

**УЧАСТИЕ iNOS В ФОРМИРОВАНИИ ТОНУСА ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ  
ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ И СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ  
ДИАБЕТЕ У КРЫС, СОДЕРЖАЩИХСЯ НА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЕ**

© 2022 г. И. Б. Соколова\*

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

*\*E-mail: SokolovaIB@infran.ru*

Поступила в редакцию 14.06.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 30.07.2022 г.

Изучали изменения опосредованной ацетилхолином (ACh) дилатации пиальных артерий сенсомоторной коры головного мозга у крыс Sprague Dawley после формирования у них метаболических и гормональных нарушений, сходных с сахарным диабетом 2-го типа. Для этого крыс 2 мес. содержали на высокожировой диете (ВЖД), а затем части животных вводили низкую дозу стрептозотина (35 мг/кг). Еще 1 мес. все животные получали корм с повышенным содержанием жира. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки оценивали реакции пиальных артерий на воздействие одного ACh ( $10^{-7}$  М) и ACh на фоне действия неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME и на воздействие селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы (iNOS) амингуанидина (AG). Установлено, что потребление высокожирового корма на протяжении 3 мес. (группа ВЖД) привело к развитию эндотелиальной дисфункции в пиальных артериях сенсомоторной коры головного мозга: число расширившихся на воздействие ACh сосудов было меньше в 1.2–1.6 раз, чем в контрольной группе. ACh-зависимая дилатация определялась реакциями с участием eNOS только в артериях диаметром менее 40 мкм. У крыс, находящихся на ВЖД, в церебральных артериях не выявили наличие iNOS. У животных, которым моделировали сахарный диабет 2-го типа (СД2) также имела место эндотелиальная дисфункция в церебральных артериях: число расширившихся на воздействие ACh сосудов было меньше в 1.6–2.3, чем в контроле. При этом сигнальный каскад с участием eNOS не контролировал реактивность артерий. Поддержание сосудистого тонуса в основном происходило за счет реакций с участием iNOS. Основные нарушения в дилататорной реакции у крыс с СД2 – наименьшее число расширившихся на воздействие ACh сосудов со значительным уменьшением степени дилатации (в 1.5–1.6 раза относительно контроля), отсутствие блокировки ACh-опосредованной дилатации на фоне L-NAME, наибольшее число констрикций при воздействии AG (60–70% от всех исследованных сосудов) – были выявлены в пиальных артериях диаметром менее 40 мкм, т.е. именно в том звене сосудистой сети, которое принимает максимальное участие в газообмене между кровью и тканью.

*Ключевые слова:* высокожировая диета, сахарный диабет 2-го типа, пиальные артерии, дисфункция эндотелия, эндотелиальная и индуцибельная NO-синтазы, ацетилхолин, дилатация

Механизмы ремоделирования сосудистого русла при метаболическом синдроме и сахарном диабете 2-го типа (СД2) к настоящему времени остаются малоизученными. Для метаболического синдрома и СД2 характерна инсулинорезистентность, а для СД2 – хроническая гипергликемия. Инсулинорезистентность развивается при нарушении обмена веществ и значительном накоплении в организме висцерального жира [1] и рассматривается как основной патогенетический механизм развития СД2 [2]. Инсулин в высокой концентрации оказывает прямое атерогенное действие на стенки сосудов, вызывая пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток, пролиферацию фибробластов, активацию системы свертывания крови, снижение активности фибринолиза [3]. В последние годы инсулинорезистентность связывают с накоплением в ткани и сосудах головного мозга  $\beta$ -амилоидного белка. Отложение  $\beta$ -амилоида было зафиксировано в стенках лептоменингеальных и кортикальных артерий, что привело к развитию воспалительной реакции как в сосудистой стенке, так и в окружающей сосудах ткани [4]. При хронической гипергликемии глюкоза вступает во взаимодействие с белками и липидами крови с образованием продуктов гликозилирования [5]. Эти соединения токсичны для клеток эндотелия сосудов. Повреждение эндотелиоцитов ведет к развитию эндотелиальной дисфункции: нарушению баланса выработки вазодилаторов/вазоконстрикторов, повышенному тромбообразованию, активации процессов воспаления [6]. При развитии тканевого воспаления экспрессируется значительное количество индуцибельной NO-синтазы (iNOS). iNOS продуцирует огромные (в 100–1000 раз больше, чем эндотелиальная и нейрональная NOS) количества NO. Поскольку высокие дозы NO токсичны для клеток, эта изоформа фермента считается патологической в отличие от конститутивной [7]. iNOS следует рассматривать как важную терапевтическую мишень, воздействуя на которую можно уменьшить ремоделирование и дегенерацию церебрального сосудистого русла у больных с метаболическим синдромом и СД2.

Цель представленного исследования выяснить на какой стадии нарушения метаболизма и в каких церебральных артериях (крупных, мелких) iNOS принимает участие в формировании сосудистого тонуса.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс Sprague Dawley ( $n = 30$ ) из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятыми Европейской конвенцией 19.07.2014 г. и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в отсутствие искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

В начале работы возраст крыс составлял 3 месяца, масса тела 300–350 г. Контрольные крысы (Группа 1,  $n = 10$ ) содержались в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и стандартному пищевому рациону. Крысы, содержащиеся на высокожировой диете (ВЖД) (Группа 2,  $n = 10$ ) и крысы, у которых моделировали сахарный диабет 2-го типа (СД2) (Группа 3,  $n = 10$ ) в течение 2 мес. получали корм с повышенным содержанием жира. ВЖД включала в себя комбикорм (370 г/кг), жир свиной (313 г/кг), казеин (253 г/кг), витаминно-минеральную смесь (61 г/кг) – 58% жира, 25% белка, 17% углеводов от общего количества калорий [8, 9]. Через 2 мес. крысам из группы 3 внутривенно был введен панкреотоксичный препарат стрептозотоцина в низкой концентрации (35 мг/кг) (Sigma-Aldrich, США). Еще 1 месяц животные из групп 2 и 3 получали ВЖД. Раз в

месяц у всех животных проводили забот крови из хвостовой вены для регистрации уровня глюкозы с помощью глюкометра Акку-Чек Актив (“Рош Диабетс Кеа ГМБХ”, Германия). Через 3 мес. крысы из всех 3 групп прошли тесты на инсулинорезистентность и толерантность к глюкозе.

Все последующие хирургические и экспериментальные действия были проведены на наркотизированных (золетил, Virbac, Франция, 20 мг/кг, внутривенно) крысах; эвтаназия проведена путем введения увеличенной дозы наркоза. Перед началом эксперимента у крыс измеряли уровень глюкозы в крови из хвостовой вены, массу тела, длину от кончика носа до анального отверстия, обхват живота. После эвтаназии у животных тщательно изымали висцеральный жир и определяли его вес. Висцеральная жировая ткань у грызунов включает в себя мезентериальную (располагается по ходу кишечника), забрюшинную (располагается за почками) и эпидимальную (располагается вдоль семенников) жировую ткань [10].

В теменной области черепа животного высверливали отверстие ( $S \approx 1 \text{ см}^2$ ), твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9; NaHCO<sub>3</sub> 15.5; MgCl<sub>2</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; глюкоза 11.5; pH 7.4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержался в медицинском водяном термостате (TW-2, SIA “ELMI”, Латвия) при температуре 37°C. На протяжении всего эксперимента контролировали среднее артериальное давление, показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне. Прямое измерение артериального давления производили через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур, <https://www.argonmedical.com>), подключенным к АЦП, входящему в состав микроконтроллера фирмы STMicroelectronics (США), выход которого был подключен к компьютеру через порт USB. Для работы устройства с компьютером в нашей лаборатории была разработана оригинальная программа визуализации значений артериального давления. Расчет среднего артериального давления в реальном времени производился программой по классической формуле:

$$P_{\text{ср}} = P_{\text{д}} + 1/3(P_{\text{с}} - P_{\text{д}}),$$

где  $P_{\text{ср}}$  – среднее артериальное давление (мм рт. ст.),  $P_{\text{с}}$  – систолическое давление (мм рт. ст.),  $P_{\text{д}}$  – диастолическое давление (мм рт. ст.).

Температуру тела животного поддерживали на уровне 38°C. Контроль за ректальной температурой осуществлялся с помощью лабораторного термометра ТТЖ-М, (ОАО “Стеклоприбор”, Украина).

Визуализацию пиальных артерий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (“Микромед”, Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scopetek, Китай) и персональный компьютер. На статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии “Photo M” (авторская разработка А. Черниговского, [http://www.t\\_lambda.chat.ru](http://www.t_lambda.chat.ru)) определяли количество артерий и общее количество микрососудов на определенной площади. Затем измеряли диаметры пиальных артерий. В ходе эксперимента у каждого животного было исследовано более 40 пиальных артерий. Диаметры артерий измеряли в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса и при орошении мозга раствором ацетилхолина (ACh) ( $10^{-7}$  М) (Sigma-Aldrich, США). Все исследованные пиальные артерии были разбиты на группы в соответствии с исходным диаметром: 60–80, 40–60, 20–40, менее 20 мкм. О результатах воздействия

ACh судили по количеству расширившихся сосудов и по степени их расширения. Степень дилатации ДД оценивали как разность между значениями диаметра после (Д2) и до (Д1) воздействия ACh относительно диаметра сосуда Д1 перед воздействием ACh, %:  $\Delta D = (D2 - D1)/D1 \times 100$ . Изменения диаметра пиальной артерии в течение 20 мин при орошении поверхности мозга раствором Кребса составляют  $\pm 5\%$ , поэтому считали, что реакция на воздействие отсутствует, если  $\Delta D$  не превышает 5% [11].

Последующий ход эксперимента: поверхность головного мозга в течение 20 мин отмывали от ACh раствором Кребса. Затем на 5 мин на пиальную оболочку нанесли раствор неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME (N( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester, Sigma-Aldrich, 100 мкМ), а затем на фоне действия L-NAME наносили ACh. В другой серии экспериментов вместо L-NAME наносили раствор аминоксидина (Aminoguanidine hydrochloride, Sigma-Aldrich,  $10^{-3}$  М), являющегося селективным ингибитором iNOS. Далее проводили описанные выше измерения.

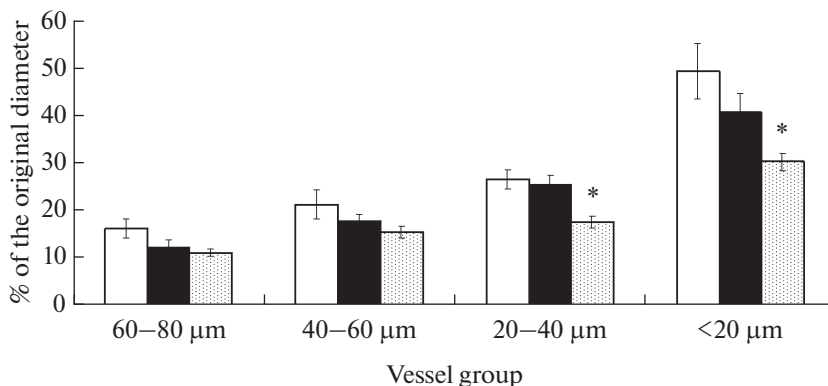
Математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 ("GraphPad Software Inc.", США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариантов в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим парным сравнением групп согласно критерию Тьюки. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования показали, что потребление высокожирового корма на протяжении 3 мес. (Группа 2, ВЖД) привело к значительному повышению удельного веса висцерального жира ( $4.41 \pm 0.42\%$  против  $2.28 \pm 0.25\%$  в контроле,  $p \leq 0.05$ ), достоверному относительно контрольной группы повышению уровня глюкозы в крови ( $10.8 \pm 0.8$  ммоль/л относительно  $5.6 \pm 0.1$  ммоль/л,  $p \leq 0.001$ ), развитию инсулинорезистентности (площадь под кривой "концентрация глюкозы в крови—время (120 мин)" была на 14% больше, чем у контрольных крыс). При этом тест на толерантность к глюкозе не выявил статистически значимой разницы между площадью под кривой "концентрация глюкозы в крови—время (120 мин)" у контрольных и ВЖД крыс, содержащихся на ВЖД. Применение панкреотоксичного препарата стрептозотоцина на фоне ВЖД (Группа 3, СД2) привело к подъему уровня глюкозы в среднем до  $16 \pm 0.9$  ммоль/л ( $p \leq 0.001$ ), формированию у животных инсулинорезистентности и толерантности к глюкозе (площадь под кривой "концентрация глюкозы в крови—время (120 мин)" была соответственно на 223 и 101% больше, чем у контрольных крыс, повышению удельного веса висцерального жира до  $5.32 \pm 0.24\%$  ( $p \leq 0.001$ ). Среднее артериальное давление у крыс ВЖД и СД2 составляло  $125.7 \pm 2$  и  $128.5 \pm 1.9$  мм рт. ст. соответственно.

ВЖД (Группа 2) привела к статистически значимому уменьшению числа пиальных артериальных сосудов, ответивших увеличением диаметра на воздействие ACh (табл. 1) — в среднем в 1.2–1.6 раза в зависимости от диаметра сосудов. У крыс с СД2 количество дилатирующих на ACh артерий было значительно меньше, чем у контрольных животных (Группа 1) (в среднем в 1.6–2.3 раза) и чем у крыс ВЖД (Группа 2) (в среднем в 1.2–1.9 раза).

У крыс ВЖД степень расширения пиальных артерий под воздействием ACh была примерно такой же, как и у животных из контрольной группы (рис. 1). В группе СД2 наблюдали статистически значимое уменьшение степени расширения артерий по сравнению с контролем у мелких сосудов (исходный диаметр менее 40 мкм).



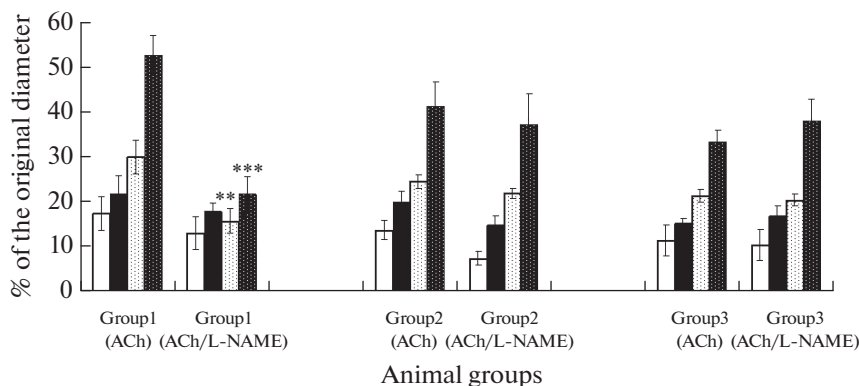
**Рис. 1.** Дилататорная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие АСh: – степень расширения сосудов (% от исходного диаметра). Светлая заливка – контрольные животные (Группа 1); темная заливка – животные ВЖД (Группа 2), штриховка – животные с СД2 (Группа 3). По оси абсцисс – группы сосудов разного диаметра; по оси ординат – степень расширения артерий на воздействие АСh (%) относительно исходного диаметра, который был принят за 100%. Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (\*  $p < 0.05$ , критерий Тьюки).

Число расширившихся пиальных артерий на АСh на фоне действия неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME в контрольной группе было снижено в 3–4 раза по сравнению с воздействием одного АСh, исключая самые крупные сосуды (табл. 1). У животных ВЖД статистически значимая разница между этими показателями была выявлена у сосудов диаметром менее 40 мкм. У животных с СД2 не наблюдали статистически значимой разницы между числом расширившихся артерий под воздействием только АСh и АСh на фоне L-NAME (за исключением артерий с исходным диаметром 60–80 мкм). В контрольной группе степень расширения пиальных артерий на воздействие АСh на фоне L-NAME по

**Таблица 1.** Число расширившихся пиальных артерий под воздействием АСh, АСh на фоне действия L-NAME и АСh на фоне действия аминоксантидина в разных группах экспериментальных животных

Группа животных	Воздействие	Число расширившихся артерий, %			
		60–80 мкм	40–60 мкм	20–40 мкм	≤ 20 мкм
Группа 1 контроль	АСh	46.4 ± 3.9	55.2 ± 2.8	64.7 ± 2.5	80.2 ± 2.3
	АСh/L-NAME	26 ± 6.7	18.7 ± 2.4***	22.3 ± 2***	20 ± 3.2***
Группа 2 ВЖД	АСh	34.1 ± 4.4*	39.7 ± 3.9**	52.5 ± 1.9***	50.7 ± 4.4***
	АСh/L-NAME	22 ± 6.3	28.4 ± 5.9	29.4 ± 1.7*	21 ± 11.3*
Группа 3 СД2	АСh	29.4 ± 5.3*	29.2 ± 3.9**	28.7 ± 4.3***	34.5 ± 4.7***
	АСh/L-NAME	10.6 ± 2.9*	24 ± 7.2	29.2 ± 6.2	33.6 ± 5.6

\* – Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , критерий Тьюки). • – Изменения значимы по сравнению с числом расширений на воздействие АСh в этой же группе животных у артерий такого же диаметра (• $p < 0.05$ , •• $p < 0.001$ , критерий Тьюки).



**Рис. 2.** Дилататорная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие ACh на фоне действия неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME: — степень расширения сосудов (% от исходного диаметра). Светлая заливка — артерии диаметром 60–80 мкм, темная заливка — артерии диаметром 40–60 мкм, темная штриховка на светлом фоне — артерии диаметром 20–40 мкм, светлая штриховка на темном фоне — артерии диаметром менее 20 мкм.

По оси абсцисс — группы сосудов разного диаметра: группа 1 — контрольные животные; группа 2 — животные ВЖД; группа 3 — животные с СД2.

По оси ординат — степень расширения артерий на воздействие ACh и ACh на фоне L-NAME (%). Изменения значимы для артерий одинакового диаметра из одной и той же группы животных (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , критерий Тьюки).

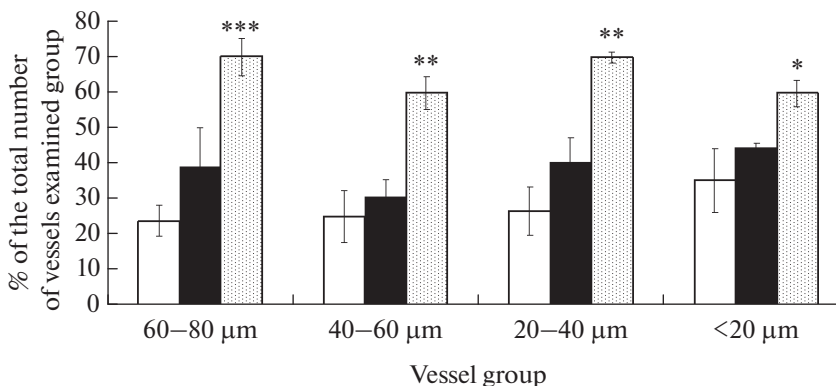
сравнению с действием одного ACh статистически значимо уменьшалась у сосудов с исходным диаметром менее 40 мкм (рис. 2). У животных ВЖД и СД2 все исследованные артерии расширялись примерно одинаково и на один ACh и на ACh на фоне действия L-NAME.

Рис. 3 иллюстрирует влияние селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы амингуанидина на пиальные артерии у животных из экспериментальных групп. Под воздействием амингуанидина у контрольных животных уменьшается диаметр примерно 1/3 всех исследованных пиальных артерий. Примерно такое же число сузившихся сосудов и в группе ВЖД. У крыс с развившемся СД2 число констрикций на амингуанидин резко возрастает и достигает 60–70%.

Амингуанидин не влияет на ACh-зависимую дилататорную реакцию пиальных артерий у животных из всех экспериментальных групп.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

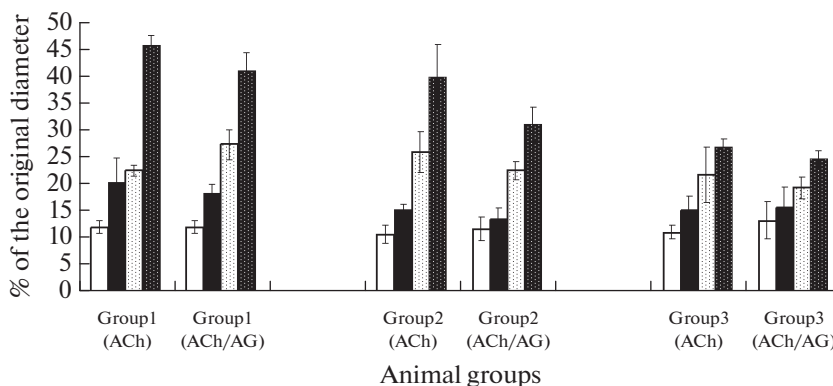
К настоящему времени патогенез сосудистых осложнений СД2 в головном мозге остается до конца не решенной проблемой. Основная роль в развитии диабетических ангиопатий отводится эндотелиальной дисфункции, которая приводит к нарушению регуляции сосудистого тонуса и ауторегуляции мозгового кровотока [12]. К эндотелиальной дисфункции ведет инсулинорезистентность, характерная и для МС и для СД2. В норме инсулин активирует фосфатил-инозитол-3-киназу в эндотелиальных клетках мелких сосудов, что приводит к экспрессии гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и высвобождению NO — инсулин-обусловленная вазодилатация [13]. Избыточный инсулин активирует митогенактивируемую протеинкиназу, которая, в свою очередь, стимулирует выработку различных ростовых факторов, запускающих пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток в стенке артерий [14]. Это приводит к повышению сосудистого тонуса и ремоделированию церебральной сосудистой системы.



**Рис. 3.** Констрикторная реакция пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие аминоксантина: — число констрикций (% от общего числа исследованных сосудов). Светлая заливка — контрольные животные (Группа 1); темная заливка — животные ВЖД (Группа 2), штриховка — животные с СД2 (Группа 3). По оси абсцисс — группы сосудов разного диаметра; по оси ординат — число сузившихся на воздействие аминоксантина артерий относительно общего числа сосудов в группе (%). Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , критерий Тьюки).

В представленном исследовании нахождение на ВЖД и развитие СД2 у крыс привело к угнетению АСh-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов (табл. 1): по сравнению с контролем у животных из Группы 2 (ВЖД) в среднем в 1.2–1.6 раза, в зависимости от диаметра сосудов, уменьшилось число дилатаций при аппликации на поверхность головного мозга АСh; в Группе 3 (СД2) — в среднем в 1.6–2.3 раза. Полученные данные подтверждают, что повреждение клеток интимы в церебральных артериях и развитие эндотелиальной дисфункции происходит и при метаболических нарушениях (ВЖД) [15] и при более серьезных гормональных патологиях (СД2) [16]. При этом в большей мере страдают мелкие артерии диаметром менее 40 мкм, у которых уменьшается и число дилатаций и степень расширения сосудов (рис. 1).

В нормальных условиях АСh, связываясь с мускариновыми рецепторами эндотелиальных клеток, запускает реакцию окисления аминокислоты L-аргинина с образованием NO и L-цитрулина. Катализатором данного процесса выступает eNOS. Применение блокатора NOS L-NAME у контрольных животных привело к уменьшению числа дилатирующих на воздействие АСh артерий в 2–4 раза (табл. 1) и уменьшению степени расширения сосудов с исходным диаметром 20–40 мкм и менее 20 мкм на 11 и 20% соответственно (рис. 2). В группе животных ВЖД статистически значимое уменьшение числа дилатаций на АСh на фоне действия L-NAME было отмечено у сосудов диаметром менее 40 мкм (табл. 1). У более крупных артерий число дилатаций статистически значимо не изменялось, как не изменялась и степень расширения всех исследованных сосудов у крыс ВЖД. Это свидетельствует о незначительной роли каскада L-аргинина/eNOS/NO в сосудистой регуляции пиальных артерий. У крыс с СД2 применение L-NAME не вызвало статистически значимых изменений в АСh-опосредованной дилатации ни по числу расширившихся артерий (табл. 1), ни по степени их расширения (рис. 2). Отсутствие реакции на воздействие L-NAME объяснить достаточно сложно, хотя такие экспериментальные наблюдения у животных с СД отмечены в литературе [17, 18]. При гипергликемии активируется протеинкиназа С, окислительный стресс и метаболизм гексозаминов, что приводит к понижению экспрессии/активности eNOS [19].



**Рис. 4.** Дилататорная реакция пимальных артерий различных диаметров на воздействие ACh на фоне действия селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы амингуанидина: — степень расширения сосудов (% от исходного диаметра). Светлая заливка — артерии диаметром 60–80 мкм, темная заливка — артерии диаметром 40–60 мкм, темная штриховка на светлом фоне — артерии диаметром 20–40 мкм, светлая штриховка на темном фоне — артерии диаметром менее 20 мкм.

По оси абсцисс — группы сосудов разного диаметра: группа 1 — контрольные животные; группа 2 — животные ВЖД; группа 3 — животные с СД2.

По оси ординат — степень расширения артерий на воздействие ACh и ACh на фоне L-NAME (%). Значимых изменений для артерий одинакового диаметра из одной и той же группы животных не выявлено.

Показано, что инсулинорезистентность понижала уровень eNOS на эндотелиальных клетках на 60% по сравнению с контролем [20]. Также уменьшение количества eNOS происходит из-за увеличения продукции активных форм кислорода [21]. Следовательно, при СД2 уровень eNOS понижен и реакция ингибирования этого фермента с помощью L-NAME мало выражена. Можно предположить, что при наличии ярко выраженной эндотелиальной дисфункции у крыс с СД2, особенно в мелких артериях, каскад L-аргинина/eNOS/NO в эндотелиальных клетках принимает незначительное участие в формировании дилататорного ответа на ACh.

При СД2 отмечено повышение экспрессии iNOS в головном мозге (в макрофагах, ГМК, нейронах, глии) [7]. Отсутствие ингибирования iNOS неселективным блокатором L-NAME отмечено и в литературе [18, 22] именно при СД или при аллергических реакциях [23]. Авторы предполагают, что при развитии тканевого воспаления с выделением большого количества iNOS обычных концентраций раствора L-NAME (100 мкМ), который применяется для работы с контрольными животными, не хватает для того, чтобы заблокировать всю iNOS. Вероятно, из-за совокупности этих факторов в представленной работе и не было выявлено реакции L-NAME на эндотелий-зависимую дилатацию церебральных артерий у животных с СД2.

Роль iNOS в формировании сосудистого тонуса мозговых артерий у крыс ВЖД и СД2 изучена недостаточно. В немногочисленных работах показано, что iNOS может влиять на тонус и проницаемость церебральных сосудов [24, 25]. Ингибирование активности iNOS селективным блокатором амингуанидином у крыс из контрольной группы вызвало минимальную констрикторную реакцию (рис. 3). Следовательно, реакции с iNOS у контрольных животных не принимают участие в формировании и поддержании сосудистого тонуса в головном мозге. Отсутствие влияния амингуанидина на степени расширения артерий при воздействии ACh (рис. 4) демонстрировало только то, что селективный блокатор iNOS не вызывает отрицательной реакции по ингибированию eNOS у контрольных животных. У крыс из Группы 2 (ВЖД) также не выявлено значимого констрикторного ответа



на воздействие амингуанидина (рис. 3) и уменьшение степени ACh-опосредованной дилатации (рис. 4). Потенциально селективные ингибиторы iNOS могут быть использованы в качестве терапевтического средства, предотвращающего чрезмерную выработку NO при метаболическом синдроме и СД [18, 22].

У крыс с СД2 на воздействие амингуанидина сужением ответило 60–70% всех исследованных пиальных артерий (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что именно реакции с участием iNOS контролируют сосудистый тонус церебральных артерий у животных с СД2 и не затрагивают сигнальный путь L-аргинина/eNOS/NO в эндотелиальных клетках (рис. 4), что также указывает на возможность использования селективных блокаторов iNOS в терапевтических целях при СД2.

Итак, потребление в течение 3 месяцев корма с высоким содержанием жира привело к развитию эндотелиальной дисфункции в пиальных артериях сенсомоторной коры головного мозга. ACh-опосредованная дилатация определялась реакциями с участием eNOS в артериях диаметром менее 40 мкм. У крыс, находящихся только на высокожировой диете, в церебральных артериях не выявили наличия iNOS.

Повышение уровня глюкозы в крови животных с СД2 приводило к прогрессированию эндотелиальной дисфункции: число расширившихся на воздействие ACh сосудов было меньше в 1.2–1.9 раза, чем у животных на ВЖД. При этом сигнальный каскад с участием eNOS не контролировал реактивность артерий. Поддержание сосудистого тонуса в основном происходило за счет реакций с участием iNOS. Основные нарушения в дилататорной реакции у крыс с СД2 – наименьшее число расширившихся на воздействие чистого ACh сосудов со значительным уменьшением степени дилатации (в 1.5–1.6 раза относительно контроля), отсутствие блокировки ACh-опосредованной дилатации на фоне L-NAME, наибольшее число констрикций при воздействии амингуанидина (60–70% от всех исследованных сосудов) – были выявлены в пиальных артериях диаметром менее 40 мкм, т.е. именно в том звене сосудистой сети, которое принимает максимальное участие в газообмене между кровью и тканью.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источник финансирования – госбюджет. Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47\_110\_ДРиОК, раздел 64.1)

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

И.Б.С. – идея работы и планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U* (2007) Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(11): 2276–2283.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147835>
2. *Yang Q, Vijayakumar A, Kahn B* (2018) Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(10): 654–672.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0044-8>
3. *Begum N* (2003) Insulin signaling in the vasculature. *Front Biosci* 8: s796–804.  
<https://doi.org/10.2741/1146>

4. Weber S, Patel R, Lutsep H (2018) Cerebral amyloid angiopathy: diagnosis and potential therapies. *Expert Rev Neurother* 18(6): 503–513.  
<https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1480938>
5. Madonna R, Balistreri C, Geng Y, Caterina R (2017) Diabetic microangiopathy: pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascular Pharmacol* 90: 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.01.004>
6. Shi Y, Vanhoutte P (2017) Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes* 9: 434–449.  
<https://doi.org/10.1111/1753-0407.12521>
7. Elhessy H, Eltahry H, Erfan O, Mahdi M, Hazem N, El-Shahat M (2020) Evaluation of the modulation of nitric oxide synthase expression in cerebellum of diabetic albino rats and the possible protective effect of ferulic acid. *Acta Histochem* 122(8): 151633.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151633>
8. Кайдаш ОА, Иванов ВВ, Венгеровский АИ, Буйко ЕЕ, Щепеткин ИА (2020) Экспериментальная модель сахарного диабета 2-го типа у крыс, вызванная диетой с высоким содержанием жиров и стрептозотоцином в низкой дозе. *Бюл сибирск мед* 19(2): 41–47. [Kaidash OA, Ivanov VV, Vengerovsky AI, Buyko EE, Schepetkin IA (2020) The experimental model of type 2 diabetes mellitus caused by a high-fat diet with low-dose streptozotocin in rats. *Bull Siber Med* 19(2): 41–47. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-41-47>
9. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul C, Ramarao P (2005) Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 52: 313–320.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.05.004>
10. Якимов ИЮ, Бородин ДА, Подрезов ИК, Иванов ВВ, Васильев ВН, Котловский МЮ, Борисов ЛВ, Милто ИВ (2015) Морфометрические параметры белой жировой ткани разной локализации у крыс при высокожировой диете. *Совр пробл науки и образов* 5. [Yakimovich IY, Borodin DA, Podrezov IK, Ivanov VV, Vasilyev VN, Kotlovsky MY, Borisova LV, Milto IV (2015) White adipose tissue morphometric characteristics in hi-fat diet rats. *Modern Probl Sci Educat* 5. (In Russ)].
11. Шуваева ВН, Горшкова ОП (2021) Возрастные изменения вклада NO и калиевых каналов в дилатацию пиальных артериальных сосудов у крыс. *Рос физиол журн им И М Сеченова* 107(11): 1440–1452. [Shuvaeva VN, Gorshkova OP (2021) Age Changes in the Contribution of NO and Potassium Channels to the Dilatation of the Pial Arterial Vessels in Rats. *Russ J Physiol* 107(11): 1440–1452. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0869813921110091>
12. Domingueti C, Dusse L, Carvalho M, Sousa L, Gomes K, Fernandes A (2016). Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complicat* 30: 738–745.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.12.018>
13. Haratz S, Tanne D (2011) Diabetes, hyperglycemia and the management of cerebrovascular disease. *Current Opinion Neurol* 24(1): 81–88.  
<https://doi.org/10.1097/WCO.0bo13e3283418fed>
14. Ding Y, Vaziri N, Coulson R, Kamanna V, Roh D (2000) Effects of stimulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(1): E11–E17.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.1.E11>
15. Arshad N, Lin T, Yahaya M (2018) Metabolic syndrome and its effect on the brain: possible mechanism. *CNS Neurol Disord Drug Target* 17(8): 595–603.  
<https://doi.org/10.2174/1871527317666180724143258>
16. Zhou H, Zhang X, Lu J (2014) Progress on diabetic cerebrovascular diseases. *Bosn J Basic Med Sci* 14(4): 185–190.  
<https://doi.org/10.17305/bjbm.2014.4.203>
17. Hein T, Omae T, Xu W, Yoshida A, Kuo L (2020) Role of arginase in selective impairment of endothelium-dependent nitric oxide synthase-mediated dilation of retinal arterioles during early diabetes. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 61(5): 36.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.61.5.36>
18. Kadoi Y, Goto F (2007) Effect of selective iNOS inhibition on systemic hemodynamics and mortality rate on endotoxemic shock in streptozotocin-induced diabetic rats. *Shock* 28(5): 602–609.  
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31804d452d>
19. Toda N, Imamura T, Okamura T (2010) Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther* 127(3): 189–209.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.009>
20. Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher S, Kisanuki Y, Bursell S, Yanagisawa M, King G, Kahn C (2003) The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and

- insulin resistance. *J Clin Invest* 111: 1373–1380.  
<https://doi.org/10.1172/JCI15211>
21. *Фатеева ВВ, Воробьева ОВ* (2017) Оксид азота: от механизма действия к фармакологическим эффектам при цереброваскулярных заболеваниях. *Журн неврол психиатрии им СС Корсакова* 117(10): 131–135. [*Fateeva VV, Vorob'eva OV* (2017) Nitric oxide: from the mechanism of action to pharmacological effects in cerebrovascular diseases. *Zhurn Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova* 117(10): 131–135. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.17116/jnevro2017117101131-135>
  22. *Strunk V, Hahnenkamp K, Schneuing M, Schneuing M, Fischer L, Rich G* (2001) Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth Anal* 92: 681–687.  
<https://doi.org/10.1213/00000539-200103000-00025>
  23. *Antosova M, Strapkova A, Mikolka P, Mokry J, Medvedova I, Mokra D* (2015) The influence of L-NAME on iNOS expression and markers of oxidative stress in allergen-induced airway hyperreactivity. *Advx Exp Med Biol—Neurosci Respirat* 7: 1–10.  
[https://doi.org/10.1007/5584\\_2014\\_62](https://doi.org/10.1007/5584_2014_62)
  24. *Nassi A, Malorgio F, Tedesco S, Cignarella A, Gaion R* (2016) Upregulation of inducible NO synthase by exogenous adenosine in vascular smooth muscle cells activated by inflammatory stimuli in experimental diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 15: 32.  
<https://doi.org/10.1186/s12933-016-0349-x>
  25. *Barrett E, Liu Z, Khamaisi M, King G, Klein R, Klein B, Hughes T, Craft S, Freedman B, Bowden D, Vinik A, Casellini C* (2017) Diabetic microvascular disease: an endocrine society scientific statement. *J Clin Endocrinol Metab* 102(12): 4343–4410.

## Participation of iNOS in the Formation of Pial Arteries Tone in Metabolic Disorders and Streptozotocin Diabetes in Rats Kept on a High-Fat Diet

I. B. Sokolova\*

*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

\*e-mail: [SokolovaIB@infran.ru](mailto:SokolovaIB@infran.ru)

Changes in acetylcholine (ACh)-mediated dilatation of the pial arteries of the sensorimotor cortex of the brain in Sprague Dawley rats after the developing of metabolic and hormonal disorders similar to type 2 diabetes mellitus were studied. The rats were kept on a high-fat diet for 2 months, and then some of the animals were injected with a low dose of streptozotocin (35 mg/kg). Then, all animals were fed with a high-fat food, for another 1 month. The effects of pure ACh ( $10^{-7}$  M), or ACh against the background of the action of the non-selective blocker of NO synthase L-NAME, or ACh against the background of the action of the selective blocker of inducible NO synthase (iNOS) aminoguanidine (AG) were evaluated using the method of intravital microphotography. We found that the consumption of high-fat food for 3 months in (HFD group) led to the development of endothelial dysfunction (ED) in the pial arteries of the sensorimotor cortex of the brain; the number of vessels expanded to the effect of ACh in HFD group was 1.2–1.6 times less than in the control group. ACh-dependent dilatation depends on eNOS only in arteries with a diameter of less than 40  $\mu$ m. The presence of iNOS was not detected in the cerebral arteries in rats kept on HFD. Animals from T2D modeling group also developed ED in the cerebral arteries; the number of vessels expanded to the effect of ACh was 1.6–2.3 less than in the control group. In T2D group, the signaling cascade involving eNOS did not control arterial reactivity. Vascular tone maintenance was mainly due to reactions involving iNOS. The main disorders of the dilator reaction in rats with T2D, i.e. the smallest number of blood vessels dilated in response to pure ACh with a significant decrease in the degree of dilatation (by 1.5–1.6 times relative to control), the absence of blocking of ACh-mediated dilatation against the background of L-NAME, the greatest the number of constrictions in response to AG (60–70% of all examined vessels), were detected in pial arteries with a diameter of less than 40  $\mu$ m, i.e., in that part of the vascular network that takes the maximum part in gas exchange between blood and tissue.

**Keywords:** high-fat diet, type 2 diabetes mellitus, pial vessels, endothelial dysfunction, endothelial and inducible NO-synthases, acetylcholine, dilatation