не изменяют эффекты, связанные с активацией M-холинорецепторов изолированных предсердий ацетилхолином в разведении  $1 \times 10^{-6}$ .

3. В условиях *ex vivo* глуфимет (28,7 мг/кг) и фенибут (50 мг/кг) снижают прирост сократимости изолированных предсердий интактных животных при активации симпатической системы и неселективной блокаде NOS. У животных, подвергшихся иммобилизационно-болевному воздействию, исследуемые соединения уменьшают усиление инотропного ответа изолированных предсердий максимально на 23,8% и 45,1% соответственно при частоте навязанного ритма 180 имп/мин и стимуляции адренорецепторов как на фоне блокады NOS, так и без нее.

4. Изучаемые производные нейроактивных аминокислот при стрессорном повреждении сердца оказывают выраженное кардиопротекторное действие, связанное с уменьшением образования оксида азота в тканях сердца и головного мозга в среднем на 22,5%, интенсивности процессов ПОЛ в среднем на 24,7%, увеличением активности антиоксидантных ферментов в среднем на 46,0%, а также с увеличением дыхательного контроля в митохондриях сердца и головного мозга в среднем на 21,6%. Реализация указанных эффектов глуфиметом

и фенибутом была отмечена при блокаде nNOS и отсутствовала при ингибировании iNOS.

5. Неселективная блокада NOS, вызванная введением L-NAME, предупреждала снижение систолического артериального давления при введении глуфимета в боковые желудочки мозга, что свидетельствует о наличии у данного соединения центрального NO-ергического действия. Фенибут в аналогичных условиях снижал сАД как при блокаде NOS, так и ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов.

6. Глуфимет и фенибут в условиях *in vitro* снижают концентрацию iNOS в лизатах ЛПС-индуцированных перитонеальных макрофагов на 34,6% и 46,8%, цГМФ на 32,5% и 35,0%, а также уровень конечных метаболитов оксида азота в среде их культивирования на 40,0% и 38,0% соответственно. В условиях *ex vivo* производные нейроактивных аминокислот оказывали аналогичное влияние на исследуемые показатели.

## НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные позволяют считать перспективным поиск среди производных ГАМК и глутаминовой кислоты высокоактивных соединений, ограничивающих повреждающее действие стресса на сердце путем модуляции NO-ергической стресс-лимитирующей системы.

2. Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения фенибута и глуфимета с целью разработки на их основе веществ, ингибирующих iNOS, активность которой повышается при различных патологических состояниях.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АКТГ – адренотропный гормон
- АТФ - аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ГГН-ось – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось
- ГлП – глутатионпероксидаза
- ДК – диеновые конъюгаты
- КДК – коэффициент дыхательного контроля
- ЛПС – липополисахарид
- МДА – малоновый диальдегид
- ПВ – протромбиновое время
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ПК А – протеинкиназа А
- ПК G – протеинкиназа G
- САД – систолическое артериальное давление
- СрАД – среднее артериальное давление
- СОД - супероксиддисмутаза
- ФГ – фибриноген
- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
- цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
- ЦНС – центральная нервная система
- ЦПЭ – цепь переноса электронов
- ЧСС – частота сердечных сокращений
- ЭКГ – электрокардиограмма
- АСТН – адренотропный гормон
- AVP – вазопрессин
- CRH – кортикотропин-рилизинг гормон

GR – рецептор к глюкокортикоидам

iNOS – индуцибельная нитрооксидсинтаза

E – адреналин

eNOS – эндотелиальная нитрооксидсинтаза

L-NAME – N-нитро-L-аргинин метиловый эфир

mGluRs – метаботропные рецепторы глутамата

NMDA – N-метил-D-аспартат

NE – норадреналин

nNOS – нейрональная нитрооксидсинтаза

NO – оксид азота

NOS – синтаза оксида азота

PSD – постсинаптическое уплотнение

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамочкин, Д.В. Модуляция оксидом азота интенсивности некантовой секреции ацетилхолина в миокарде правого предсердия крысы [Текст] / Д.В. Абрамочкин, А.А. Бородинова, Е.Е. Никольский, Л.В. Розенштраух // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, № 5. – С. 317-323.
2. Блаттнер, Р. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц: Пер. с англ. [Текст] / Р. Блаттнер, Х. Классен, Х. Денерт, Х. Деринг. М.: Мир, 1983. – 208 с.
3. Бузуева, И.И. Влияние хронического стресса на структуру надпочечника крыс гипертензивной линии НИСАГ после превентивного лечения теразолином [Текст] / И.И. Бузуева, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг [и др.] // Сибирский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 30, № 4. – С. 56-61.
4. Воронков, А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.06 / Воронков Андрей Владиславович. – Волгоград, 2011. – 296 с.
5. Габбасов, З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов [Текст] / З.А. Габбасов, Е.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов [и др.] // Лабораторное дело. – 1989. - № 10. – С. 15-18.
6. Гвак, Г.В. Стресс-лимитирующие системы в оптимизации и улучшении качества общего обезболивания у детей [Текст] / Г.В. Гвак, В.Г. Еременко // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 113, №6. – С. 90-93.
7. Герасимова, Н.Г. Морфофункциональная характеристика миокарда при экспериментальной патологии и коррекции препаратами метаболического типа действия: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.25 / Герасимова Наталья Геннадьевна. – Саранск, 2008. – 169 с.
8. Гимаева, З.Ф. Риски развития сердечно-сосудистых заболеваний и профессиональный стресс [Текст] / З.Ф. Гимаева, Л.К. Каримова, А.Б. Бакиров [и др.] // Анализ риска здоровью. – 2017. – №1. – С. 106-115.

9. Зарипова, Р.И. Влияние блокады NO-синтаз на сократимость миокарда гипокинезированных крыс при стимуляции бета-адренорецепторов [Текст] / Р.И. Зарипова, Н.И. Зиятдинова, Т.Л. Зефирова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, № 2. – С. 169-172.

10. Каримов, Ф.К. Парасимпатические эффекты при блокаде  $\beta$ -адренорецепторов и содержание оксида азота в сердце крыс при десимпатизации: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Каримов Фаргат Камилевич. – Казань, 2008. – 154 с.

11. Ковалев, Г.В. Влияние транквилизаторов на функциональное состояние миокарда при его стрессорном повреждении [Текст] / Г.В. Ковалев, К.Г. Гурбанов, И.Н. Тюренков, С.Н. Найденов // Фармакология и токсикология. – 1983. – Т. 46, № 3. – С. 41-44.

12. Ковалев, И.В. Роль оксида азота в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц [Текст] / И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, Л.В. Капилевич, М.А. Медведев // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 7-26.

13. Козина, О.В. Метаболизм нитрозотиолов при аллергическом воспалении [Текст] / О.В. Козина // Сибирский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 30, № 1. – С. 109-116.

14. Королюк, М.А. Методы определения активности каталазы [Текст] / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лабораторно дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

15. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина [Текст] / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88-91.

16. Кузнецова, В.Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия [Текст] / В.Л. Кузнецова, А.Г. Соловьева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4.

17. Кузьменко, Е.В. Современные представления о проявлениях механизмов психоэмоционального стресса [Текст] / Е.В. Кузьменко // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2013. – Т. 26, № 2. – С. 95-106.

18. Лазуко, С.С. Модулирующее влияние iNOS на функциональную активность  $K_{ATP}$ -каналов коронарных сосудов у крыс, адаптированных к стрессу [Текст] / С.С. Лазуко, Л.Е. Беляева, Е.Б. Манухина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 7. – С. 864-875.

19. Мазина, Н.В. Церебро- и эндотелиопротекторные свойства ароматических производных ГАМК и глутаминовой кислоты при моделировании ишемии головного мозга: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Мазина Наталья Валерьевна. – Волгоград, 2016. – 167 с.

20. Малышев, И.Ю. Стресс, адаптация и оксид азота [Текст] / И.Ю. Малышев, Е.Б. Манухина // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 992-1006.

21. Манухина, Е.Б. Стресс-лимитирующая система оксида азота [Текст] / Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86, № 10. – С. 1283-1292.

22. Медведев, Д.В. Значение оксида азота в изменении метаболизма митохондрий ткани сердца крыс при повышенном уровне гомоцистеина в сыворотке крови [Текст] / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Вестник Московского государственного областного гуманитарного института. – 2014. – № 2. – С. 95-105.

23. Меерсон, Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца [Текст] / Ф.З. Меерсон. – М.: Медицина, 1984. – 272 с.

24. Меерсон, Ф.З. Стресс-лимитирующие системы организма и их роль в предупреждении заболеваний сердца [Текст] / Ф.З. Меерсон. – М.: Медицина, 1984. – 272 с.

25. Меерсон, Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам [Текст] / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшенникова. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
26. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: концепция долговременной адаптации [Текст] / Ф.З. Меерсон. – М.: Дело, 1993. – 138 с.
27. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови [Текст] / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.
28. Милякова, В.Н. Возможный механизм и патофизиологическая значимость регуляции активности супероксиддисмутазы свободными радикалами кислорода [Текст] / В.Н. Милякова, В.В. Шабанов // Биомедицинская химия. – 2006. – Т. 52, № 2. – С. 130-137.
29. Михайлис, А.А. Концептуальная модель стресс-индуцированной динамики кислотно-гемолитической стойкости эритроцитов [Текст] / А.А. Михайлис // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 10. – С. 19-23.
30. Моин, В.М. Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах [Текст] / В.М. Моин // Лабораторное дело. – 1986. – № 12. – С. 12-16.
31. Насырова, А.Г. Оксид азота в механизмах регуляции насосной функции сердца: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.13 / Насырова Аида Гайдаровна. – Казань, 2004. – 166 с.
32. Насырова, А.Г. Блокада  $\beta$ -адренорецепторов и М-холинорецепторов модулирует влияние оксида азота на частоту сердечных сокращений крыс [Текст] / А.Г. Насырова, Р.Р. Нигматуллина, И.А. Латфуллин, Ф.Ф. Рахматуллина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 7. – С. 9-13.
33. Парахонский, А.П. Кардиотропные эффекты индуцируемой NO-синтазы [Текст] / А.П. Парахонский // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 9. – С. 207-208.

34. Перфилова, В.Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК: дис. ... д-ра биол. наук: 14.00.25 / Перфилова Валентина Николаевна. – Волгоград, 2009. – 348 с.
35. Перфилова, В.Н. Антиоксидантное действие соединений РГПУ-147 и РГПУ-195 в условиях хронической алкогольной интоксикации [Текст] / В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков // Фармакология токсикология. – 2010. – Т. 25, № 1. – С. 20-22.
36. Перфилова, В.Н. Кардиопротекторные свойства нового производного глутаминовой кислоты при стрессорном воздействии [Текст] / В.Н. Перфилова, Н.В. Садикова, В.М. Берестовицкая, О.С. Васильева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 9. – С. 13-17.
37. Перфилова, В.Н. Сравнительная оценка функциональных резервов сердца стрессированных животных в условиях блокады NO-ергической системы и ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [Текст] / В.Н. Перфилова, Н.В. Садикова, И.И. Прокофьев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 5. – С. 10-14.
38. Петров, В.И. Возбуждающие аминокислоты (нейрохимия, фармакология и терапевтический потенциал ВАКергических средств): монография [Текст] / В.И. Петров, Л.Б. Пиотровский, И.А. Григорьев. – Волгоград: Изд-во Волгоградской медицинской академии, 1997. – 166 с.
39. Петрухин, И.С. Актуальные проблемы профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в России [Текст] / И.С. Петрухин, Е.Ю. Лунина // Верхневолжский медицинский журнал. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 3-8.
40. Пожилова, Е.В. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки [Текст] / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 35-41.
41. Пшенникова, М.Г. Роль опиоидных пептидов в реакции организма на стресс [Текст] / М.Г. Пшенникова // Патологическая физиология. – 1987. – № 3. – С. 85-90.

42. Рахматуллина, Ф.Ф. Влияние оксида азота и веществ, участвующих в его метаболизме, на показатели сердечно-сосудистой системы крыс при экспериментальном инфаркте миокарда: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.13 / Рахматуллина Фарида Фаритовна. – Казань, 2005. – 120 с.

43. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под общей редакцией д.м.н. А.Н. Миронова. – М: Гриф и К, 2012. – С. 80-93.

44. Садикова Н.В. Коррекция производными глутаминовой кислоты стрессорных повреждений сердца: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Садикова Наталья Владимировна. – Волгоград, 2016. – 160 с.

45. Сайгитов, Р.Т. Сердечно-сосудистые заболевания в контексте социально-экономических приоритетов долгосрочного развития России [Текст] / Р.Т. Сайгитов, А.А. Чулок // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70, № 3. – С. 286-299.

46. Сергиенко, В.И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств [Текст] / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева, Е.И. Маевский // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронов. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 889-940.

47. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии [Текст]. М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

48. Телкова, И.Л. Профессиональные особенности труда и сердечно-сосудистые заболевания: риск развития и проблемы профилактики. Клинико-эпидемиологический анализ [Текст] / И.Л. Телкова // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 27, № 1. – С. 17-26.

49. Теряева, Н.Б. Стресс: метаболические основы адаптации и патология сердечно-сосудистой системы [Текст] / Н.Б. Теряева // Креативная кардиология. – 2008. – № 1. – С. 24-30.

50. Тюренков, И.Н. Коррекция нарушений гемостаза у самок с экспериментальным гестозом с помощью производных ГАМК [Текст] / И.Н. Тюренков, Л.Б. Иванова, В.И. Карамышева, С.А. Лебедева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – № 4. – С. 119-123.

51. Тюренков, И.Н. Кардиоваскулярные и кардиопротекторные свойства ГАМК и ее аналогов: монография [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова. – Волгоград: Изд-во Волгоградского государственного медицинского университета, 2008. – 203 с.

52. Тюренков, И.Н. Влияние производных ГАМК на антитромботическую функцию эндотелия и состояние микроциркуляции у животных с экспериментальным гестозом [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Л.Б. Иванова, В.И. Карамышева // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 61-65.

53. Тюренков, И.Н. Изменение оксидантного и антиоксидантного статуса у самок с экспериментальным гестозом под влиянием производных ГАМК [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Т.А. Попова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 3. – С. 340-343.

54. Тюренков, И.Н. Влияние глуфимета на ино- и хронотропные резервы стрессированного миокарда [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Н.В. Садикова [и др.] // Фармация. – 2014. – № 7. – С. 40-43.

55. Тюренков, И.Н. Влияние нового производного глутаминовой кислоты на показатели сократимости миокарда стрессированных животных в условиях блокады синтеза оксида азота [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Н.В. Садикова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 3. – С. 366-368.

56. Тюренков И.Н. Модифицирующее влияние агонистов ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов на уровень интерлейкинов при экспериментальной иммунопатологии [Текст] / И.Н. Тюренков, М.А. Самотруева, С.А. Лужнова // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 42-45.

57. Удинцев, Н.А. Антиоксидантное действие глутаминовой кислоты [Текст] / Н.А. Удинцев, В.В. Иванов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1984. – Т. 28, № 4. – С. 60-62.

58. Ушкалова В.Н. Контроль перекисного окисления липидов [Текст] / В.Н. Ушкалова, Н.В. Иоанидис, Г.Д. Кадочникова, З.М. Деева. Новосибирск: Изд-во Новосибирского университета, 1993. – 182 с.

59. Филимонова, М.В. Фармакологические свойства и радиобиологические эффекты линейных и циклических производных изотиомочевины – конкурентных ингибиторов синтаз оксида азота: дис. ... д-ра. биол. наук: 14.03.06 / Филимонова Марина Владимировна. – Обнинск, 2015. – 239 с.

60. Хныченко, Л.К. Стресс и его роль в развитии патологических процессов [Текст] / Л.К. Хныченко, Н.С. Сапронов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 2-15.

61. Aguilera, G. The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress / G. Aguilera, S. Subburaju, S. Young, J. Chen // Progress in Brain Research. – 2008. – Vol. 170. – P. 29-39.

62. Ahmmed, G.U. Nitric oxide modulates cardiac  $\text{Na}^+$  channel via protein kinase A and protein kinase G / G.U. Ahmmed, Y. Xu, P. Hong Dong [et al.] // Circulation Research. – 2001. – Vol. 89. – P. 1005-1013.

63. Anacker, C. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? / C. Anacker, P.A. Zunszain, L.A. Carvalho, C.M. Pariante // Psychoneuroendocrinology. – 2011. Vol. 36, № 3. – P. 415-425.

64. Arsenian, M. Potential cardiovascular applications of glutamate, aspartate, and other amino acids / M. Arsenian // Clin. Cardiol. – 1998. Vol. 21, № 9. – P. 620-624.

65. Ashley, E.A. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes / E.A. Ashley, C.E. Sears, S.M. Bryant [et al.] // Circulation. – 2002. – Vol. 105, № 25. P. 3011-3016.

66. Bak, L.K. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer / L.K. Bak, A. Schousboe, H.S. Waagepetersen // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol. 98, № 3. – P. 641-653.
67. Balligand, J.L. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences / J.L. Balligand, P.J. Cannon // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17, № 10. – P. 1846-1858.
68. Balligand, J.L. 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 USA.* – 1993. – Vol. 90, № 1. – P. 347-351.
69. Bank, A.J. Vascular ATP-dependent potassium channels, nitric oxide, and human forearm reactive hyperemia / A.J. Bank, R. Sih, K. Mullen [et al.] // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 2000. – Vol. 14, № 1. – P. 23-29.
70. Barnes, R.D. Nitric oxide modulates evoked catecholamine release from canine adrenal medulla / R.D. Barnes, L.E. Ward, K.P. Frank [et al.] // *Neuroscience.* – 2001. – Vol. 104, № 4. – P. 1165-1173.
71. Baum, A., Contrada R. *The Handbook of Stress Science: Biology, Psychology, and Health* / A. Baum, R. Contrada. NY: Springer Publishing Company, 2010. – 704 p.
72. Behonick, G.S. Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes) / G.S. Behonick, M.J. Novak, E.W. Nealley, S.I. Baskin // *J. Appl. Toxicol.* – 2001. Vol. 21. – P. 15-22.
73. Benarroch, E.E. GABA<sub>B</sub> receptors: structure, functions, and clinical implications / E.E. Benarroch // *Neurology.* – 2012. Vol. 78, № 8. P. 578-584.
74. Bentzen, B.H. Central and Peripheral GABA<sub>A</sub> Receptor Regulation of the Heart Rate Depends on the Conscious State of the Animal / B.H. Bentzen, M. Grunnet // *Adv. Pharmacol. Sci.* – 2011. Vol. 2011. – 578273.
75. Bian, K. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases / K. Bian, M.F. Doursout, F. Murad // *J. Clin. Hypertens. (Greenwich).* – 2008. – Vol. 10, № 4. – P. 304-310.

76. Bohlen, H.G. Nitric oxide and the cardiovascular system / H.G. Bohlen // *Compr. Physiol.* – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 808-823. .
77. Brand, M.D. Assessing mitochondrial dysfunction in cells / M.D. Brand, D.G. Nicholls // *Biochem. J.* – 2011. – Vol. 435. – P. 297-312.
78. Brandes, R.P. Endothelial Dysfunction and Hypertension Brandes / R.P. Brandes // *Hypertension.* – 2014. – Vol. 64. – P. 924-928.
79. Bugajski, J. Social stress inhibits the nitric oxide effect on the corticotropin-releasing hormone – but not vasopressin-induced pituitary-adrenocortical responsiveness / J. Bugajski, A. Gadek-Michalska, J. Borysz, R. Glod // *Brain Res.* – 1999. – Vol. 817. – P. 220-225.
80. Burkard, N. Conditional overexpression of neuronal nitric oxide synthase is cardioprotective in ischemia/reperfusion / N. Burkard, T. Williams, M. Czolbe [et al.] // *Circulation.* – 2010. – Vol. 122. – P. 1588-1603.
81. Busnardo, C. Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism / C. Busnardo, C.C. Crestani, R.F. Tavares [et al.] // *Brain Res.* – 2010. Vol. 1344. – P. 87-95.
82. Busnardo, C. Role of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the cardiovascular effects of L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus of unanesthetized rats / C. Busnardo, R.F. Tavares, F.M. Corrêa // *J. Neurosci Res.* – 2009. – Vol. 87, № 9. – P. 2066-2077.
83. Carda, A.P.P. Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress / A.P.P. Carda, K.C. Marchi, E. Rizzi // *Stress.* – 2015. – V. 18. – P. 233-243.
84. Carnicer, R. Nitric Oxide Synthases in Heart Failure // R. Carnicer, M.J. Crabtree, V. Sivakumaran [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, № 9. – P. 1078–1099.
85. Caroli, C. Vasospastic Acute Coronary Syndromes as a Manifestation of Endothelial Dysfunction and the Role of Flow Mediated Dilatation Test / C. Caroli, L.S. Miguel, J. Vilariño, H. Cohen // *Cardiol. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 4. – P. 134.

86. Casadei, B. Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses / B. Casadei, C.E. Sears // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 82, № 1-3. – P. 67-80.
87. Cawley, S.M. sGC $\alpha_1$  mediates the negative inotropic effects of NO in cardiac myocytes independent of changes in calcium handling / S.M. Cawley, S. Kolodziej, F. Ichinose [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 301, № 1. – P. 157-163.
88. Chapp, A.D. Sympathoexcitation and pressor responses induced by ethanol in the central nucleus of amygdala involves activation of NMDA receptors in rats / A.D. Chapp, L. Gui, M.J. Huber [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2014. – Vol. 307, № 5. – P. 701-709.
89. Chen, H.J. Reactive nitrogen species contribute to the rapid onset of redox changes induced by acute immobilization stress in rats / H.J. Chen, J.G. Spiers, C. Sernia [et al.] // *Stress.* – 2014. – Vol. 17, № 6. – P. 520-527.
90. Chen, H.J. Response of the nitrergic system to activation of the neuroendocrine stress axis / H.J. Chen, J.G. Spiers, C. Sernia, N.A. Lavidis // *Front. Neurosci.* – 2015. – Vol. 9, Article 3. – 7 p.
91. Chen, Y. Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks / Y. Chen, T.Z. Baram // *Neuropsychopharmacology.* – 2016. – Vol. 41, № 1. – P. 197-206.
92. Chen, Y.R. Cardiac mitochondria and ROS generation / Y.R. Chen, J.L. Zweier // *Circ. Res.* – 2014. Vol. 114, № 3. – P. 524–537.
93. Chen, Z. Protective effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid on antioxidation function in intestinal mucosa of Wenchang chicken induced by heat stress / Z. Chen, J. Tang, Y.Q. Sun, J. Xie // *Journal of Animal and Plant Sciences.* – 2013. – Vol. 23, № 6. – P. 1634-1641.
94. Choate, J.K. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice / J.K. Choate, E.J. Danson, J.F. Morris, D.J. Paterson // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 281, № 6. – P. 2310-2317.

95. Chouchani, E.T. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I / E.T. Chouchani, C. Methner, S.M. Nadtochiy [et al.] // *Nat. Med.* – 2013. – Vol. 19. – P. 753-759.
96. Chowdhary, S. Nitric oxide and cardiac muscarinic control in humans / S. Chowdhary, A.M. Marsh, J.H. Coote, J.N. Townend // *Hypertension.* – 2004. – Vol. 43, № 5. – P. 1023-1028.
97. Chowdhury, P. Effects of Aminoguanidine on Tissue Oxidative Stress Induced by Hindlimb Unloading in Rats / P. Chowdhury, M.E. Soulsby, J.L. Scott // *Ann. Clin. Lab. Sci Winter.* – 2009. – Vol. 39, № 1. – P. 64-70.
98. Christopherson, K.S. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain / K.S. Christopherson, B.J. Hillier, W.A. Lim, D.S. Bredt // *Journal of Biological Chemistry.* – 1999. – Vol. 274, № 39. – P. 27467-27473.
99. Chrousos, G.P. Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders / G.P. Chrousos, T. Kino // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1179. – P. 153-166.
100. Chrousos, G.P. Stress and disorders of the stress system / G.P. Chrousos // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 5, № 7. – P. 374-381.
101. Chu, M. Contractile Activity Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and NO(i) Production in Cardiomyocytes via a FAK-Dependent Signaling Pathway / M. Chu, Y. Koshman, R.J. Iyengar [et al.] // *J. Signal Transduct.* – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 473410.
102. Chung, I.M. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway / I.M. Chung, Y.M. Kim, M.H. Yoo [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2010. – Vol. 213, № 1. – P. 109-114.
103. Clark, A.J. Expression, desensitization and internalization of the ACTH receptor (MC2R) / A.J. Clark, A.H. Baig, L. Noon [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2003. – Vol. 994. – P. 111-117.

104. Coco, H. Endothelial Dysfunction Induced by Chronic Psychological Stress: A Risk Factor for Atherosclerosis / H. Coco, A.M. Oliveira // *Cardiovasc. Pharm. Open Access*. 2015. – Vol. 4. – P. 168.
105. Cui, H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging / H. Cui, Y. Kong, Z. Hong // *J. Signal Transduc.* – 2012. – Vol. 2012. Article ID 646354.
106. Damy, T. Glutathione Deficiency in Cardiac Patients Is Related to the Functional Status and Structural Cardiac Abnormalities / T. Damy, M. Kirsch, L. Khouzami [et al.] // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4, № 3. – P. e4871.
107. Davidson, S.M. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance / S.M. Davidson, M.R. Duchon // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 71, № 1. – P. 10-21.
108. De Boo, S. iNOS activity is necessary for the cytotoxic and immunogenic effects of doxorubicin in human colon cancer cells / S. De Boo, J. Kopecka, D. Brusa [et al.] // *Mol. Cancer*. – 2009. – Vol. 8. – P. 108.
109. Deak, T. Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for pharmacotherapy of stress-related disease / T. Deak, M. Quinn, J.A. Cidlowski [et al.] // *Stress*. – 2015. – Vol. 18, № 4. – P. 367-380.
110. Dedkova, E.N. Modulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells / E.N. Dedkova, L.A. Blatter // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 4. – P. 836-845.
111. Dedkova, E.N. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells / E.N. Dedkova, X. Ji, S.L. Lipsius, L.A. Blatter // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 286, № 2. – P. 406-415.
112. Dharmashankar, K. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions / K. Dharmashankar, M.E. Widlansky // *Curr. Hypertens. Rep.* – 2010. – Vol. 12, № 6. – P. 448-455.
113. Di Lorenzo, A. Antidepressive-like effects and antioxidant activity of green tea and GABA green tea in a mouse model of post-stroke depression / A. Di

Lorenzo, S.F. Nabavi, A. Sureda [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2016. – Vol. 60, № 3. – P. 566-579.

114. Dias, A.C. Nitric oxide modulation of glutamatergic, baroreflex, and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract / A.C. Dias, M. Vitela, E. Colombari, S.W. Mifflin // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 288, № 1. – P. 256-262.

115. Dias, R.G. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant / R.G. Dias, C.E. Negrao, M.H. Krieger // *Arq. Bras. Cardiol.* – 2011. – Vol. 96, № 1. – P. 68-75.

116. Drexler, H. Sympathetic nervous system in heart failure: effect of catecholamines and nitric oxide / H. Drexler // *Z. Kardiol.* – 1996. – Vol. 85, № 6. – P. 247-252.

117. Du, J. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids / J. Du, Y. Wang, R. Hunter [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 3543-3548.

118. Dungal, P.A. Impact of mitochondria on nitrite metabolism in HL-1 cardiomyocytes / P. Dungal, A.H. Teuschl, A. Banerjee [et al.] // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 101.

119. Everly, G.S. *A Clinical Guide to the Treatment of the Human Stress Response* / G.S. Everly, J.M. Lating. NY: Springer Science & Business Media, 2012. – 451 p.

120. Farrant, M. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA<sub>A</sub> receptors / M. Farrant M, Z. Nusser // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2005. – Vol. 6. – P. 215-229.

121. Fellet, A.L. Cardiac mitochondrial nitric oxide: a regulator of heart rate? / A.L. Fellet, A.E. Boveris, C. Arranz, A.M. Balaszczuk // *Am. J. Hypertens.* – 2008. – Vol. 21, № 4. – P. 377-381.

122. Fellet, A.L. Effect of acute nitric oxide synthase inhibition in the modulation of heart rate in rats / A.L. Fellet, C. Di Verniero, P. Arza [et al.] // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2003. – Vol. 36, № 5. – P. 669-676.

123. Fink, M.P. Role of Nitric Oxide in Sepsis and ARDS / M.P. Fink, D. Payen. NY: Springer Science & Business Media, 2012. – 430 p.
124. Fischer, H. Developmental changes in expression of GABA<sub>A</sub> receptor-channels in rat intrinsic cardiac ganglion neurones / H. Fischer, A.A. Harper, C.R. Anderson, D.J. Adams // *Journal of Physiology*. – 2005. – Vol. 564, № 2. – P. 465-474.
125. Floden, A.M. Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors / A.M. Floden, S. Li, C.K. Combs // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 2566-2575.
126. Förstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Förstermann, W.C. Sessa // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33, № 7. – P. 829-837.
127. Förstermann, U. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace / U. Förstermann, T.C. Münzel // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113, № 13. – P. 1708-1714.
128. Förstermann, U. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis / U. Förstermann, N. Xia, H. Li // *Circ. Res.* – 2017. – Vol. 120, № 4. – P. 713-735.
129. Fortier, A.H. Intracellular replication of *Leishmania tropica* in mouse peritoneal macrophages: amastigote infection of resident cells and inflammatory exudate macrophages / A.H. Fortier, D.L. Hoover, C.A. Nacy // *Infect. Immun.* – 1982. – Vol. 38. – P. 1304-1307.
130. Francis, S.H. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action / S.H. Francis, J.L. Busch, J.D. Corbin // *Pharmacol. Rev.* – 2010. – Vol. 62, № 3. – P. 525-563.
131. Fulda, S. Cellular stress responses: cell survival and cell death / S. Fulda, A.M. Gorman, O. Hori, A. Samali // *Int. J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 2010. Article ID 214074. – 23 p.
132. Furchgott, R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki // *Nature*. – 1980. – Vol. 288. P. 373-376.

133. Gadek-Michalska, A. Effect of repeated restraint on homotypic stress-induced nitric oxide synthases expression in brain structures regulating HPA axis / A. Gadek-Michalska, J. Tadeusz, P. Rachwalska [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2012. – Vol. 64, № 6. – P. 1381-1390.
134. Gao, H.B. Effects of exogenous gamma-aminobutyric acid on antioxidant enzyme activity and reactive oxygen content in muskmelon seedlings under nutrient solution hypoxia stress / H.B. Gao, S.R. Guo // *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao.* – 2004. – Vol. 30, № 6. – P. 651-659.
135. Gao, S. Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria / S. Gao, J. Chen, S.V. Brodsky // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 15968–15974.
136. Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission / J. Garthwaite // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 27, № 11. – P. 2783-2802.
137. Gebicka, L. Oxidative stress induced by peroxynitrite / L. Gebicka, J. Didik // *Postepy Biochem.* – 2010. – Vol. 56, № 2. – P. 103-106.
138. Gill, S.S. Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology / S.S. Gill, O.M. Pulido // *Toxicol. Pathol.* – 2001. – Vol. 29, № 2. – P. 208-223.
139. Goddard, A.W. Cortical and subcortical gamma amino acid butyric acid deficits in anxiety and stress disorders: Clinical implications / A.W. Goddard // *World J. Psychiatry.* – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 43-53.
140. Goff, D.C. ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines / D.C. Goff, D.M. Lloyd-Jones, G.J. Bennett [et al.] // *Am. Coll. Cardiol.* – 2014. – Vol. 63. – P. 2935-2959.
141. Goldstein, D.S. Adrenal Responses to Stress / D.S. Goldstein // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2010. – Vol. 30, № 8. – P. 1433-1440.

142. Goldstein, D.S. Evolution of concepts of stress / D.S. Goldstein, I.J. Kopin // *Stress*. – 2007. – Vol. 10, № 2. – P. 109-120.
143. Gómez, R. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current ( $I_{to1}$ ) / R. Gómez, L. Núñez, M. Vaquero [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 80. – P. 375-384.
144. Gonzalez, D.R. Neuronal nitric oxide synthase in heart mitochondria: a matter of life or death / D.R. Gonzalez, A.V. Treuer, R.A. Dulce // *J. Physiol.* – 2009. – Vol. 587, Pt 12. – P. 2719-2720.
145. Grammatopoulos, D.K. Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction / D.K. Grammatopoulos // *Br. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 166, № 1. P. 85-97.
146. Grishko, V. Apoptotic cascade initiated by angiotensin II in neonatal cardiomyocytes: role of DNA damage / V. Grishko, V. Pastukh, V. Solodushko // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. 2364-2372.
147. Gu, M. Cardioprotective Effects of Genistin in Rat Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Studies by Regulation of P2X7/NF- $\kappa$ B Pathway / M. Gu, A. Zheng, J. Jing [et al.] // *Evid. Based Complement Alternat. Med.* – 2016. – Vol. 2016. – Article ID 5381290.
148. Gulati, K. Recent advances in stress research: Focus on nitric oxide / K. Gulati, J.C. Joshi, A. Ray // *Eur. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 765. – P. 406-414.
149. Gulati, K. Involvement of nitric oxide (NO) in the regulation of stress susceptibility and adaptation in rats / K. Gulati, A. Ray, A. Masood, V.K. Vijayan // *Indian J. Exp. Biol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 809-815.
150. Han, X. Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte I $Ca$ -L is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase / X. Han, I. Kubota, O. Feron [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1998. – Vol. 95, № 11. – P. 6510-6515.
151. Hardy, K. The organisation of the stress response, and its relevance to chiropractors: a commentary / K. Hardy, H. Pollard // *Chiropr. Osteopat.* – 2006. – Vol. 14. – P. 25.

152. Harris, A. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease / A. Harris, J. Seckl // *Hormones and Behavior*. – 2011. – Vol. 59, № 3. – P. 279-289.
153. Harvey, B.H. Stress-restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus / B.H. Harvey, F. Oosthuizen, L. Brand [et al.] // *Psychopharmacol. (Berl)*. – 2004. – V. 175, № 4. – P. 494-502.
154. Hatam, M. Glutamatergic systems in the bed nucleus of the stria terminalis, effects on cardiovascular system / M. Hatam, A. Nasimi // *Exp. Brain Res.* – 2007. – Vol. 178, № 3. – P. 394-401.
155. Henrich, M. Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria / M. Henrich, K. Hoffmann, P. König [et al.] // *Mol. Cell Neurosci.* – 2002. – Vol. 20. – P. 307-322.
156. Herbert, J. Do corticosteroids damage the brain? / J. Herbert, I.M. Goodyer, A.B. Grossman [et al.] // *J. Neuroendocrinol.* – 2006. – Vol. 18, № 6. – P. 393-411.
157. Herring, N. Nitric oxide-cGMP pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig *in vitro* / N. Herring, D. Paterson // *J. Physiol.* – 2001. – Vol. 535, Pt 2. – P. 507-518.
158. Hess, D.T. Protein S-nitrosylation: purview and parameters / D.T. Hess, A. Matsumoto, S.O. Kim [et al.] // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 150-166.
159. Higashi, Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases / Y. Higashi, K. Noma, M. Yoshizumi, Y. Kihara // *Circ. J.* – 2009. – Vol. 73, № 3. P. 411-418.
160. Hong, I.S. Anti-oxidative effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on immobilization-induced oxidative stress in rat brain / I.S. Hong, H.Y. Lee, H.P. Kim // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 1. – e87061.
161. Ishida, H. Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury / H. Ishida, K. Ichimori, Y. Hirota [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996. – Vol. 20. – P. 343-350.

162. Izem-Meziane, M. Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin / M. Izem-Meziane, B. Djerdjouri, S. Rimbaud [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2012. – Vol. 302, № 3. – P. 665-674.
163. Jaffrey, S.R. Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON / S.R. Jaffrey, F. Benfenati, A.M. Snowman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 3199-3204.
164. Jang, S.J. Inhibitory effects of total ginseng saponin on catecholamine secretion from the perfused adrenal medulla of SHR / S.J. Jang, H.J. Lim, D.Y. Lim // *J. Ginseng. Res.* – 2011. – V. 35, № 2. – P. 176-190.
165. Jasnic, N. Specific regulation of ACTH secretion under the influence of low and high ambient temperature - The role of catecholamines and vasopressin // N. Jasnic, J. Djordjevic, S. Djurasevic [et al.] // *Journal of Thermal Biology.* – 2012. – Vol. 37, № 7. – P. 469-474.
166. Javadov, S. Mitochondria: the cell powerhouse and nexus of stress / S. Javadov, A.V. Kuznetsov // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 4. P. 207.
167. Jayakumar, A.R. Role of nitric oxide on GABA, glutamic acid, activities of GABA-T and GAD in rat brain cerebral cortex / A.R. Jayakumar, R. Sujatha, V. Paul [et al.] // *Brain Res.* – 1999. – Vol. 837, № 1-2. – P. 229-235.
168. Jembrek, M.J. GABA Receptors: Pharmacological Potential and Pitfalls / M.J. Jembrek, J. Vlainic // *Curr. Pharm. Des.* – 2015. – Vol. 21, № 34. – P. 4943-4959.
169. Jennings, A. Amino Acid Intakes Are Inversely Associated with Arterial Stiffness and Central Blood Pressure in Women / A. Jennings, A. MacGregor, A. Welch // *J. Nutr.* – 2015. – Vol. 145, № 9. – P. 2130-2138.
170. Johansson, P.I. Sympathoadrenal Activation and Endothelial Damage Are Inter Correlated and Predict Increased Mortality in Patients Resuscitated after Out-Of-Hospital Cardiac Arrest. A Post Hoc Sub-Study of Patients from the TTM-Trial / P.I. Johansson, J. Bro-Jeppesen, J. Kjaergaard [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. e0120914.

171. Kamran, M. GABA-induced vasorelaxation mediated by nitric oxide and GABA<sub>A</sub> receptor in non diabetic and streptozotocin-induced diabetic rat vessels / M. Kamran, A. Bahrami, N. Soltani [et al.] // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2013. – Vol. 32, № 1. – P. 101-106.
172. Kanai, A.J. Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells / A. Kanai, M. Epperly, L. Pearce // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 286, № 1. – P. 13-21.
173. Kanai, A.J. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection / A.J. Kanai, L.L. Pearce, P.R. Clemens [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98, № 24. P. 14126-14131.
174. Kaneez, F.S. Investigating GABA and its function in platelets as compared to neurons / F.S. Kaneez, S.A. Saeed // *Platelets.* – 2009. – Vol. 20, № 5. – P. 328-333.
175. Karanth, S. Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami / S. Karanth, K. Lyson, S.M. McCann // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 3383-3387.
176. Khazan, M. The Role of Nitric Oxide in Health and Diseases / M. Khazan, M. Hdayati // *Scimetr.* – 2014. – Vol. 3, № 1. – e20987.
177. Kim, K.C. Influence of nitric oxide synthase inhibitors on the ACTH and cytokine responses to peripheral immune signals / K.C. Kim, C. Rivier // *Journal of Neuroendocrinology.* – 1998. – Vol. 10. – P. 353-362.
178. Kishi, T. Regulation of the sympathetic nervous system by nitric oxide and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla: 2012 Academic Conference Award from the Japanese Society of Hypertension / T. Kishi // *Hypertens. Res.* – 2013. – Vol. 36, № 10. – P. 845-851.
179. Kishimoto, J. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats / J. Kishimoto, T. Tsuchiya, P.C. Emson, Y. Nakayama // *Brain Res.* – 1996. – Vol. 720. – P. 159-171.

180. Kivimäki, M. Work Stress as a Risk Factor for Cardiovascular Disease / M. Kivimäki, I. Kawachi // *Curr. Cardiol. Rep.* – 2015. – Vol. 17, № 9. – P. 74.
181. Klein, H.U. Vagus nerve stimulation: A new approach to reduce heart failure / H.U. Klein, G.M. Ferrari // *Cardiol. J.* – 2010. – Vol. 17, № 6. – P. 638-644.
182. Kochar, N.I. Nitric Oxide and the Gastrointestinal Tract / N.I. Kochar, A.V. Chandewal, R.L. Bakal, P.N. Kochar // *International Journal of Pharmacology.* – 2011. – Vol. 7. – P. 31-39.
183. Korkmaz, A. Molecular, genetic and epigenetic pathways of peroxynitrite-induced cellular toxicity / A. Korkmaz, S. Oter, M. Seyrek, T. Topal // *Interdiscip Toxicol.* – 2009. – Vol. 2, № 4. – P. 219-228.
184. Kristiansen, S.B. Cardioprotection against ischemia-reperfusion injury by L-glutamate and KATP channel openers / S.B. Kristiansen // *Danish Medical Bulletin.* – 2005. – V. 52, № 4. – P. 261.
185. Kumar, A. Inducible nitric oxide synthase is key to peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV2 cells / A. Kumar A, S.H. Chen, M.B. Kadiiska [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. Vol. 73. – P. 51-59.
186. Kumar, M.S. A review on Gamma-Aminobutyric acid (GABA) and its receptors / M.S. Kumar, I.J. Kuppast // *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* – 2012. – Vol. 3, № 3. – P. 60-69.
187. Kumar, S. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule / S. Kumar, R.K. Singh, T.R. Bhardwaj // *Biomed. Pharmacother.* – 2017. – Vol. 85. – P. 182-201.
188. Kwon, Y.B. Effect of 7-nitroindazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor, on parvalbumin immunoreactivity after cerebral ischaemia in the hippocampus of the Mongolian gerbil / Y.B. Kwon, Y.S. Yoon, H.J. Han, J.H. Lee // *Anat. Histol. Embryol.* – 1999. – Vol. 28, № 5-6. – P. 325-329.
189. Kyrou, I. Stress mechanisms and metabolic complications / I. Kyrou, C. Tsigos // *Horm. Metab. Res.* – 2007. – Vol. 39, № 6. P. 430-438.

190. Kyrou, I. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism / I. Kyrou, C. Tsigos // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 787-793.
191. Lacza, Z. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies / Z. Lacza, E. Pankotai, D.W. Busija // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2009. – Vol. 14. – P. 4436-4443.
192. Lanza, I.R. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro / I.R. Lanza, K.N. Sreekumaran // *Methods Enzymol.* – 2009. – Vol. 457. – P. 349-372.
193. Laszlo, F. Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature *in vivo* / F. Laszlo, S.M. Evans, B.J. Whittle // *Eur. J. Pharm.* – 1995. – Vol. 272, № 2-3. – P. 169-175.
194. Ledo, A. Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions / A. Ledo, J. Frade, R.M. Barbosa, J. Laranjinha // *Mol. Aspects Med.* – 2004. – Vol. 25, № 1-2. – P. 75-89.
195. Lee, H.J. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification / H.J. Lee, J.J. Zheng // *Cell Commun. Signal.* – 2010. – Vol. 8. – P. 8.
196. Lee, M. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity / M. Lee, C. Schwab, P.L. McGeer // *Glia.* – 2011. – Vol. 59. – P. 152-165.
197. Lenna, S. ER stress and endothelial dysfunction / S. Lenna, R. Han, M. Trojanowska // *IUBMB Life.* – 2014. – Vol. 66, № 8. P. 530-537.
198. Li, D.P. Increased group I metabotropic glutamate receptor activity in paraventricular nucleus supports elevated sympathetic vasomotor tone in hypertension / D.P. Li, H.L. Pan // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* – 2010. – Vol. 299, № 2. – P. 552-561.
199. Loane, D.J. Activation of mGluR5 and inhibition of NADPH oxidase improves functional recovery after traumatic brain injury / D.J. Loane, B.A. Stoica, K.R. Byrnes [et al.] // *J. Neurotrauma.* – 2013. – V. 30. – P. 403-412.

200. Lovallo, W.R. Stress and Health: Biological and Psychological Interactions: 3rd edition / W.R. Lovallo. Thousand Oaks: SAGE Publications, Inc, 2015. – 352 p.
201. Lowry, O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, №1. – P. 265-275.
202. Lukyanova, L.D. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia / L.D. Lukyanova, Y.I. Kirova // Front. Neurosci. – 2015. – Vol. 9. – P. 320.
203. Lundberg, J.O. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease / J.O. Lundberg, M.T. Gladwin, E. Weitzberg // Nature Reviews Drug Discovery. – 2015. – Vol. 14, № 9. – P. 623-641.
204. Ma, P. Effect of GABA on blood pressure and blood dynamics of anesthetic rats / P. Ma, T. Li, F. Ji [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Med. – 2015. – Vol. 8, № 8. – P. 14296-14302.
205. Macedo, F.N. Increased Nitric Oxide Bioavailability and Decreased Sympathetic Modulation Are Involved in Vascular Adjustments Induced by Low-Intensity Resistance Training / F.N. Macedo, T.R. Mesquita, V.U. Melo [et al.] // Front. Physiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 265.
206. Madrigal, J.L. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms / J.L. Madrigal, M.A. Moro, I. Lizasoain [et al.] // J. Neurochem. – 2001. – Vol. 76. – P. 532-538.
207. Maggesissi, R.S. Modulation of GABA release by nitric oxide in the chick retina: Different effects of nitric oxide depending on the cell population / R.S. Maggesissi, P.F. Gardino, E.M. Guimarães-Souza [et al.] // Vision Research. – 2009. – Vol. 49, № 20. – P. 2494-2502.
208. Massion, P.B. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice / P.B. Massion, J.L. Balligand // J. Physiol. – 2003. – Vol. 546, № 1. – P. 63-75.

209. Massion, P.B. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing / P.B. Massion, O. Feron, C. Dessy, J.L. Balligand // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 93, № 5. – P. 388-398.
210. Mauriz, J.L. Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat / J.L. Mauriz, B. Matilla, J.M. Culebras [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 31, № 10. – P. 1236-1244.
211. McCorry, L.K. Physiology of the autonomic nervous system / L.K. McCorry // *American Journal of Pharmaceutical Education.* – 2007. – Vol. 71, № 4. – P. 1-78.
212. McEwen, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain / B.S. McEwen // *Physiological Reviews.* – 2007. – Vol. 87, № 3. – P. 873-904.
213. McEwen, B.S. Mechanisms of stress in the brain / B.S. McEwen, N.P. Bowles, J.D. Gray [et al.] // *Nature Neuroscience.* – 2015. – Vol. 18, № 10. – P. 1353-1363.
214. Menezes, R.C. Cardiovascular effects produced by activation of GABA receptors in the rostral ventrolateral medulla of conscious rats / R.C. Menezes, M.A. Fontes // *Neuroscience.* – 2007. – Vol. 144, № 1. – P. 336-343.
215. Merino, J.J. The Nitric Oxide Donor SNAP-Induced Amino Acid Neurotransmitter Release in Cortical Neurons. Effects of Blockers of Voltage-Dependent Sodium and Calcium Channels Merino // J.J. Merino, C. Arce, A. Naddaf [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 3. – e90703.
216. Moisiadis, V.G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes / V.G. Moisiadis, S.G. Matthews // *Nature Reviews Endocrinology.* – 2014. – Vol. 10, № 7. – P. 391-402.
217. Morrell, C.N. Glutamate mediates platelet activation through the AMPA receptor / C.N. Morrell, H. Sun, M. Ikeda [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 205, № 3. – P. 575-584.

218. Mu, L. The first identified cathelicidin from tree frogs possesses anti-inflammatory and partial LPS neutralization activities / L. Mu, L. Zhou, J. Yang [et al.] // *Amino Acids*. – 2017. – Vol. 49. – P. 1571-1585.
219. Muller-Strahl, G. Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart / G. Muller-Strahl, K. Kottenberg, H.G. Zimmer [et al.] // *J. Physiol. (London)*. – 2000. – Vol. 522, № 2. – P. 311-320.
220. Mungrue, I.N. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death / I.N. Mungrue, R. Gros, X. You [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109, № 6. – P. 735-743.
221. Munhoz, C. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets / C. Munhoz, B. Garcia-Bueno, J. Madrigal [et al.] // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2008. – Vol. 41. – P. 1037-1046.
222. Murphy, E. Preconditioning: the mitochondrial connection / E. Murphy, C. Steenbergen // *Annu Rev. Physiol.* – 2007. Vol. 69. – P. 51-67.
223. Murphy, M.P. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum / M.P. Murphy // *Cell Metab.* – 2013. – Vol. 18, № 2. – P. 145-146.
224. Naseem, K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases / K.M. Naseem // *Mol. Aspects Med.* – 2005. – Vol. 26, № 1-2. – P. 33-65.
225. Neckel, H. Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses / H. Neckel, E. Quagliotto, K.R. Casali [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 90, № 5. – P. 525-536.
226. Nedergaard, M. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter / M. Nedergaard, T. Takano, A.J. Hansen // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2002. – Vol. 3, № 9. – P. 748-755.
227. Nicolaides, N.C. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids / N.C. Nicolaides, E. Kyratzi, A. Lamprokostopoulou [et al.] // *Neuroimmunomodulation*. – 2015. – Vol. 22, № 1-2. – P. 6-19.

228. Nikolaev, V.I. Role of stress-limiting systems in the pathogenesis of stress-induced myocardial damage / V.I. Nikolaev // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* – 1995. – Vol. 4. P. 3-6.
229. Niswender, C.M. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease / C.M. Niswender, P.J. Conn // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2010. – Vol. 50. – P. 295-322.
230. Oceandy, D. Neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart is regulated by the sarcolemmal calcium pump 4b / D. Oceandy, E.J. Cartwright, M. Emerson // *Circulation.* – 2007. – Vol. 115. – P. 483-492.
231. Olivenza, R. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex / R. Olivenza, M.A. Moro, I.J. Lizasoain [et al.] // *Neurochem.* – 2000. – Vol. 74, № 2. – P. 785-791.
232. Pacher, P. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 315-424.
233. Park, D.J. Regulation of striatal nitric oxide synthesis by local dopamine and glutamate interactions / D.J. Park, A.R. West // *J. Neurochem.* – 2009. – Vol. 111, № 6. – P. 1457-1465.
234. Paterson, D. Nitric oxide and the autonomic regulation of cardiac excitability. The G.L. Brown Prize Lecture / D. Paterson // *Exp. Physiol.* – 2001. – Vol. 86, № 1. – P. 1-12.
235. Paton, J.F. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity / J.F. Paton, S. Kasparov, D.J. Paterson // *Trends Neurosci.* – 2002. – Vol. 25, № 12. – P. 626-631.
236. Paxinos, G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: 5<sup>th</sup> edition* / G. Paxinos, C. Watson. San Diego: Academic Press, 2004. – 209 p.
237. Pellegrino, D. Nitrite exerts potent negative inotropy in the isolated heart via eNOS-independent nitric oxide generation and cGMP-PKG pathway activation / D. Pellegrino, S. Shiva, T. Angelone [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1787, № 7. – P. 818-827.

238. Perfilova, V.N. Effect of Citrocard on functional activity of cardiomyocyte mitochondria during chronic alcohol intoxication / V.N. Perfilova, O.V. Ostrovskii, V.E. Verovskii [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 143, № 3. – P. 341-343.
239. Pitts, M.W. The Central Nucleus of the Amygdala and Corticotropin-Releasing Factor: Insights into Contextual Fear Memory / M.W. Pitts, C. Todorovic, T. Blank, L.K. Takahashi // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29, № 22. – P. 7379-7388.
240. Plotnikoff, N.P. Cytokines: Stress and Immunity / N.P. Plotnikoff, R.E. Faith, A.G. Murgu, R.A. Good. – 2nd Edition. – Boca Raton: CRC Press, 2006. – 405 p.
241. Puzserova, A. Blood pressure regulation in stress: focus on nitric oxide-dependent mechanisms / A. Puzserova, I. Bernatova // *Physiol. Res.* – 2016. – Vol. 65. – P. 309-342.
242. Radley, J.J. Stress risk factors and stress-related pathology: neuroplasticity, epigenetics and endophenotypes / J.J. Radley, M. Kabbaj, L. Jacobson [et al.] // *Stress.* – 2011. – Vol. 14, № 5. – P. 481-497.
243. Raju, K. Regulation of brain glutamate metabolism by nitric oxide and S-nitrosylation / K. Raju, P.T. Doulias, P. Evans [et al.] // *Sci. Signal.* – 2015. – № 8. – P. 68.
244. Raquel, H.A. Swimming Training Modulates Nitric Oxide-Glutamate Interaction in the Rostral Ventrolateral Medulla in Normotensive Conscious Rats / H.A. Raquel, G.S. Masson, B.F. Barna [et al.] // *Front. Physiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 221.
245. Rastaldo, R. Nitric oxide and cardiac function / R. Rastaldo, P. Pagliaro, S. Cappello [et al.] // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 81, № 10. – P. 779-793.
246. Ratman, D. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering / D. Ratman, W. Vanden Berghe, L. Dejager [et al.] // *Molecular and Cellular Endocrinology* – 2013. – Vol. 80, № 1-2. – P. 41-54.
247. Ritchie, R.H. The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease / R.H. Ritchie, G.R. Drummond, C.G. Sobey [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2017. – Vol. 116. – P. 57-69.

248. Rivier, C. Role of gaseous neurotransmitters in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis / C. Rivier // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – V. 933. – P. 254-264.
249. Robertson, D. *Primer on the Autonomic Nervous System* / D. Robertson, P.A. Low, R.J. Polinsky. – 3rd Edition. – San Diego: Academic Press, Inc., 2011. – 730 p.
250. Rossi, B.R. Physical exercise attenuates the cardiac autonomic deficit induced by nitric oxide synthesis blockade / B.R. Rossi, D. Mazer, L.C. Silveira [et al.] // *Arq. Bras. Cardiol.* – 2009. – Vol. 92, № 1. – P. 31-38.
251. Sah, P. The amygdaloid complex: anatomy and physiology / P. Sah, E.S. Faber, M. Lopez De Armentia, J. Power // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83, № 3. – P. 803-834.
252. Santini, C.O. The ventral hippocampus NMDA receptor/nitric oxide/guanylate cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats / C.O. Santini, A. Fassini, A.A. Scopinho [et al.] // *Auton. Neurosci.* – 2013. – Vol. 177, № 2. – P. 244-252.
253. Santos, R.M. Nitric oxide inactivation mechanisms in the brain: role in bioenergetics and neurodegeneration / R.M. Santos, C.F. Lourenço, A. Ledo [et al.] // *Int. J. Cell Biol.* – 2012. – V. 2012. – Article ID 391914.
254. Saracyn, M. Hepatoprotective effect of nitric oxide in experimental model of acute hepatic failure / M. Saracyn, M. Brytan, R. Zdanowski [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20, № 46. – P. 17407-17415.
255. Sarti, P. Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications / P. Sarti, E. Forte, D. Mastronicola [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1817, № 4. – P. 610-619.
256. Sawyer, D.B. Mitochondrial oxidative stress in heart failure: "oxygen wastage" revisited / D.B. Sawyer, W.S. Colucci // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 86, № 2. – P. 119-120.
257. Schneiderman, N. Stress and health: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants / N. Schneiderman, G. Ironson, S.D. Siegel // *Annu. Rev. Clin. Psychol.* – 2005. – Vol. 1. – P. 607-628.

258. Schultz, H.D. Nitric oxide regulation of autonomic function in heart failure / H.D. Schultz // *Curr. Heart Fail. Rep.* – 2009. – Vol. 6, № 2. – P. 71-80.
259. Sears, C.E. Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling / C.E. Sears, S.M. Bryant, E.A. Ashley [et al.] // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 92. – P. e52-59.
260. Selye, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents / H. Selye // *Nature.* – 1936. – Vol. 138. – P. 32.
261. Shiva, S. Nitrite: A Physiological Store of Nitric Oxide and Modulator of Mitochondrial Function / S. Shiva // *Redox Biol.* – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 40-44.
262. Shyamaladevi, N. Evidence that nitric oxide production increases gamma-amino butyric acid permeability of blood-brain barrier / N. Shyamaladevi, A.R. Jayakumar, R. Sujatha [et al.] // *Brain Res. Bull.* – 2002. – Vol. 57, № 2. – P. 231-236.
263. Siabro, P.I. Analysis of mechanisms regulating the heart in extreme situations / P.I. Siabro, A.M. Dmitrienko, A.G. Andriutsa // *Fiziol. Zh. SSSR Im. I.M. Sechenova.* – 1978. – Vol. 64, № 7. – P. 965-972.
264. Sigel, E. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors / E. Sigel, M.E. Steinmann // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 48. – P. 40224-40231.
265. Smith, S.M. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress / S.M. Smith, W.W. Vale // *Dialogues in Clinical Neuroscience.* – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 383-395.
266. Sousa, N. Disconnection and reconnection: the morphological basis of (mal)adaptation to stress / N. Sousa, O.F.X. Almeida // *Trends in Neurosciences.* – 2012. – Vol. 35, № 12. – P. 742-751.
267. Spencer, S.J. The glucocorticoid contribution to obesity / S.J. Spencer, A. Tilbrook // *Stress.* – 2011. – Vol. 14, № 3. – P. 233-246.
268. Spiers, J.G. Acute restraint stress induces rapid and prolonged changes in erythrocyte and hippocampal redox status / J.G. Spiers, H.J. Chen, A.J. Bradley [et al.] // *Psychoneuroendocrinology.* – 2013. – Vol. 38. – P. 2511-2519.

269. Spiers, J.G. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress / J.G. Spiers, H.J.C. Chen, C. Sernia, N.A. Lavidis // *Front. Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 456.
270. Stephens, M.A. Stress and the HPA Axis Role of Glucocorticoids in Alcohol Dependence / M.A. Stephens, G. Wand // *Alcohol Res.* – 2012. – Vol. 34, № 4. – P. 468-483.
271. Strijdom, H. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions / H. Strijdom, C. Nontuthuko, A. Lochner // *Cardiovasc. J. Afr.* – 2009. – Vol. 20, № 5. – P. 303-310.
272. Stults-Kolehmainen, M.A. The Effects of Stress on Physical Activity and Exercise / M.A. Stults-Kolehmainen, R. Sinha // *Sports Med.* – 2014. – Vol. 44, № 1. – P. 81-121.
273. Takahashi, H. The effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid on blood pressure / H. Takahashi, M. Tiba, M. Iino, T. Takayasu // *The Japanese journal of physiology.* – 1955. – Vol. 5. – P. 334-341.
274. Tamargo, J. Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide / J. Tamargo, R. Caballero, R. Gómez, E. Delpón // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – Vol. 87, № 4. – P. 593-600.
275. Tamashiro, K.L. Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome / K.L. Tamashiro, R.R. Sakai, C.A. Shively // *Stress.* – 2011. – Vol. 14. – P. 468-474.
276. Tang, X. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases / X. Tang, Y.X. Luo, H.Z. Chen, D.P. Liu // *Front. Physiol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 175.
277. Tank, A.W. Peripheral and central effects of circulating catecholamines / A.W. Tank, W. Lee // *Compr. Physiol.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 1-15.
278. Tarasenko, A.S. Effect of nitric oxide donor SNAP on GABA release from rat brain nerve terminals / A.S. Tarasenko // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, № 5. – P. 82-89.
279. Tatomir, A. The impact of stress and glucocorticoids on memory / A. Tatomir, C. Micu, C. Crivii // *Clujul. Med.* – 2014. – Vol. 87, № 1. – P. 3-6.

280. Tavares, R.F. Interaction between glutamatergic and nitrergic mechanisms mediating cardiovascular responses to L-glutamate injection in the diagonal band of Broca in anesthetized rats / R.F. Tavares, L.B. Resstel, F.M. Corrêa // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 81, № 10. – P. 855-862.
281. Tejavathi, B. Association of lipid peroxidation with endothelial dysfunction in patients with overt hypothyroidism / B. Tejavathi, M.M. Suchitra, V. Suresh [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2013. – Vol. 121, № 5. – P. 306-309.
282. Thiriet, M. *Diseases of the Cardiac Pump* / M. Thiriet. Switzerland: Springer Int. Publ., 2015. – 631 p.
283. Thoonen, R. Pathophysiology of hypertension in the absence of nitric oxide/cyclic GMP signaling / R. Thoonen, P. Y. Sips, K. D. Bloch, E. S. Buys // *Current Hypertension Reports.* – 2013. – Vol. 15, № 1. – P. 47-58.
284. Toda, N. How mental stress affects endothelial function / N. Toda, M. Nakanishi-Toda // *Pflugers Arch.* – 2011. – Vol. 462. – P. 779-794.
285. Tousoulis, D. The role of nitric oxide on endothelial function / D. Tousoulis, A.M. Kampoli, C. Tentolouris [et al.] // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 10, № 1. – P. 4-18.
286. Trachootham, D. Redox regulation of cell survival / D. Trachootham, W. Lu, M.A. Ogasawara et al. // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2008. – Vol. 10, № 8. – P. 1343-1374.
287. Traynelis, S.F. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function / S.F. Traynelis, L.P. Wollmuth, C.J. McBain [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2010. – Vol. 62, № 3. – P. 405-496.
288. Tripathi, P. The role of nitric oxide in inflammatory reactions / P. Tripathi, L. Kashyap, V. Singh // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 51, № 3. – P. 443-452.
289. Tsutsui, H. Oxidative stress and heart failure / H. Tsutsui, S. Kinugawa, S. Matsushima // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 301, № 6. – P. H2181-H2190.

290. Turnbull, A.V. Corticotropin-releasing factor, vasopressin, and prostaglandins mediate, and nitric oxide restrains, the hypothalamic-pituitary-adrenal response to acute local inflammation in the rat / A.V. Turnbull, C. Rivier // *Endocrinology*. – 1996. – Vol. 137, № 2. – P. 455-463.

291. Tyagi, N. Differential expression of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor A (GABA A) and effects of homocysteine / N. Tyagi, D. Lominadze, W. Gillespie [et al.] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2007. – Vol. 45, № 12. – P. 1777-1784.

292. Ulrich-Lai, Y.M. Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses / Y.M. Ulrich-Lai, J.P. Herman // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 10, № 6. – P. 397-409.

293. van Hinsbergh, V.W. Endothelium – role in regulation of coagulation and inflammation / V.W. van Hinsbergh // *Semin. Immunopathol.* – 2012. – Vol. 34, № 1. – P. 93-106.

294. Vanhatalo, S. Nitric oxide synthase in the hypothalamo-pituitary pathways / S. Vanhatalo, S.J. Soinila // *Chem. Neuroanat.* – 1995. – Vol. 8. – P. 165-173.

295. Vicente, S. Neuronal nitric oxide synthase modulates basal catecholamine secretion in bovine chromaffin cells / S. Vicente, M.P. González, M.J. Oset-Gasque // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – Vol. 69, № 3. – P. 327-340.

296. Vodovotz, Y. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN- $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide / Y. Vodovotz, N.S. Kwon, M. Pospischil [et al.] // *J. Immunol.* – 1994. – V. 152, № 8. – P. 4110-4118.

297. Vyas, S. Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration / S. Vyas, A.J. Rodrigues, J.M. Silva [et al.] // *Neural Plasticity*. – 2016. – Vol. 2016. – Article ID 6391686. – 15 p.

298. Wallace, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine / D.C. Wallace // *Annu. Rev. Genet.* – 2005. – Vol. 39. – P. 359-407.

299. Widmer, R.J. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease / R.J. Widmer, A. Lerman // *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* – 2014. – Vol. 2014, № 3. – P. 291-308.
300. Wohlfart, P. Antiatherosclerotic effects of small-molecular-weight compounds enhancing endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling / P. Wohlfart, H. Xu, A. Endlich [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – Vol. 325, № 2. – P. 370-379.
301. Xu, K.Y. Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia induced inactivation / K.Y. Xu, S.P. Kuppusamy, J.Q. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 41798-41803.
302. Yang, H.J. Effects of *Salvia sclarea* on chronic immobilization stress induced endothelial dysfunction in rats / H.J. Yang, K.Y. Kim, P. Kang [et al.] // *Complement. Altern. Med.* – 2014. – Vol. 14. – P. 396.
303. Yang, Z. Impairment of vascular endothelial function following reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction / Z. Yang, J. Li, J. Kong, S. Wu // *J. Int. Med. Res.* – 2013. – Vol. 41, № 4. – P. 1074-1078.
304. Yao, H.H. Enhancement of glutamate uptake mediates the neuroprotection exerted by activating group II or III metabotropic glutamate receptors on astrocytes / H.H. Yao, J.H. Ding, F. Zhou [et al.] // *J. Neurochem.* – 2005. – V. 92, № 4. – P. 948-961.
305. Yoshida, S. Role of medial amygdala in controlling hemodynamics via GABA(A) receptor in anesthetized rats / S. Yoshida, T. Matsubara, A. Uemura [et al.] // *Circ. J.* – 2002. – Vol. 66, № 2. – P. 197-203.
306. Zafir, A. Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats / A. Zafir, N. Banu // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2009. – Vol. 46, № 1. – P. 53-58.
307. Zanchi, A. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system / A. Zanchi, N.C. Schaad, M.C. Osterheld [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol. 268. – P. 2267-2273.

308. Zhang, Y.H. Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice / Y.H. Zhang, M.H. Zhang, C.E. Sears [et al.] // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 102. – P. 242-249.

309. Zhang, Y.H. Sub-cellular targeting of constitutive NOS in health and disease / Y.H. Zhang, B. Casadei // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2012. – Vol. 52, № 2. – P. 341-350.

310. Zhang, Y.H. Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology / Y.H. Zhang, C.Z. Jin, J.H. Jang, Y. Wang // *J. Physiol.* – 2014. – Vol. 592, № 15. – P. 3189-3200.

311. Zheng, Y. Metabolites of Glutamate Metabolism Are Associated With Incident Cardiovascular Events in the PREDIMED PREvención con DIeta MEDiterránea (PREDIMED) Trial / Y. Zheng, F.B. Hu, M. Ruiz-Canela [et al.] // *J. Am. Heart Assoc.* – 2016. – Vol. 5, № 9. – P. e3755.

312. Zhu, L.J. The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity / L.J. Zhu, M.Y. Liu, H. Li [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – P. e97689.

313. Zorov D.B. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release / D.B. Zorov, M. Juhaszova, S. Sollott // *Physiol. Rev.* – 2014. – Vol. 94, № 3. – P. 909-950.