

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.133

Роль активных форм кислорода в регуляции тонуса артерий дыхательной и локомоторной мышц крысы**А.А. Борзых^{1,*} , А.А. Швецова², И.В. Кузьмин³, С.В. Буравков⁴ ,
Д.К. Гайнуллина² , О.С. Тарасова^{1,2} **¹Лаборатория физиологии мышечной деятельности, Институт медико-биологических проблем, Российская академия наук, Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А;²Кафедра физиологии человека и животных и ³кафедра генетики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;⁴Кафедра экологической и экстремальной медицины, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1

*e-mail: borzykh.anna@gmail.com

Продукция активных форм кислорода (АФК) в клетках скелетных мышц повышается при сокращении. Дыхательные и локомоторные мышцы отличаются режимами сокращения, поэтому продукция АФК и их влияние на сосуды в этих функционально разных типах мышц могут различаться. Целью работы было оценить роль АФК в регуляции тонуса артерии диафрагмы (*a. phrenica*) и глубокой артерии плеча (*a. profunda brachii*) крысы. Реакции кольцевых препаратов артерий исследовали в изометрическом режиме. Ингибитор NADPH-оксидаз (NOX) VAS2870 вызывал расслабление препаратов, величина реакции артерий диафрагмы была больше, чем артерий плеча: при концентрации VAS2870 1 мкМ сила сокращения снижалась до 33% и 91% от уровня предсокращения соответственно. Тирон («ловушка» $O_2^{\cdot-}$) обладал сходным профилем активности: в концентрации 10 мМ он вызывал снижение силы сокращения артерий диафрагмы до 38%, а артерий плеча — до 66% от исходной силы сокращения. Каталаза, разрушающая H_2O_2 , в концентрации 3000 Ед/мл не влияла на сокращение артерий диафрагмы, но увеличивала сокращение глубоких артерий плеча. Методом количественной полимеразной цепной реакции показано, что содержание мРНК изоформ NOX, *p22phox*, *p47phox*, *p67phox*, *Poldip2*, *Gpx-1*, *SOD-1* и каталазы в ткани двух артерий не различается, тогда как содержание мРНК *SOD-3* в артериях диафрагмы ниже, чем в артериях плеча. Таким образом, продуцируемый NOX $O_2^{\cdot-}$ сильнее увеличивает тоническое сокращение артерий диафрагмы, чем артерий локомоторной мышцы. H_2O_2 , напротив, вызывает расслабление артерий локомоторной мышцы, но не артерий диафрагмы. Одной из причин выраженного влияния $O_2^{\cdot-}$ в артериях диафрагмы может быть сравнительно низкий уровень экспрессии *SOD-3*.

Ключевые слова: резистивные артерии, диафрагма, сокращение, активные формы кислорода, NADPH-оксидаза, супероксиддисмутазы

Повышение продукции активных форм кислорода (АФК) служит одним из механизмов патогенеза заболеваний респираторной и сердечно-сосудистой систем [1]. Вместе с тем при умеренной продукции АФК могут принимать участие в регуляции тонуса сосудов путем влияния на активность многих сигнальных путей в клетках сосудистой стенки [2]. Известно, что супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$) и пероксид водорода (H_2O_2) могут вызывать как сужение, так и расширение резистивных артерий [3].

Основным источником АФК в клетках артерий является NADPH-оксидазный ферментативный комплекс (NOX), расположенный в наруж-

ной мембране клеток [2]. Из семи изоформ NOX, описанных в клетках млекопитающих, в артериях встречаются NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 (только у человека) и DUOX1/2. Активность NOX регулируется большим количеством сигнальных путей и белок-белковыми взаимодействиями. NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 образуют комплексы с мембранным белком p22phox. Кроме того, NOX1, NOX2 и NOX3 ассоциированы с цитозольными регуляторными субъединицами: NOX1 и NOX3 — с NOXO1, NOXA1 и Rac1, NOX2 — с p47phox, p67phox и Rac1, а NOX4 — с poldip2. NOX4 и Duox1/2 могут быть конститутивно активными без ассоциации с регуляторными

субъединицами. Основным продуктом NOX4 и DUOX1/2 является H_2O_2 , остальные изоформы продуцируют $O_2^{\cdot-}$ [2, 4]. $O_2^{\cdot-}$ имеет короткое время жизни и быстро превращается в более стабильную молекулу H_2O_2 , эта реакция ускоряется супероксиддисмутазами (SOD) [5]. Важно отметить, что содержание различных изоформ и регуляторных субъединиц NADPH-оксидазы может существенно различаться в артериях разных органов [4].

Известно, что сократительная активность скелетных мышц связана с повышением продукции АФК в мышечных волокнах [6]. Продукция АФК также может увеличиваться в артериях, снабжающих работающие мышцы кровью, например, при повышении создаваемого током крови напряжения сдвига на эндотелии [7]. Дыхательные и локомоторные мышцы различаются режимами сократительной активности: дыхательные мышцы постоянно ритмически активны [8] и отличаются от локомоторных мышц по кровоснабжению и метаболическим характеристикам мышечной ткани [9–11]. Это может быть причиной разной продукции АФК и их участия в регуляции тонуса артерий дыхательных и локомоторных мышц.

Целью данной работы было проверить гипотезу о различной роли АФК в регуляции тонуса артерий дыхательных и локомоторных мышц. Для этого мы исследовали изменения сократительных ответов артерий диафрагмы (основной инспираторной мышцы млекопитающих) и трехглавой мышцы плеча (локомоторная мышца) при фармакологической модуляции продукции или деградации АФК, а также оценивали уровни экспрессии мРНК структурных и регуляторных субъединиц NADPH-оксидазного комплекса и ферментов, разрушающих АФК: каталазы, супероксиддисмтаз (*SOD-1*, *SOD-2*, *SOD-3*) и глутатионпероксидазы-1 (*Gpx-1*).

Материалы и методы

Животные и объекты исследования. Исследование проводили на половозрелых самцах крыс Вистар с массой тела 350–400 г. Животных содержали в виварии с контролируемой температурой и световым циклом 12/12 ч. Воду и корм для грызунов (ООО «Лабораторкорм», Москва) крысы получали *ad libitum*. Крыс наркотизировали CO_2 и декапитировали гильотиной, далее выделяли артерию диафрагмы (*a. phrenica*) и глубокую артерию плеча (*a. profunda brachii*).

Исследование реакций изолированных артерий. Из артерий вырезали кольцевые препараты длиной 2 мм и помещали их в камеры многоканального изометрического миографа (410A или 620M, DMT, Дания). Показания тензометрических датчиков оцифровывали с частотой 10 Гц (использовали аналого-цифровой преобразователь E14-140M, L-CARD, Россия) и записывали на жесткий диск компьютера с помощью программы PowerGraph

3.3 (ДИСофт, Россия). Каждая камера миографа содержала 5 мл раствора следующего состава (мМ): NaCl – 120; $NaHCO_3$ – 26; KCl – 4,5; $CaCl_2$ – 1,6; $MgSO_4$ – 1,0; NaH_2PO_4 – 1,2; D-глюкоза – 5,5; EDTA – 0,025; HEPES – 5,0. В течение эксперимента раствор непрерывно аэрировали карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2) для поддержания pH 7,4. После нагрева раствора до 37°C (в течение 30 мин) определяли растяжение препарата, оптимальное для проявления его сократительной активности, в ходе этой процедуры также вычисляли внутренний диаметр артерий [12]. Затем препараты активировали последовательным добавлением KCl (60 мМ), норадреналина (10 мкМ) и метоксамина (10 мкМ); длительность каждого воздействия составляла 5 мин, отмывку препарата от вещества проводили путем трехкратной замены раствора с интервалами 5 мин. Для оценки состояния эндотелия на препараты артерий, предварительно сокращенные метоксamiном (2–4 мкМ), действовали ацетилхолином (10 мкМ).

Далее проводили оценку влияния АФК, продуцируемых NOX, на тонус артерий с помощью ингибитора всех изоформ NADPH-оксидазы VAS2870 [13]. Изучение селективного вклада $O_2^{\cdot-}$ или H_2O_2 проводили с помощью тирона (двунариевая соль 4,5-дигидроксид-1,3-бензолдисульфоновой кислоты – «ловушка» $O_2^{\cdot-}$) [14] или каталазы.

В первой и второй сериях экспериментов исследовали влияние VAS2870 (диапазон концентраций – от 0,1 до 30 мкМ) и тирона (от 0,1 до 10 мМ) на фоне предварительного сокращения препаратов метоксamiном (агонист α_1 -адренорецепторов) в концентрации, вызывающей 60–70% максимального ответа (2–4 мкМ). Исследуемые вещества добавляли в камеру миографа кумулятивно, действие каждой концентрации длилось 5 мин (рис. 1А). Параллельно проводили контрольные эксперименты, в которых вместо исследуемых веществ в камеру миографа добавляли эквивалентный объем растворителя: DMFA (диметилформамид) для VAS2870 или раствор для миографа для тирона. Препараты предварительно инкубировали в течение 20 мин с ингибитором NO-синтазы L-NNA (N^{ω} -нитро-L-аргинин, 100 мкМ) для исключения дилататорного влияния эндогенного NO. Это обеспечивало достаточно стабильный уровень тонического сокращения препаратов, что важно для оценки сравнительно медленных эффектов антиоксидантов. В итоге за время, необходимое для исследования влияния VAS2870 или тирона, уменьшение уровня предсокращения артерий в контрольных экспериментах составляло всего 10–20% (рис. 1Б, 1В).

В третьей серии экспериментов исследовали влияние каталазы на величину сократительного ответа препаратов при однократном добавлении метоксамина в концентрации 1 мкМ (обеспечивает умеренное повышение силы до 30–40% от

максимального уровня [15]). До добавления метоксамина препараты в течение 20 мин инкубировали с каталазой (3000 Ед/мл, активность — не менее 10000 Ед/мг белка), а в контрольных экспериментах — в растворе без каталазы.

Все использованные фармакологические препараты были получены из Sigma (США), кроме L-NNA (ALEXIS Biochemicals, США) и DMFA (диметилформамид, PanReas, США). Конечная концентрация DMFA в камере миографа составляла 0,3% (% об.).

Обработку результатов проводили с использованием программ PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия) и GraphPad Prism 7.0 (США). Реакции препаратов на VAS2870 и тирон оценивали по уровню силы сокращения, до которого она снижалась при фармакологических воздействиях (за 100% принимали уровень предсокращения). Влияние каталазы оценивали путем сопоставления сократительных ответов препаратов, инкубированных в присутствии и в отсутствие фермента (сократительные ответы выражали в % от максимальной силы сокращения). Чувствительность артерий к VAS2870 оценивали по величине pD_2 (отрицательный логарифм EC_{50} — концентрации агониста, вызывающей 50% расслабления от исходного уровня сокращения).

Исследование экспрессии генов (количественная полимеразная цепная реакция — ПЦР). Для приготовления одного образца ткани использовали артерии трех крыс. Артерии быстро очищали от окружающих тканей и помещали в буфер RNeasy lysis (Qiagen, Германия), в котором их хранили при $-20^{\circ}C$ до выделения мРНК. Экстракцию тотальной РНК из образцов проводили с помощью набора «Clean RNA Standard» (Евроген, Россия) по протоколу производителя с некоторыми модификациями.

Концентрацию нуклеотидов в полученных образцах определяли с помощью спектрофотометра (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США). Полученные образцы РНК были обработаны ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для синтеза комплементарной ДНК на матрице тотальной РНК (150 нг) проводили обратную транскрипцию с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) и праймеров со случайными последовательностями нуклеотидов длиной 6 п.н., согласно прилагаемой инструкции. Синтезированную кДНК хранили при $-20^{\circ}C$ до проведения количественной полимеразной цепной реакции. Праймеры для проведения ПЦР были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия).

Последовательности прямых и обратных праймеров для референсного гена (β -актина) и ряда исследуемых генов (*NOX2*, *NOX3*, *NOX4*, *p22phox*, *p47phox*, *p67phox*, *poldip2*, каталаза, *SOD-1*, *SOD-2*, *SOD-3*, *Gpx-1*) были взяты из опубликованных статей [16–20]. Праймеры для гена *NOX1* были подобраны с помощью программы UGENE (<http://ugene.unipro.ru>, Россия). ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Программа амплификации включала начальную денатурацию при $95^{\circ}C$ (10 мин), 40 циклов ПЦР (30 с при $95^{\circ}C$, 30 с при $60^{\circ}C$ и 60 с при $72^{\circ}C$) и заключительную инкубацию при $72^{\circ}C$ (10 мин).

Содержание мРНК каждого из исследуемых генов нормировали на содержание мРНК β -актина (референсный ген) в том же образце. Далее данные по экспрессии генов в артериях диафрагмы выражали в процентах от среднего значения в артерии плеча.

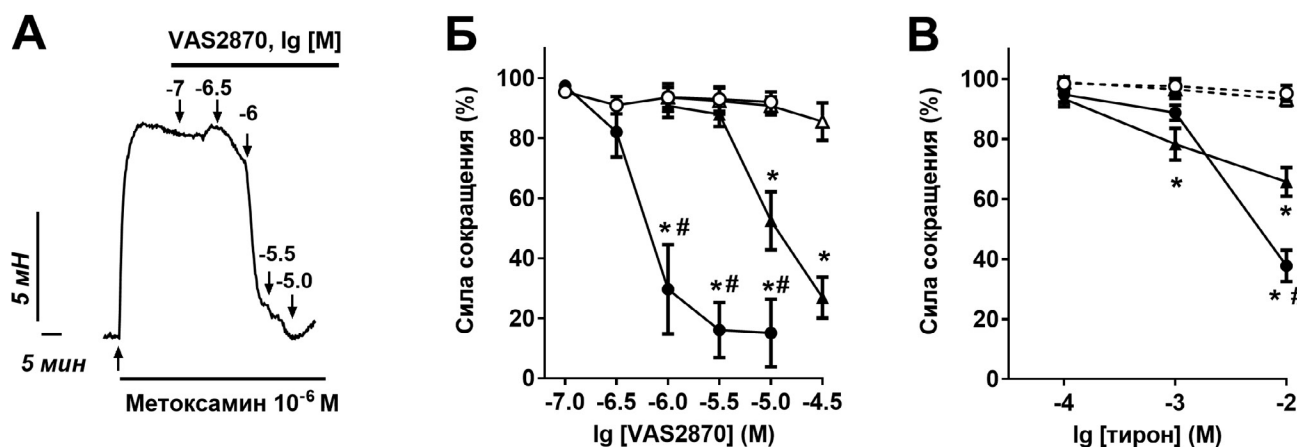


Рис. 1. Исследование влияния АФК на вазомоторные ответы артерий диафрагмы и глубокой артерии плеча. А. Ингибитор NADPH-оксидазы (VAS2870) при аппликации на предварительно сокращенный препарат артерии диафрагмы вызывает расслабление (фрагмент оригинальной записи эксперимента). Б–В. Реакции расслабления артерий диафрагмы (кружки) и глубокой артерии плеча (треугольники) на VAS2870 (Б, $n=6$) и тирон (В, $n=7$) (закрашенные символы) или эквивалентного объема растворителя (DMFA для VAS2870 или раствора для миографа для тирона) (пустые символы). Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего. * — $p < 0,05$ по сравнению с растворителем, # — $p < 0,05$ по сравнению с глубокой артерией плеча (дисперсионный анализ для повторных измерений с поправкой Сидака на множественные сравнения).

Статистический анализ данных. Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7.0. Нормальность распределения значений оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения данные представляли в виде среднего и ошибки среднего, различия между группами оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Сидака на множественные сравнения или t-критерия Стьюдента. Если распределение данных отличалось от нормального, их представляли в виде медианы и межквартильного размаха и проводили анализ с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни или Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$; n — объем выборки (количество животных или образцов ткани).

Результаты и обсуждение

Внутренний диаметр артерии диафрагмы составил $249,0 \pm 4,8$ мкм и был несколько меньше, чем диаметр глубокой артерии плеча — $268,8 \pm 7,5$ мкм ($p < 0,05$).

Ингибирование всех изоформ NADPH-оксидазы вызывало расслабление артерий, выраженность которого существенно различалась в артериях диафрагмы и артериях плеча. Артерии диафрагмы демонстрировали более выраженные реакции расслабления на VAS2870 (рис. 1Б). При действии ингибитора в концентрации 1 мкМ уровень силы сокращения артерий диафрагмы составил $33 \pm 18\%$, а силы сокращения артерии плеча — $91 \pm 5\%$ ($p < 0,05$). Чувствительность артерий диафрагмы к VAS2870 также была значительно выше по сравнению с чувствительностью глубоких артерий плеча: значения pD_2 составили $6,0 \pm 0,2$ и $4,9 \pm 0,1$ соответственно ($p < 0,05$).

Итак, блокада NADPH-оксидаз приводила к расслаблению артерий, т.е. АФК, продуцируемые NOX, вызывают сокращение препаратов артерий диафрагмы и артерий плеча. Известно, что супероксидный анион-радикал как сам по себе, так и после превращения в пероксид водорода может приводить к сокращению гладкомышечных клеток [3, 21]. Чтобы определить, какой тип АФК принимает участие в регуляции тонуса артерий диафрагмы и глубокой артерии плеча, далее мы исследовали влияние тирона («ловушка» $O_2^{\cdot-}$) и каталазы, разрушающей H_2O_2 , на сократительные ответы.

Как и VAS2870, тирон вызывал расслабление препаратов (рис. 1В), причем влияние тирона на тонус артерий диафрагмы также было выражено значительно сильнее, чем на тонус артерий плеча. При действии тирона в концентрации 10 мМ артерии диафрагмы расслаблялись до $38 \pm 5\%$, а артерии плеча — до $66 \pm 5\%$ от исходного уровня сокращения ($p < 0,05$). Таким образом, $O_2^{\cdot-}$ потенцирует сократительные реакции артерий диа-

фрагмы значительно сильнее, чем реакции артерий плеча.

Каталаза увеличивала сократительные ответы артерий плеча на метоксамин (1 мкМ), но не оказывала такого влияния на артерии диафрагмы. Величина сократительного ответа препаратов артерии плеча в контрольных экспериментах составила $46 \pm 3\%$ от максимального уровня сокращения, а после инкубации с каталазой — $63 \pm 3\%$ ($p < 0,05$). Вместе с тем инкубация с каталазой не оказала значимого влияния на сократительный ответ артерий диафрагмы в контрольных экспериментах — $39 \pm 8\%$, в присутствии каталазы — $47 \pm 6\%$ ($p > 0,05$). Таким образом, снижение содержания H_2O_2 в сосудистой стенке под действием каталазы потенцирует сокращение артерий плеча, но не влияет на сокращение артерий диафрагмы. Это говорит о том, что H_2O_2 уменьшает сократительные ответы артерий плеча, но не артерий диафрагмы. Сопоставляя результаты экспериментов с использованием тирона и каталазы, можно заключить, что выраженное уменьшение сократительных ответов артерий диафрагмы при ингибировании NADPH-оксидазы было обусловлено подавлением сократительного влияния $O_2^{\cdot-}$, а не H_2O_2 . В условиях наших экспериментов продукция $O_2^{\cdot-}$ в клетках сосуда могла либо происходить постоянно, под действием растяжения сосудистой стенки в миографе [22], либо усиливаться при активации α_1 -адренорецепторов метоксаминном, как было показано ранее при использовании другого агониста этих рецепторов — фенилэфрина [23, 24]. Сравнение эффектов этих воздействий на продукцию $O_2^{\cdot-}$ в двух исследованных нами артериях — одно из возможных направлений развития данной работы.

Следует отметить, что АФК, продуцируемые эндотелиальными клетками, также обладают вазомоторным действием. С одной стороны, продукция $O_2^{\cdot-}$ может потенцировать сократительные ответы путем снижения биодоступности NO — ключевого эндотелиального фактора в мелких артериях крысы [25–27]. С другой стороны, H_2O_2 является одним из факторов эндотелий-зависимой вазорелаксации, при этом субстратом для его синтеза служит $O_2^{\cdot-}$, поставляемый эндотелиальной NO-синтазой [28, 29]. В наших экспериментах активность NO-синтазы была подавлена с использованием L-NNA, что ограничивало влияние АФК, продуцируемых сосудистым эндотелием.

Далее представлялось важным исследовать, связаны ли выявленные нами особенности регуляторной роли NADPH-оксидазы в двух исследованных артериях с различиями в экспрессии генов, кодирующих субъединицы этого ферментного комплекса. Прежде всего следует отметить, что в ткани обеих артерий уровни экспрессии изоформ *NOX2* и *NOX4* были на два порядка выше, чем изоформ *NOX1* и *NOX3* ($p < 0,05$, данные не

представлены). На основании значительного вклада АФК, продуцируемых NADPH-оксидазой, в регуляцию сократимости артерий диафрагмы мы предположили, что уровни экспрессии субъединиц NADPH-оксидазы в этих артериях выше, чем в глубоких артериях плеча. Однако содержание мРНК изоформ NOX (*NOX2*, *NOX4*), а также структурной (*p22phox*) и регуляторных субъединиц (*p47phox*, *p67phox*, *Poldip2*) в артериях диафрагмы и артериях плеча не различалось (рис. 2).

Поскольку общий уровень АФК в клетке зависит от соотношения активностей прооксидантной и антиоксидантной систем [30], на следующем этапе работы исследовали уровни экспрессии

генов антиоксидантной системы (рис. 2). Содержание мРНК цитоплазматической *SOD-1*, *Gpx-1* и каталазы не различалось в артериях диафрагмы и артериях плеча. Уровень экспрессии митохондриальной *SOD-2* был выше на 20%, тогда как экспрессия внеклеточной изоформы *SOD-3* меньше в артериях диафрагмы по сравнению с артериями плеча на 28% ($p < 0,05$) (рис. 2).

Возможно, больший вклад АФК, продуцируемых NADPH-оксидазой, в реакции сокращения артерий дыхательных мышц связан с низким уровнем экспрессии *SOD-3* (рис. 3). Снижение экспрессии *SOD-3* может приводить к повышению концентрации супероксидного анион-ради-

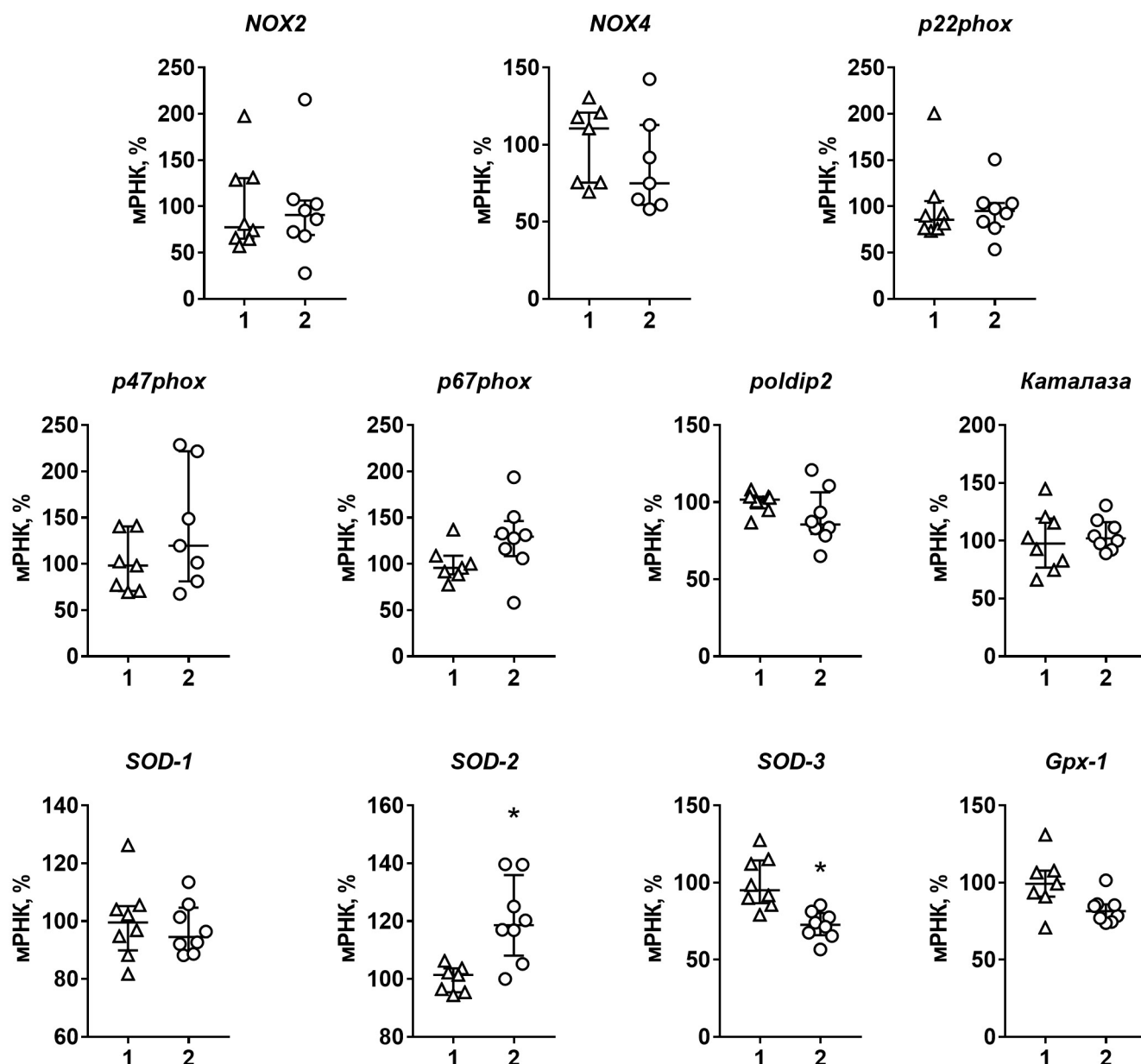


Рис. 2. Содержание мРНК изоформ NADPH-оксидазы (*NOX*), ее структурной (*p22phox*) и регуляторных (*p47phox*, *p67phox*, *poldip2*) субъединиц, а также ферментов, разрушающих АФК (каталазы, трех изоформ супероксиддисмутазы (*SOD*) и глутатионпероксидазы-1 (*Gpx-1*)) в глубоких артериях плеча (1, треугольники) и артериях диафрагмы (2, кружки). Содержание мРНК целевых генов нормировано на содержание мРНК β -актина в том же образце ткани и затем выражено в процентах от среднего значения в глубокой артерии плеча. Данные приведены в виде медианы и межквартильного размаха, $n=7-8$, * — $p < 0,05$ по сравнению с глубокой артерией плеча (критерий Манна-Уитни).

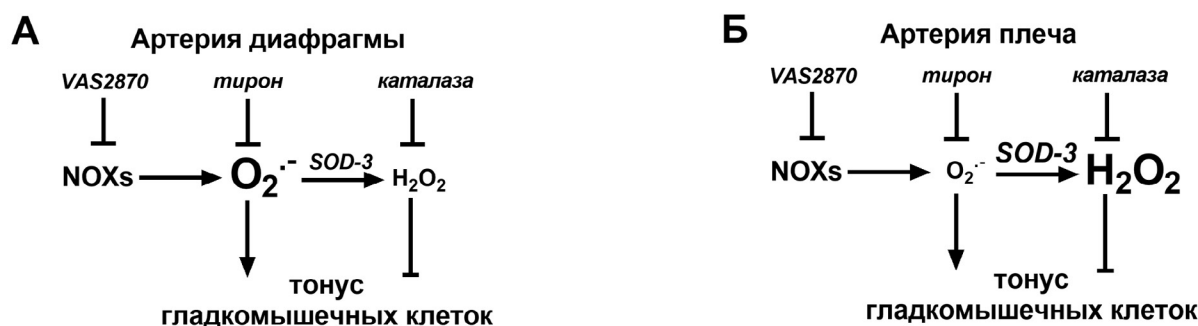


Рис. 3. Предполагаемая схема участия АФК в регуляции тонуса артерии диафрагмы (А) и глубокой артерии плеча (Б). А. В артерии диафрагмы преобладает сократительное влияние $O_2^{\cdot-}$: VAS2870 (ингибитор NOX) и тирон («ловушка» $O_2^{\cdot-}$) вызывают выраженное расслабление, а каталаза (фермент, разрушающий H_2O_2) не влияет на сокращение. Б. В артерии плеча преобладает расслабляющее влияние H_2O_2 : VAS2870 и тирон не оказывают выраженного влияния на сократительные ответы, а каталаза приводит к увеличению сокращения. Тип доминирующей вазоактивной формы АФК зависит от уровня экспрессии SOD-3, который значительно ниже в артерии диафрагмы, чем в артерии плеча.

кала, что, вероятно, объясняет высокую чувствительность артерий диафрагмы к VAS2870 и тирону, которые блокируют продукцию супероксидного анион-радикала или снижают его содержание в сосудистой стенке. Кроме повышения содержания $O_2^{\cdot-}$, снижение экспрессии SOD-3 может уменьшать продукцию H_2O_2 и тем самым ослаблять действие каталазы на артерии диафрагмы. Следует отметить, что SOD-3 катализирует превращение $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 и O_2 на поверхности клеточной мембраны, где располагаются белки-мишени, на активность которых может влиять $O_2^{\cdot-}$. Известно, что супероксидный анион-радикал может вызывать сокращение гладкомышечных клеток артерий, увеличивая вход кальция в клетку через потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа [31]. Кроме того, $O_2^{\cdot-}$ может активировать RhoA/Rho-киназный путь [21, 32], для активации которого в гладкомышечных клетках необходимо перемещение Rho-киназы из цитозоля к наружной мембране клетки [33]. Поскольку SOD-2 катализирует превращение $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 и O_2 в другом компартменте клетки (матрикс митохондрий), ее ферментативная активность должна в меньшей степени влиять на актив-

ность мембранных ферментов и ионных каналов, чем изменение активности SOD-3.

Таким образом, мы впервые показали, что вклад супероксидного анион-радикала в регуляцию тонуса артерий дыхательной мускулатуры намного больше, чем артерий локомоторной мускулатуры. Артерии дыхательной мускулатуры отличаются высокой чувствительностью к ингибированию NADPH-оксидазы, что может быть обусловлено различиями в скорости деградации $O_2^{\cdot-}$ в клетках сосудистой стенки или же в уровне активности сигнальных путей, находящихся под влиянием $O_2^{\cdot-}$. Механизмы влияния АФК на тонус артерий диафрагмы являются предметом для дальнейших исследований.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-00060). Проведение экспериментов осуществлялось с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике Института медико-биологических проблем РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aldosari S., Awad M., Harrington E.O., Sellke F.W., Abid M.R. Subcellular reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular pathophysiology // *Antioxidants* (Basel). 2018. Vol. 7. N 1: 14.
2. Tejero J., Shiva S., Gladwin M.T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation // *Physiol. Rev.* 2019. Vol. 99. N 1. P. 311–379.
3. Knock G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. Vol. 145. P. 385–427.
4. Lassègue B., Martín A., Griendling K.K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH

oxidases in the cardiovascular system // *Circ. Res.* 2012. Vol. 110. N 10. P. 1364–1390.

5. Wang Y., Branicky R., Noë A., Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling // *J. Cell Biol.* 2018. Vol. 217. N 6. P. 1915–1928.

6. Powers S.K., Radak Z., Ji L.L. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future // *J. Physiol.* 2016. Vol. 594. N 18. P. 5081–5092.

7. Chatterjee S., Fisher A.B. Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow // *Antioxid. Redox Signal.* 2014. Vol. 20. N 6. P. 899–913.

8. Hussain S.N. Regulation of ventilatory muscle blood flow // *J. Appl. Physiol.* 1996. Vol. 81. N 4. P. 1455–1468.
9. Polla B., D'Antona G., Bottinelli R., Reggiani C. Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity // *Thorax.* 2004. Vol. 59. N 9. P. 808–817.
10. Borzych A.A., Vinogradova O.L., Tarasova O.S. Diaphragm: The relationship between blood supply regulation and characteristics of the contractile function // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 2. P. 41–49.
11. Tarasova O.S., Kalenchuk V.U., Borzych A.A., Andreev-Andrievsky A.A., Buravkov S.V., Sharova A.P., Vinogradova O.L. A comparative analysis of the vasomotor responses and innervation of small arteries in rat locomotor and respiratory muscles // *Biophysics.* 2008. Vol. 53. N 6. P. 621–625.
12. Mulvany M.J., Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats // *Circ. Res.* 1977. Vol. 41. N 1. P. 19–26.
13. Altenhöfer S., Kleikers P.W.M., Radermacher K.A., Scheurer P., Hermans J.J.R., Schiffers P., Ho H., Winkler K., Schmidt H.H.H.W. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease // *Cell Mol. Life Sci.* 2012. Vol. 69. N 14. P. 2327–2343.
14. Taiwo F.A. Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons // *Spectroscopy.* 2008. Vol. 22. N 6. P. 491–498.
15. Borzych A.A., Andreev-Andrievskiy A.A., Kalenchuk V.U., Mochalov S.V., Buravkov S.V., Kuzmin I.V., Borovik A.S., Vinogradova O.L., Tarasova O.S. Strategies of adaptation of small arteries in diaphragm and gastrocnemius muscle to aerobic exercise training // *Hum. Physiol.* 2017. Vol. 43. N 4. P. 437–445.
16. Braun D., Zollbrecht C., Dietze S., Schubert R., Golz S., Summer H., Persson P.B., Carlström M., Ludwig M., Patzak A. Hypoxia/reoxygenation of rat renal arteries impairs vasorelaxation via modulation of endothelium-independent sGC/cGMP/PKG signaling // *Front. Physiol.* 2018. Vol. 9: 480.
17. Li H., Wang Y., Feng D., Liu Y., Xu M., Gao A., Tian F., Zhang L., Cui Y., Wang Z., Chen G. Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin // *J. Pineal. Res.* 2014. Vol. 57. N 1. P. 110–119.
18. Chen X., Qi L., Fan X., Tao H., Zhang M., Gao Q., Liu Y., Xu T., Zhang P., Su H., Tang J., Xu Z. Prenatal hypoxia affected endothelium-dependent vasodilation in mesenteric arteries of aged offspring via increased oxidative stress // *Hypertens. Res.* 2019. Vol. 42. N 6. P. 863–875.
19. Lima T.I., Monteiro I.C., Valença S., Leal-Cardoso J.H., Fortunato R.S., Carvalho D.P., Teodoro B.G., Ceccatto V.M. Effect of exercise training on liver antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats // *Life Sci.* 2015. Vol. 128. P. 64–71.
20. Lyle A.N., Deshpande N.N., Taniyama Y., Seidel-Rogol B., Pounkova L., Du P., Papaharalambus C., Lassègue B., Griendling K.K. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells // *Circ. Res.* 2009. Vol. 105. N 3. P. 249–259.
21. Knock G.A., Snetkov V.A., Shaifit Y., Connolly M., Drndarski S., Noah A., Pourmahram G.E., Becker S., Aaronson P.I., Ward J.P.T. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. Vol. 46. N 5. P. 633–642.
22. Lai E.Y., Wellstein A., Welch W.J., Wilcox C.S. Superoxide modulates myogenic contractions of mouse afferent arterioles // *Hypertension.* 2011. Vol. 58. N. 4. P. 650–656.
23. Tsai M-H., Jiang M.J. Reactive oxygen species are involved in regulating $\alpha 1$ -adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction // *J. Biomed. Sci.* 2010. Vol. 17. N 1: 67.
24. Bleeke T., Zhang H., Madamanchi N., Patterson C., Faber J.E. Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species // *Circ. Res.* 2004. Vol. 94. N 1. P. 37–45.
25. Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K., Owada M.K., Nakaike R., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nagao T., Egashira K., Fujishima M., Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1996. Vol. 28. N 5. P. 703–711.
26. Garland C.J., Plane F., Kemp B.K., Cocks T.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone // *Trends Pharmacol. Sci.* 1995. Vol. 16. N 1. P. 23–30.
27. Kuzkaya N., Weissmann N., Harrison D.G., Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 25. P. 22546–22554.
28. Shimokawa H. Reactive oxygen species in cardiovascular health and disease: special references to nitric oxide, hydrogen peroxide, and Rho-kinase // *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020. Vol. 66. N 2. P. 83–91.
29. Knock G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. Vol. 145. P. 385–427.
30. Montezano A.C., Touyz R.M. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. Series: Integrated systems physiology. Glasgow: Morgan & Claypool, 2012. 102 pp.
31. Vogel P.A., Yang X., Moss N.G., Arendshorst W.J. Superoxide enhances Ca^{2+} entry through L-type channels in the renal afferent arteriole // *Hypertension.* 2015. Vol. 66. N 2. P. 374–381.
32. Jin L., Ying Z., Webb R.C. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004. Vol. 287. N 4. P. H1495–H1500.
33. Somlyo A.P., Somlyo A.V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. N 4. P. 1325–1358.

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята в печать 09.07.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Role of reactive oxygen species in tone regulation of respiratory and locomotor muscle feed arteries in the rat

A.A. Borzykh^{1,*} , A.A. Shvetsova², I.V. Kuzmin³, S.V. Buravkov⁴ ,
D.K. Gaynullina² , O.S. Tarasova^{1,2} 

¹Laboratory of Exercise Physiology, Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76A, Moscow, 123007 Russia;

²Department of Human and Animal Physiology and ³Department of Genetics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁴Department of Ecological and Extreme Medicine, Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy prospect 27–1, Moscow, 119192, Russia

*e-mail: borzykh.anna@gmail.com

The skeletal muscles contractile activity is associated with increased reactive oxygen species (ROS) production. Respiratory and locomotor muscles differ in the patterns of contractile activity, which can create different conditions for ROS production and their effect on feed arteries. The aim of this work was to study the role of ROS, including produced by NADPH oxidases (NOX), in diaphragm artery (*a. phrenica*) and deep shoulder artery (*a. profunda brachii*) tone regulation of the rat. Vasomotor responses of arterial preparations were studied in isometric regimen. The NOX inhibitor, VAS2870, caused relaxation, which was more pronounced in the diaphragm arteries compared to the shoulder arteries: at the concentration of 1 μ M, the diaphragm arteries relaxed to 33%, and the shoulder arteries – to 91% of the precontraction level. Tiron ($O_2^{\cdot-}$ scavenger) showed similar results: at the 10 mM concentration, it caused relaxation of the diaphragm arteries to 38%, and the shoulder arteries – to 66%. At the same time, catalase (3000 U/ml) increased the deep shoulder arteries contraction but did not affect it in the diaphragm arteries. Using quantitative PCR, it was shown that the contents of mRNA isoforms *NOX*, *p22phox*, *p47phox*, *p67phox*, *Poldip2*, *Gpx-1*, *SOD-1* and catalase do not differ between arteries, while the content of *SOD-3* mRNA in the diaphragm arteries is less than in the shoulder arteries. Thus, the contribution of ROS, produced by NOX, to the feed arteries tone regulation of the respiratory muscles is higher than in the locomotor muscles. Experiments using tiron and catalase have shown that $O_2^{\cdot-}$ increases the arteries contractile responses, while H_2O_2 , on the contrary, causes the shoulder arteries relaxation. One of the reasons for the more pronounced effect of $O_2^{\cdot-}$ in the diaphragm arteries may be the relatively low *SOD-3* expression.

Keywords: resistance arteries, diaphragm, contraction, reactive oxygen species, NADPH-oxidase, superoxide dismutase

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-75-00060.

Сведения об авторах

Борзых Анна Анатольевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-67-15; e-mail: borzykh.anna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3763-5953>

Швецова Анастасия Алексеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

Кузьмин Илья Владимирович — канд. биол. наук, доц. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: kuzmin.ilya@gmail.com

Буравков Сергей Валентинович — докт. мед. наук, вед. науч. сотр. кафедры экстремальной и экологической медицины факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-495-932-99-04; e-mail: buravkov@fbm.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>

Гайнуллина Дина Камильевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: dina.gaynullina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5104-2399>

Тарасова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц., вед. науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ost.msu@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-3849>