

УДК 616-092.6

DOI 10.17802/2306-1278-2025-14-2-110-126

СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ МОНООКСИДА АЗОТА У ГИПЕР- И НОРМОТЕНЗИВНЫХ КРЫС

**Л.А. Богданов, Е.А. Кондратьев, В.А. Кошелев, Р.А. Мухамадияров, А.Ю. Каноныкина,
А.И. Лазебная, А.Е. Тюрина, А.Г. Кутихин**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Эндотелий интимы аорты и периаортальной жировой ткани имеет различный профиль распределения фосфорилированных форм eNOS.
- Эндотелий интимы аорты гипертензивных крыс линии НИСАГ характеризуется повышением экспрессии форм eNOS с активирующим фосфорилированием, а эндотелий микрососудов периаортальной жировой ткани – повышением экспрессии форм eNOS с ингибирующим фосфорилированием.
- Эндотелий микрососудов периаортальной жировой ткани имеет более высокую экспрессию общей фракции eNOS и ее фосфорилированных форм в сравнении с эндотелием интимы аорты.

Цель

Изучить экспрессию эндотелиальной синтазы монооксида азота (eNOS) и ее модифицированных форм в эндотелии интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани гипер- и нормотензивных крыс.

Материалы и методы

В исследование были включены самцы гипертензивных крыс линии НИСАГ (n = 12) и нормотензивных крыс линии Wistar (n = 12) в возрасте 4 мес. После подготовки криосрезов нисходящей аорты проводили иммуногистохимическое окрашивание различными антителами к eNOS и фосфорилированным формам eNOS (Ser117, Thr495, Ser632, Ser1177). После оцифровки препаратов на слайд-сканере выполняли полуколичественный анализ интенсивности иммуногистохимического сигнала в эндотелии интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани в программе ImageJ. Статистический анализ проводили при помощи критерия Манна – Уитни (при сравнении экспрессии в эндотелии гипер- и нормотензивных крыс) и критерия Уилкоксона (при сравнении экспрессии в эндотелии интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани).

Результаты

Эндотелий интимы аорты и периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ характеризовался тенденцией повышения экспрессии общей фракции eNOS независимо от применяемого антитела (хотя паттерн окрашивания при использовании различных антител несколько отличался). В эндотелии интимы аорты гипертензивных крыс отмечено статистически значимое повышение экспрессии форм eNOS, фосфорилированных в позициях Ser632 и Ser1177 (активирующее фосфорилирование), а в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани – статистически значимое повышение экспрессии общей фракции eNOS (при оценке одним из антител) и форм eNOS, фосфорилированных в позициях Ser117, Thr495 (ингибирующее фосфорилирование) и Ser632 (активирующее фосфорилирование). Экспрессия общей фракции eNOS и всех ее фосфорилированных форм в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани была статистически значимо выше, чем в эндотелии интимы аорты.

Заключение

В сравнении с нормотензивными крысами Wistar гипертензивные крысы НИСАГ характеризовались повышением экспрессии различных фосфорилированных форм eNOS в эндотелии интимы аорты (где преобладали формы, повышающие активность eNOS) и эндотелии микрососудов периаортальной

Для корреспонденции: Лев Александрович Богданов, bogdanovleone@gmail.com; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Leo A. Bogdanov, bogdanovleone@gmail.com; 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

жировой ткани (где преобладали формы, снижающие активность eNOS). В сравнении с эндотелием интимы аорты эндотелий микрососудов периаортальной жировой ткани демонстрировал повышенную экспрессию как общей фракции eNOS, так и ее фосфорилированных форм.

Ключевые слова

Артериальная гипертензия • Эндотелиальные клетки • Дисфункция эндотелия • Гипертензивные крысы • Нормотензивные крысы • Эндотелиальная NO-синтаза • Фосфорилирование eNOS

Поступила в редакцию: 13.02.2025; поступила после доработки: 02.03.2025; принята к печати: 14.04.2025

COMPARISON OF MODIFIED ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE FORMS IN HYPERTENSIVE AND NORMOTENSIVE RATS

L.A. Bogdanov, E.A. Kondratiev, V.A. Koshelev, R.A. Mukhamadiyarov, A.Yu. Kanonykina, A.I. Lazebnaya, A.E. Tyurina, A.G. Kutikhin

Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- Aortic endothelial cells and perivascular endothelial cells have distinct distribution of phosphorylated forms of endothelial nitric oxide synthase (eNOS)
- In hypertensive rats, aortic endothelial cells have increased levels of activated eNOS (Ser632 and Ser1177) whilst perivascular endothelial cells have elevated levels of inhibited eNOS (Ser117 and Thr495).
- Perivascular endothelial cells have increased levels of total and phosphorylated eNOS in comparison with aortic endothelial cells.

Aim To study the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its modified forms in the aortic endothelial cells and perivascular endothelial cells in hypertensive and normotensive rats.

Methods The study included 12 male hypertensive ISIAH rats and 12 male normotensive Wistar rats at the 4 months of age. Following the cryosectioning, we performed an immunohistochemical staining of descending aorta using different antibodies to total eNOS and to phosphorylated eNOS (Ser117, Thr495, Ser632, Ser1177). Next, we scanned the whole slide images and conducted a semi-quantitative analysis of immunohistochemical signal in the aortic endothelial cells and perivascular endothelial cells using ImageJ software. Statistical analysis was carried out by Mann–Whitney U-test (when comparing eNOS expression in the endothelium of hypertensive and normotensive rats) and Wilcoxon matched-pairs signed-rank test (when comparing eNOS expression in the aortic endothelial cells and perivascular endothelial cells).

Results Aortic endothelial cells and perivascular endothelial cells of hypertensive rats tended to the increase in total eNOS regardless of the antibody, although the staining pattern differed across the antibodies. Aortic endothelial cells of hypertensive rats had higher expression of eNOS phosphorylated at Ser632 and Ser1177 sites (activating phosphorylation) whereas perivascular endothelial cells displayed elevated levels of eNOS phosphorylated at Ser117 and Thr495 (inhibiting phosphorylation) and Ser632 (activating phosphorylation). Expression of total and phosphorylated eNOS in perivascular endothelial cells was significantly higher than in the aortic endothelial cells.

Conclusion In comparison with normotensive Wistar rats, hypertensive ISIAH rats are characterised by an increased expression of activated eNOS in the aortic endothelial cells (Ser632 and Ser1177 phosphorylation) and by an elevated expression of inhibited eNOS (Ser117 and Thr395 phosphorylation) in the perivascular endothelial cells. Perivascular endothelial cells have a higher expression of total and phosphorylated eNOS than aortic endothelial cells.

Keywords

Arterial hypertension • Endothelial cells • Endothelial dysfunction • Hypertensive rats • Normotensive rats • Endothelial nitric oxide synthase • eNOS phosphorylation

*Received: 13.02.2025; received in revised form: 02.03.2025; accepted: 14.04.2025***Список сокращений**

ЭК – эндотелиальные клетки

NO – монооксид азота

eNOS – эндотелиальная синтаза монооксида азота

Введение

Дисфункция эндотелия представляет собой типовой патологический процесс, характеризующийся нарушением вазоактивности или потерей атробогенности эндотелиальных клеток (ЭК) и/или их провоспалительной активацией [1, 2]. Важность роли дисфункции ЭК в патологической физиологии объясняется: 1) их непосредственным контактом с циркулирующей кровью; 2) незаменимостью для формирования новых кровеносных и лимфатических сосудов (ангио- и лимфангиогенеза); 3) чрезвычайно большим количеством ЭК (по различным оценкам, от 1 до 60 триллионов), обуславливающим значительное количество выделяемых ими молекул; 4) широким спектром ангиокринных молекул, выделяемых в местный и системный кровоток и непосредственно влияющих на определяемый гладкомышечными клетками сосудистый тонус и функционирование других внутренних органов (к примеру, почек и печени); 5) связи провоспалительных цитокинов с развитием хронического низкоинтенсивного стерильного системного воспаления, являющегося одной из биохимических основ патологического старения организма (несоответствия биологического возраста хронологическому) и синдрома старческой астении [1, 2].

Диагностика дисфункции эндотелия может осуществляться при помощи двух подходов. Первый из них основан на применении циркулирующих маркеров, предоставляющих возможность неинвазивной детекции в сыворотке крови пациентов с различными патологиями при помощи рутинного иммуноферментного анализа, но требующих при этом масштабной валидации (то есть определения чувствительности и специфичности) в различных клинических сценариях [3]. Второй подход основан на использовании внутриклеточных маркеров, обладающих наивысшей степенью специфичности в силу возможности прямой иммуногистохимической детекции и имеющих потенциальную ценность при моделировании различных патологических процессов на лабораторных животных, а также при доклинических испытаниях эффективности фармакологических вмешательств [4].

Классическим фенотипом дисфункции эндотелия является вазоспастическая дисфункция, при ко-

торой происходит нарушение баланса между выделяемыми ЭК в системный кровоток вазоконстрикторами и вазодилататорами, что приводит к развитию вазоспастической дисфункции эндотелия [5], сопровождается повышением сосудистого тонуса и развитием артериальной гипертензии [6, 7] и в конечном счете способствует развитию атеросклероза [8]. Одним из наиболее мощных вазодилататоров является монооксид азота (NO), синтезируемый из L-аргинина и молекулярного кислорода (O₂) эндотелиальной синтазой монооксида азота (eNOS) при участии NADPH и тетрагидробиоптерина [9]. Активность данной химической реакции в значительной степени определяется посттрансляционными модификациями eNOS [10, 11]. Фосфорилирование eNOS в различных сайтах способно активировать (Ser632 [12] и Ser1177 [13, 14]) или ингибировать активность этого фермента (Ser117 [15–17] и Thr495 [13, 14]), что приводит к увеличению или уменьшению биосинтеза NO соответственно. С учетом значимости этого процесса для адекватной вазодилатации и физиологического функционирования эндотелия и общий уровень eNOS, и уровень ее фосфорилированных форм (в том числе относительное содержание форм с активирующими и форм с ингибирующими фосфорилированными формами) могут быть рассмотрены в качестве непосредственных маркеров вазоспастической дисфункции эндотелия при прямом иммуногистохимическом окрашивании.

Следует отметить, что в стандартных статических условиях культивирования *in vitro* культуры ЭК характеризуются невысокой экспрессией eNOS и кодирующего этот фермент гена NOS3 [18]. *In vivo* экспрессия eNOS в значительной степени определяется типом и скоростью потока [19, 20], что позволяет предположить определенные различия в регуляции активности eNOS в макро- и микрососудистом эндотелии (в том числе за счет различного соотношения фосфорилированных форм). Помимо биомеханических параметров экспрессия eNOS также определяется полом [21], возрастом [22] и массой тела [23], что требует учитывать эти параметры при моделировании различных патологических процессов и при тестировании безопасности и эффективности фармакологических вмешательств, направленных на коррекцию артериального давления.

Целью данного исследования было сравнительное иммуногистохимическое исследование экспрессии общей фракции eNOS и ее фосфорилированных форм (ингибирующих фосфорилирование модификаций Ser117, Thr495 и активирующих фосфорилирование модификаций Ser632 и Ser1177) в эндотелии аорты и периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar, идентичных по полу, возрасту и массе тела.

Материалы и методы

Для иммуногистохимического анализа нормального и дисфункционального эндотелия использованы нисходящие сегменты аорты, извлеченные из 12 гипертензивных самцов крыс линии НИСАГ (масса тела ~300 г, возраст ~4 мес.), полученных из вивария ИЦиГ СО РАН, и 12 нормотензивных самцов крыс линии Wistar (масса тела ~300 г, возраст ~4 мес.), полученных из вивария отдела экспериментальной медицины НИИ КПССЗ. Животные были распределены по полипропиленовым клеткам (по две крысы в клетке, крысы разных линий содержались отдельно), клетки были выстланы деревянной щепой. Животные имели неограниченный доступ к воде и пище. В течение всего времени эксперимента поддерживали стандартные условия температурного режима ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), относительную влажность ($55 \pm 10\%$) и 12-часовые циклы смены света и темноты. Контроль состояния здоровья всех крыс проводили ежедневно. Показатели систолического артериального давления у крыс линии НИСАГ представлены в *таблице*. У крыс линии Wistar систолическое артериальное давление не измеряли.

Исследование выполнено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол заседания ЛЭК № 7 от 16.09.2024).

Образцы нисходящей аорты крыс обеих линий были получены после эвтаназии животных с применением углекислого газа (CO_2). Иссеченную аорту немедленно замораживали в цилиндрических формах, заполненных матричной средой для криотомии Tissue-Tek (4583, Sakura, Япония), путем погружения в сосуд Дьюара с жидким азотом. До востребования образцы хранили в морозильной камере при -80°C . Серийные криосрезы (по 25 предметных стекол в серии) толщиной 3 мкм, равномерно распределенные по всей длине извле-

ченного нисходящего сегмента аорты (по 8 срезов на стекло), готовили с использованием криотома CryoStar NX50 (Thermo Fisher Scientific, США). До этапа окрашивания стекла с криосрезами хранили в пластиковых контейнерах при -80°C (то есть в условиях хранения цельных сегментов тканей до подготовки криосрезов).

Для иммуногистохимического окрашивания срезы нисходящего отдела аорты фиксировали и пермеабелизировали в ледяном ацетоне (-20°C) в течение 10 мин, затем высушивали на воздухе в течение 10 мин и промывали в трех сменах фосфатно-солевого буфера (В-60201, ООО «Компания Пущинские лаборатории», Россия) с pH 7,4. После этого срезы подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с использованием набора Novolink Polymer Detection System (RE7150-CE, Leica Biosystems, Германия) согласно протоколу производителя:

1. Блокировали эндогенную пероксидазу путем инкубации срезов в реактиве из набора Peroxidase Block в течение 5 мин во влажной закрытой камере при комнатной температуре.

2. Промывали срезы в двух сменах фосфатно-солевого буфера с pH 7,4.

3. Проводили блокировку неспецифического связывания антител с использованием реактива из набора Protein Block в течение часа во влажной закрытой камере при комнатной температуре.

4. В качестве первичных антител использовали кроличьи антитела компаний Sunlong Biotech (КНР), ABclonal Biotechnology (КНР) и Thermo Fisher Scientific (США), разведенные в 1% фосфатно-солевом растворе с pH 7,4 бычьего сывороточного альбумина (P091E, НПП «ПанЭко», Россия). Указанные антитела таргетировали эндотелиальную NO-синтазу (eNOS, SL20608R, разведение 1:100; PA3031A, 1:100; A20985, 1:50), а также фосфорилированные формы эндотелиальной NO-синтазы в позициях серин-117 (SL13072R, 1:100), треонин-495 (SL3731R, 1:100), серин-632 (SL13074R, 1:100) и серин-1177 (SL3447R, 1:100). Инкубацию срезов с первичными антителами проводили в течение 16 ч во влажной закрытой камере в холодильнике при $+4^\circ\text{C}$.

5. Промывали срезы в трех сменах фосфатно-солевого буфера с pH 7,4.

6. Выполняли инкубацию срезов с реактивом из набора Novolink Polymer, содержащим вторичные антитела против кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, в течение часа во влажной закрытой камере при комнатной температуре.

Показатели систолического артериального давления у крыс линии НИСАГ, измеренные методом хвостовой плетизмографии
Systolic blood pressure values in ISIAH rats assessed using tail-cuff plethysmography

Крысы НИСАГ / ISIAH rats	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11	№ 12
Систолическое артериальное давление / Systolic blood pressure	181	188	203	189	180	204	173	176	173	171	175	179

7. Промывали срезы в трех сменах фосфатно-солевого буфера с pH 7,4.

8. Проводили инкубацию в 0,087% растворе 3,3'-диаминобензидина из набора в течение 2 мин.

9. Промывали срезы в бидистиллированной воде в течение 5 мин.

10. Контрастировали ядра гематоксилином Джилла (05-002, ООО «ЭргоПродакшн», Россия) в течение 10 мин.

11. Проводили подсинение срезов в проточной водопроводной воде в течение 5 мин.

12. Срезы обезвоживали в трех сменах 95% этанола путем многократного погружения.

13. Препараты просветляли в заменителе ксилола на основе лимонена (X0053, Diapath, Италия) в течение 3 мин.

14. Срезы заключали под покровное стекло в монтирующую среду на основе лимонена (030400, Diapath, Италия).

Готовые микропрепараты были оцифрованы с использованием сканирующего устройства для предметных стекол Leica Aperio AT2 (Leica Biosystems, Германия) при стандартных настройках и увеличении $\times 200$. Полученные цифровые изображения были сегментированы на отдельные фрагменты (обзорный снимок аорты, снимки эндотелия интимы аорты на увеличениях $\times 200$ и $\times 600$ и снимки эндотелия периаортальной жировой ткани на увеличениях $\times 200$ и $\times 600$) с использованием программного обеспечения SlideViewer (3DHISTECH, Венгрия). Для полуколичественного анализа интенсивности положительного хромогенного сигнала в эндотелии интимы аорты и эндотелии периаортальной жировой ткани использовали программное обеспечение ImageJ (National Institutes of Health, США). Области, содержащие эндотелий, размечали вручную; далее выполняли бинаризацию с использованием плагина Colour Deconvolution, что позволяло выделить соответствующий окрашиванию 3,3'-диаминобензидином сигнал. Затем с помощью инструмента Threshold вручную устанавливали минимальный порог интенсивности хромогенного сигнала. В качестве основного анализируемого параметра использовали среднюю интенсивность (mean).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). С учетом относительно малого числа наблюдений (не превышающего 24) распределение во всех случаях было принято отличным от нормального, вследствие чего в исследовании были применены исключительно критерии непараметрической статистики. Данные были представлены в виде медианы, межквартильного интервала (25-го и 75-го процентилей), а также минимального и максимального значений. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Манна – Уитни (для неза-

висимых групп) и критерия Уилкоксона (для парных измерений). Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

При анализе экспрессии общей фракции eNOS у гипертензивных крыс НИСАГ в сравнении с нормотензивными крысами Wistar выявлено незначительное повышение экспрессии данного фермента в эндотелии интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани (рис. 1–6), которое достигло статистической значимости лишь при анализе эндотелия микрососудов периаортальной жировой ткани и лишь при использовании антитела PA30312A (Thermo Fisher Scientific (США), $p = 0,0205$, рис. 3, 4). Экспрессия eNOS была статистически значимо выше в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани по сравнению с эндотелием интимы аорты при окрашивании двумя ан-

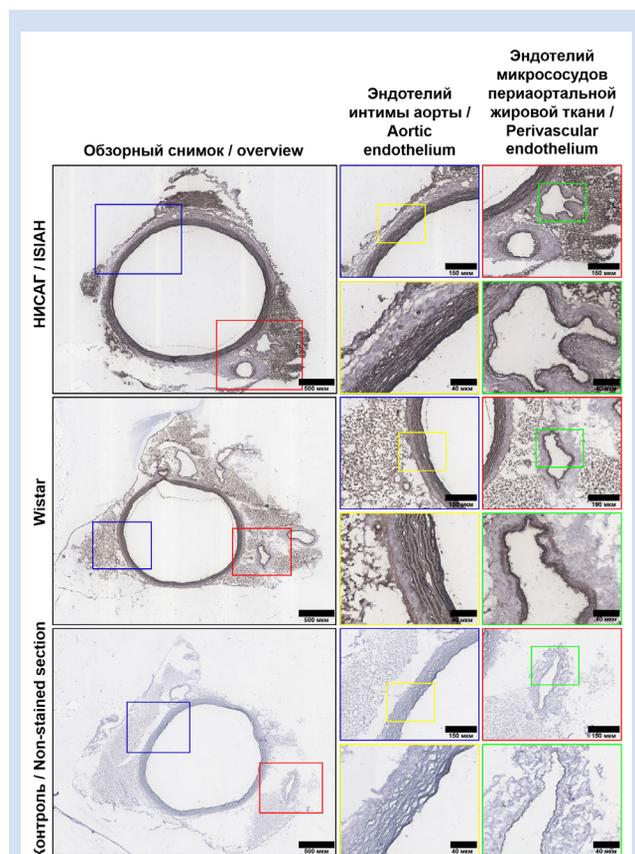


Рисунок 1. Иммуногистохимическое окрашивание аорты гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar для выявления эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в эндотелиальных клетках интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани с использованием антитела к eNOS (A20985, ABclonal Biotechnology) с дополнительным контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Репрезентативные изображения

Figure 1. Immunohistochemical staining of the aorta of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats to detect total endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in aortic and perivascular endothelial cells using the respective antibody (A20985, ABclonal Biotechnology). Nuclei are counterstained using Gill's hematoxylin. Representative images

тителами из трех (A20985, ABclonal Biotechnology (США), $p = 0,0425$, рис. 1, 2; PA30312A, Thermo Fisher Scientific (США), $p = 0,0035$, рис. 3, 4), при этом при окрашивании третьим антителом (SL20608R, Sunlong Biotech, КНР) данная тенденция также наблюдалась, однако статистической значимости не достигала ($p = 0,111$, рис. 5, 6).

Далее определена экспрессия различных фосфорилированных форм eNOS. При анализе фосфорилирования eNOS по сайтам, ингибирующим активность данного фермента (Ser117 и Thr495), у гипертензивных крыс НИСАГ в сравнении с нормотензивными крысами Wistar было выявлено повышение экспрессии фосфорилированной в позиции серин-117 формы eNOS в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани ($p = 0,4449$, рис. 7, 8) и в среднем в эндотелии интимы аорты

и микрососудов периаортальной жировой ткани ($p = 0,0242$, см. рис. 7, 8), хотя отдельно в эндотелии интимы аорты данное увеличение не достигло статистической значимости ($p = 0,178$, см. рис. 7, 8). Кроме того, в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ наблюдалось повышение экспрессии фосфорилированной в позиции Thr495 формы eNOS ($p = 0,0145$), однако данное наблюдение не было характерным для эндотелия интимы аорты ($p = 0,755$). Эндотелий микрососудов периаортальной жировой ткани характеризовался устойчивым повышением фосфорилирования eNOS в ингибирующих сайтах (Ser117, $p = 0,0002$, см. рис. 7, 8; Thr495, $p = 0,0001$, рис. 9, 10), в особенности Thr495 (где различие в интенсивности окрашивания достигало полутора раз, см. рис. 9, 10).

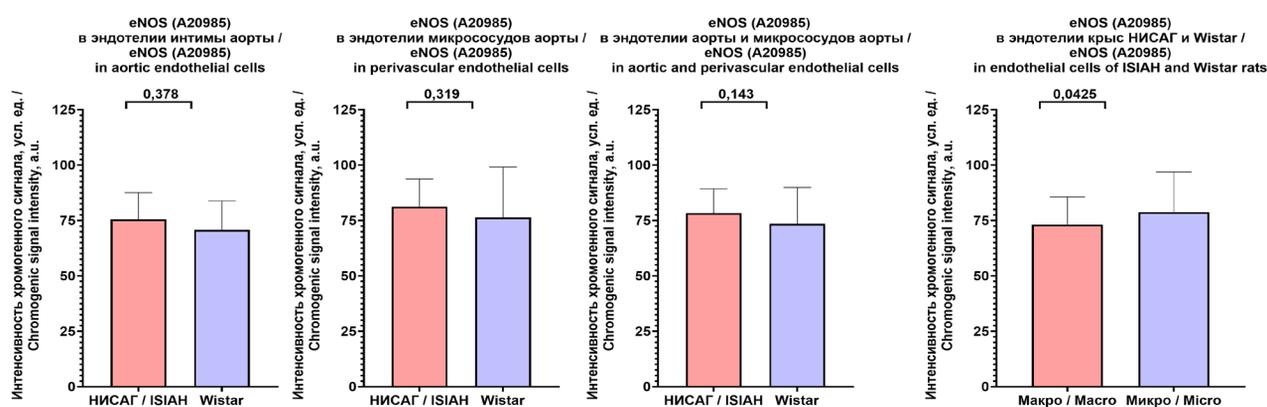


Рисунок 2. Полуколичественный анализ интенсивности хромогенного сигнала при иммуногистохимическом окрашивании эндотелиальных клеток интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar с использованием антитела к эндотелиальной NO-синтазе (eNOS, A20985, ABclonal Biotechnology). Для крайнего правого графика использован критерий Уилкоксона, для остальных графиков – критерий Манна – Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p указаны над графиками

Figure 2. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical signal in aortic and perivascular endothelial cells of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats. Staining against total eNOS (A20985, ABclonal Biotechnology). Right bar graph: Wilcoxon matched-pairs signed-rank test; other bar graphs: Mann–Whitney U test. P values are indicated above the bars

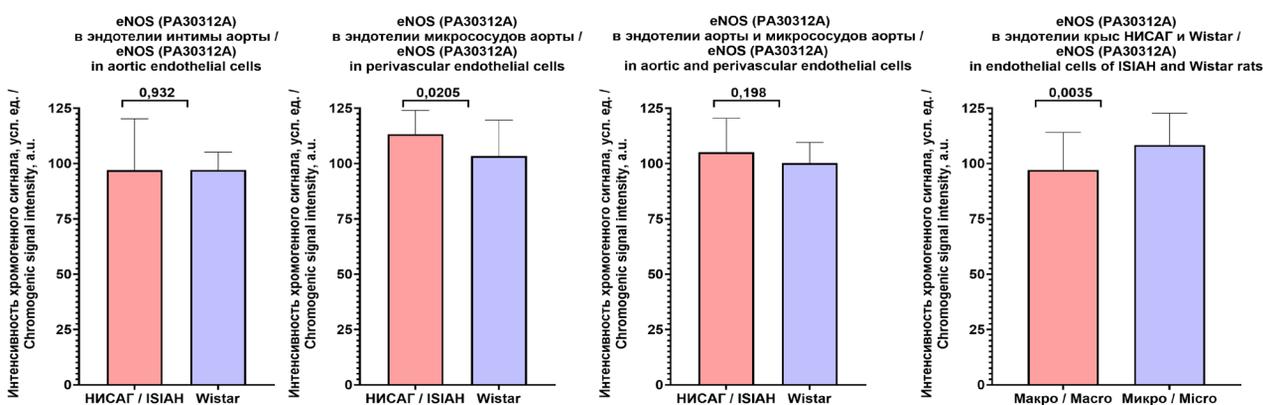


Рисунок 4. Полуколичественный анализ интенсивности хромогенного сигнала при иммуногистохимическом окрашивании эндотелиальных клеток интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar с использованием антитела к эндотелиальной NO-синтазе (eNOS, PA30312A, Thermo Fisher Scientific). Для крайнего правого графика использован критерий Уилкоксона, для остальных графиков – критерий Манна – Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p указаны над графиками

Figure 4. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical signal in aortic and perivascular endothelial cells of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats. Staining against total eNOS (PA30312A, Thermo Fisher Scientific). Right bar graph: Wilcoxon matched-pairs signed-rank test; other bar graphs: Mann–Whitney U test. P values are indicated above the bars

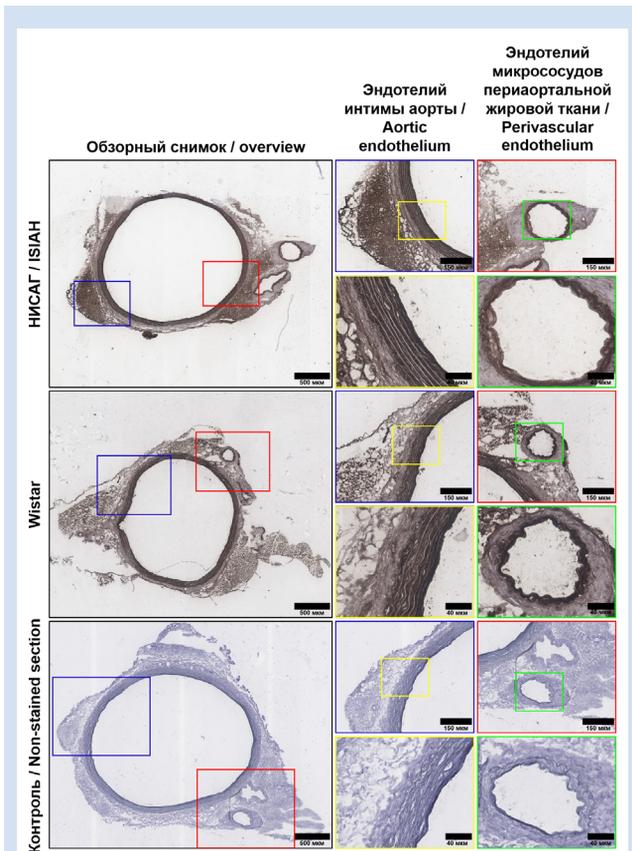


Рисунок 3. Иммуногистохимическое окрашивание аорты гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar для выявления эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в эндотелиальных клетках интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани с использованием антитела к eNOS (PA30312A, Thermo Fisher Scientific) с дополнительным контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Репрезентативные изображения

Figure 3. Immunohistochemical staining of the aorta of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats to detect total endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in aortic and perivascular endothelial cells using the respective antibody (PA30312A, Thermo Fisher Scientific). Nuclei are counterstained using Gill's hematoxylin. Representative images

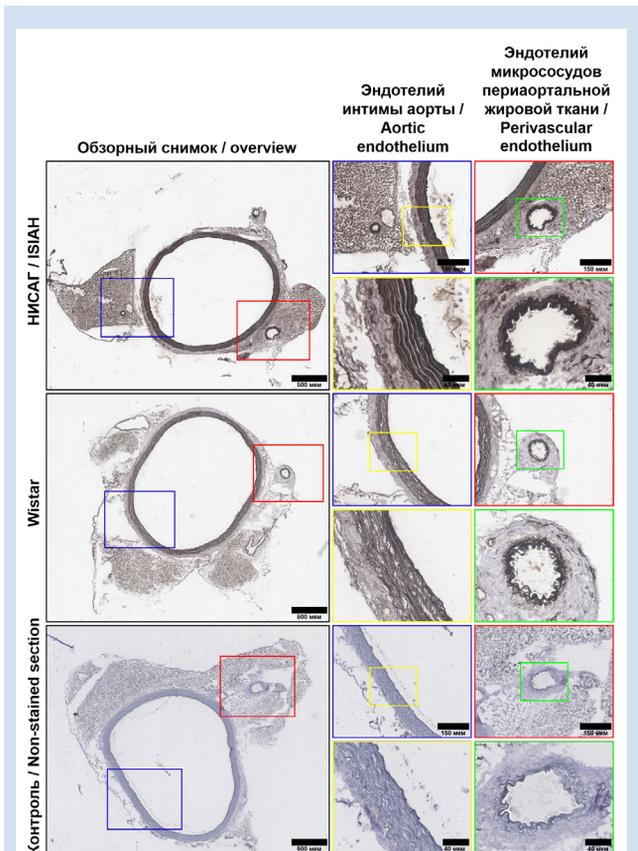


Рисунок 5. Иммуногистохимическое окрашивание аорты гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar для выявления эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в эндотелиальных клетках интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани с использованием антитела к eNOS (SL20608R, Sunlong Biotech) с дополнительным контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Репрезентативные изображения

Figure 5. Immunohistochemical staining of the aorta of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats to detect total endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in aortic and perivascular endothelial cells using the respective antibody (SL20608R, Sunlong Biotech). Nuclei are counterstained using Gill's hematoxylin. Representative images

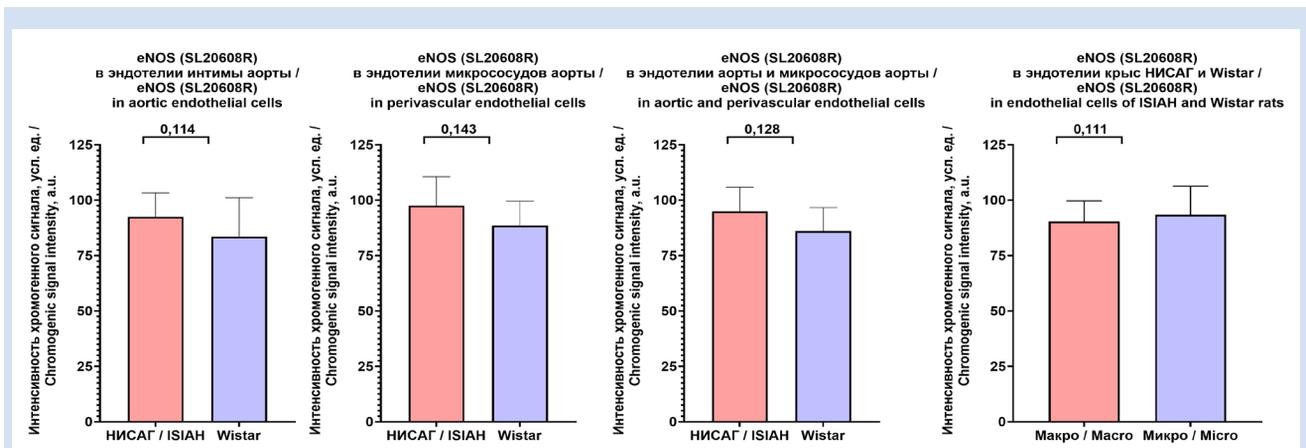


Рисунок 6. Полуколичественный анализ интенсивности хромогенного сигнала при иммуногистохимическом окрашивании эндотелиальных клеток интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar с использованием антитела к эндотелиальной NO-синтазе (eNOS, SL20608R, Sunlong Biotech). Для крайнего правого графика использован критерий Уилкоксона, для остальных графиков – критерий Манна – Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p указаны над графиками

Figure 6. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical signal in aortic and perivascular endothelial cells of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats. Staining against total eNOS (SL20608R, Sunlong Biotech). Right bar graph: Wilcoxon matched-pairs signed-rank test; other bar graphs: Mann–Whitney U test. P values are indicated above the bars

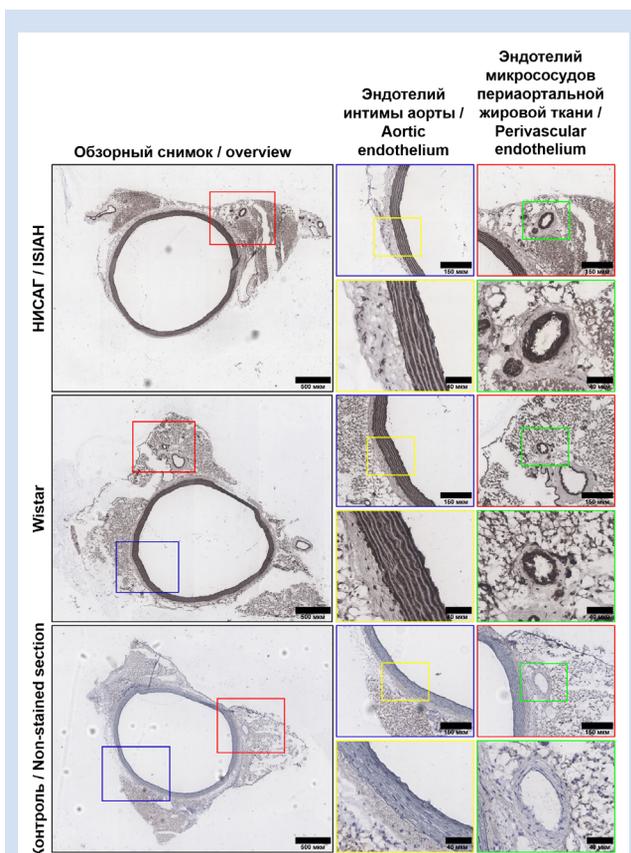


Рисунок 7. Иммуногистохимическое окрашивание аорты гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar для выявления фосфорилированной формы эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в позиции серин-117 в эндотелиальных клетках интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани с использованием соответствующего антитела с дополнительным контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Репрезентативные изображения

Figure 7. Immunohistochemical staining of the aorta of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats to detect phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser117 position in aortic and perivascular endothelial cells using the respective antibody. Nuclei are counterstained using Gill's hematoxylin. Representative images

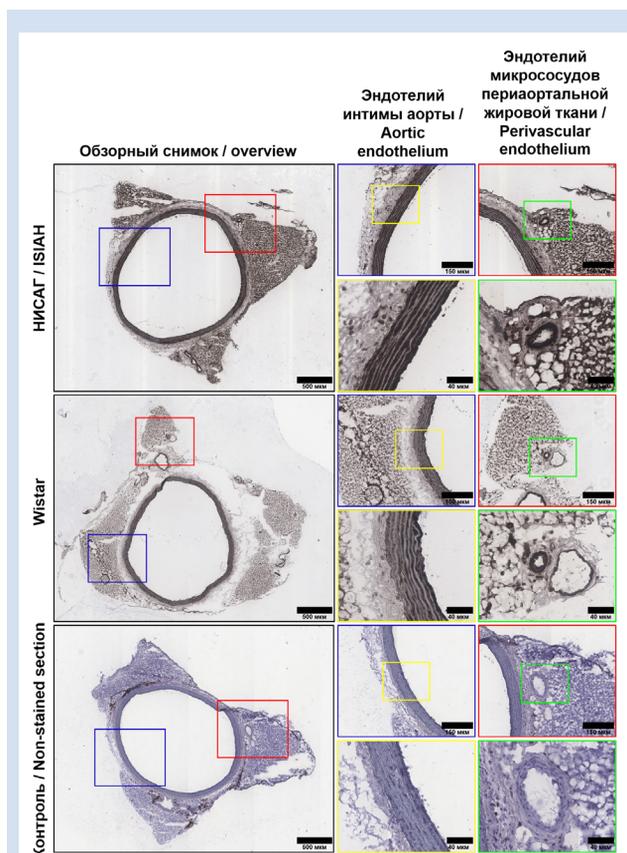


Рисунок 9. Иммуногистохимическое окрашивание аорты гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar для выявления фосфорилированной формы эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в позиции треонин-495 в эндотелиальных клетках интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани с использованием соответствующего антитела с дополнительным контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Репрезентативные изображения

Figure 9. Immunohistochemical staining of the aorta of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats to detect phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Thr495 in aortic and perivascular endothelial cells using the respective antibody. Nuclei are counterstained using Gill's hematoxylin. Representative images

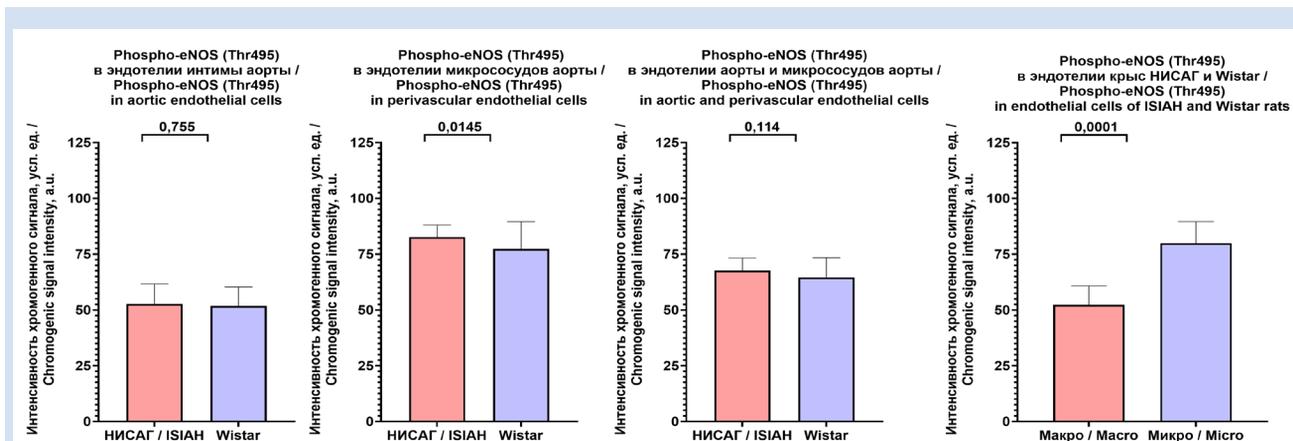


Рисунок 8. Полуколичественный анализ интенсивности хромогенного сигнала при иммуногистохимическом окрашивании эндотелиальных клеток интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar с использованием антитела к фосфорилированной форме эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в позиции серин-117. Для крайнего правого графика использован критерий Уилкоксона, для остальных графиков – критерий Манна – Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p указаны над графиками

Figure 8. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical signal in aortic and perivascular endothelial cells of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats. Staining against the phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser117 position. Right bar graph: Wilcoxon matched-pairs signed-rank test; other bar graphs: Mann–Whitney U test. P values are indicated above the bars

При анализе фосфорилирования eNOS по сайтам, повышающим активность данного фермента (Ser632 и Ser1177), в эндотелии интимы аорты ($p = 0,0045$) и эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани ($p = 0,0145$) гипертензивных крыс НИСАГ в сравнении с нормотензивными крысами Wistar было обнаружено повышение содержания eNOS, фосфорилированной в позиции серин-632, причем данные различия были справедливы и при расчете средних значений по макро- и микрососудистому эндотелию ($p = 0,0332$, рис. 11, 12). Кроме того, в эндотелии интимы аорты гипертензивных крыс НИСАГ также выявлено повышение содержания eNOS, фосфорилированной в позиции серин-1177 ($p = 0,0387$), хотя в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани подобного не наблюдалось ($p = 0,319$, рис. 13, 14). По аналогии с общей фракцией eNOS и ингибирующими формами eNOS, формы eNOS с активирующим фосфорилированием (Ser632 и Ser1177) были более экспрессированы в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани, чем в эндотелии интимы аорты (Ser632, $p = 0,0001$, см. рис. 11, 12; Ser1177, $p = 0,0065$, см. рис. 13, 14).

По результатам иммуногистохимического окрашивания нами проведен сравнительный анализ экспрессии фосфорилированных форм eNOS, характеризующихся снижением (Ser117 и Thr495) или повышением (Ser632 и Ser1177) активности данного фермента, у гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar. Несмотря на то что в эндотелии интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани крыс Wistar несколько преобладали ингибирующая активность eNOS фосфорилированные формы, данные различия не достигали статистической значимости ($p = 0,291$ и $p = 0,178$ соответственно, рис. 15). Соотноше-

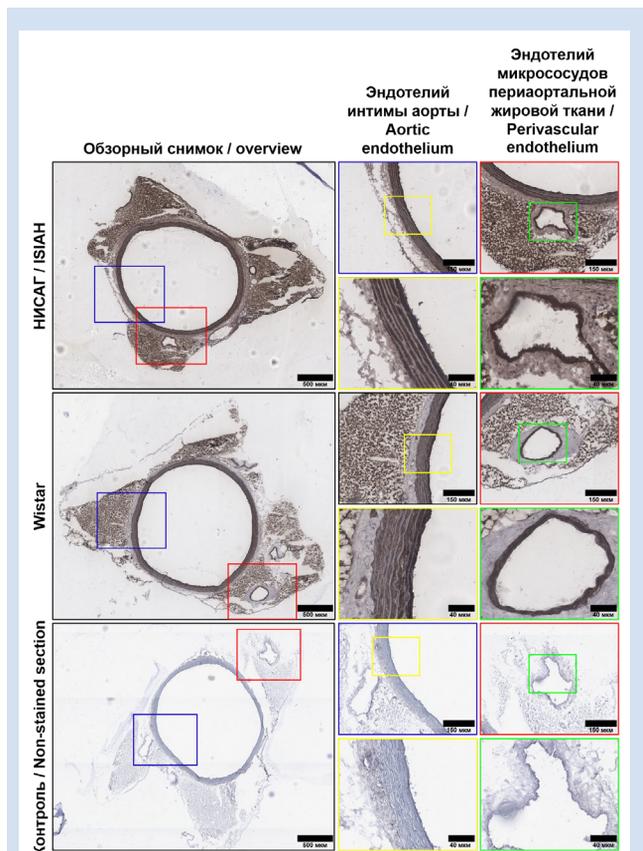


Рисунок 11. Иммуногистохимическое окрашивание аорты гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar для выявления фосфорилированной формы эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в позиции серин-632 в эндотелиальных клетках интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани с использованием соответствующего антитела с дополнительным контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Репрезентативные изображения

Figure 11. Immunohistochemical staining of the aorta of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats to detect phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser632 position in aortic and perivascular endothelial cells using the respective antibody. Nuclei are counterstained using Gill's hematoxylin. Representative images

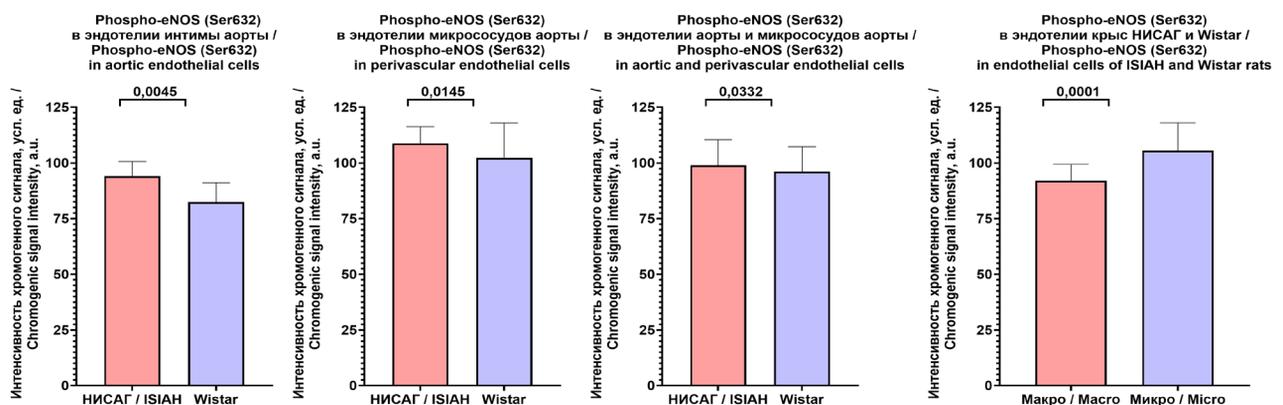


Рисунок 10. Полуколичественный анализ интенсивности хромогенного сигнала при иммуногистохимическом окрашивании эндотелиальных клеток интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar с использованием антитела к фосфорилированной форме эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в позиции треонин-495. Для крайнего правого графика использован критерий Уилкоксона; для остальных графиков – критерий Манна–Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p указаны над графиками

Figure 10. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical signal in aortic and perivascular endothelial cells of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats. Staining against the phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Thr495 position. Right bar graph: Wilcoxon matched-pairs signed-rank test; other bar graphs: Mann–Whitney U test. P values are indicated above the bars

ние интенсивности экспрессии Ser117 и Thr495 к экспрессии Ser632 и Ser1177 в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани было практически идентичным с эндотелием микрососудов аорты ($p = 0,422$, см. рис. 15).

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о существенных различиях в профиле фосфорилирования eNOS у гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar, что указывает на изменение экспрессии и активности eNOS при артериальной гипертензии. В частности, следует отметить повышенное фосфорилирование сайтов, активирующих eNOS (Ser632 и Ser1177), в эндотелии интимы аорты и более выраженное фосфорилирование сайтов, ингибирующих активность данного фермента (Ser117 и Thr495), в эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани (хотя в нем также наблюдалось повышение экспрессии фосфорилированной формы Ser632) гипертензивных крыс в сравнении с нормотензивными. Кроме того, эндотелий микрососудов периаортальной жировой ткани характеризовался повышенным содержанием общей фракции eNOS и всех ее фосфорилированных форм (Ser117, Thr495, Ser632, Ser1177) по сравнению с эндотелием интимы аорты, что свидетельствует о различиях в регуляции eNOS в эндотелии крупных артерий и микроциркуляторного русла. Таким образом, различия в экспрессии различных фосфорилированных форм eNOS в эндотелии гипер- и нормотензивных крыс значительно более сложные, чем можно было предположить на первый взгляд. При наследственной эссенциальной артериальной гипертензии у крыс не происходит выраженного снижения экспрессии eNOS; вместо этого в артериях и сосудах микроциркуляторного

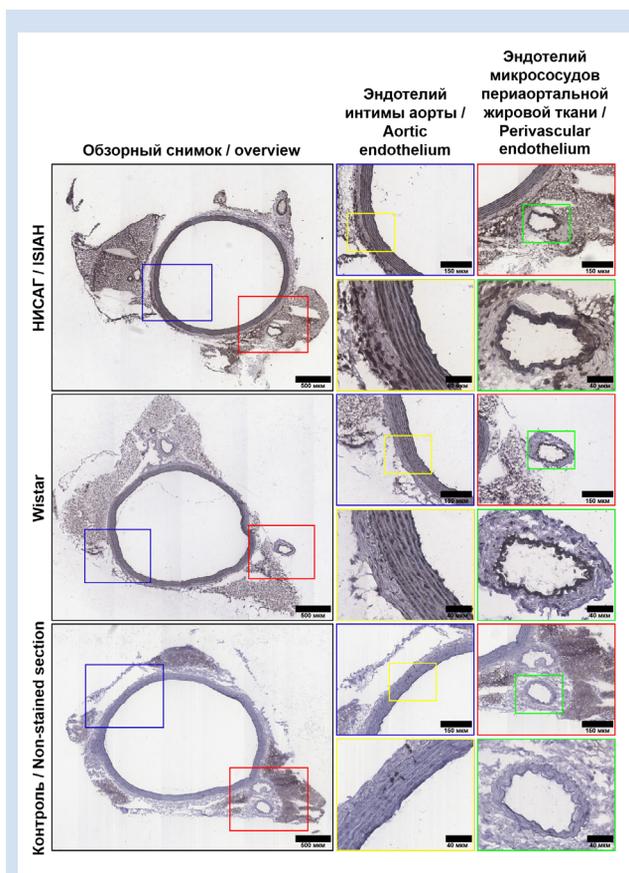


Рисунок 13. Иммуногистохимическое окрашивание аорты гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar для выявления фосфорилированной формы эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в позиции серин-1177 в эндотелиальных клетках интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани с использованием соответствующего антитела с дополнительным контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Репрезентативные изображения

Figure 13. Immunohistochemical staining of the aorta of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats to detect phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser1177 position in aortic and perivascular endothelial cells using the respective antibody. Nuclei are counterstained using Gill's hematoxylin. Representative images

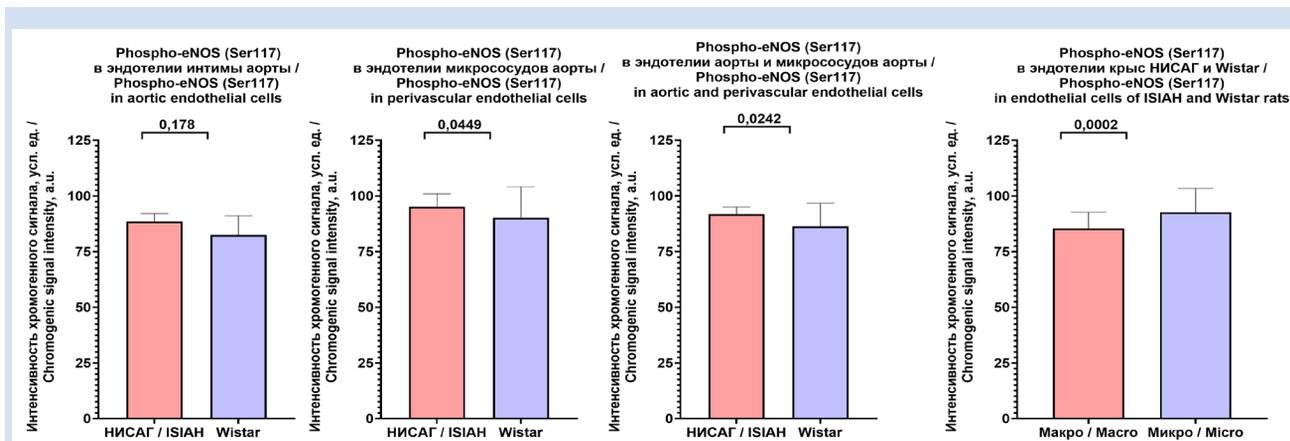


Рисунок 12. Полуколичественный анализ интенсивности хромогенного сигнала при иммуногистохимическом окрашивании эндотелиальных клеток интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar с использованием антитела к фосфорилированной форме эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в позиции серин-632. Для крайнего правого графика использован критерий Уилкоксона, для остальных графиков – критерий Манна – Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p указаны над графиками

Figure 12. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical signal in aortic and perivascular endothelial cells of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats. Staining against the phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser632 position. Right bar graph: Wilcoxon matched-pairs signed-rank test; other bar graphs: Mann–Whitney U test. P values are indicated above the bars

русла изменяется интенсивность фосфорилирования данного фермента в различных сайтах, что позволяет регулировать его активность посттрансляционно, без прямого воздействия на экспрессию гена. Вероятнее всего, система контроля синтеза такого мощного вазодилатора, как NO, является многопараметрической, что исключает резкие изменения экспрессии общей фракции eNOS и ее фосфорилированных форм даже при патологическом повышении артериального давления (к примеру, у гипертензивных крыс). С учетом хронического течения артериальной гипертензии (и необходимости регуляции систолического артериального давления на приемлемом для организма уровне) такой сценарий представляется весьма вероятным и объясняющим относительно ограниченные различия в экспрессии и фосфорилировании eNOS у гипер- и нормотензивных крыс. В то же время стабильно повышенная интенсивность иммуногистохимического окрашивания антителами к eNOS и его фосфорилированным формам в микрососудистом русле гипер- и нормотензивных крыс позволяет предположить большую значимость этого параметра для регуляции кровяного давления в микрососудистом русле в сравнении с артериальным.

В силу сложноорганизованного баланса между экспрессией и активностью различных вазоконстрикторов и вазодилаторов изменения экспрессии и фосфорилирования eNOS могут носить как патогенетический, так и компенсаторный характер. Помимо дисфункции эндотелия в патогенез артериальной гипертензии вносит существенный вклад дисфункция гладких миоцитов сосудистой стенки, которые продуцируют другие формы NO-синтазы (индуцибельную NO-синтазу iNOS и нейрональную NO-синтазу nNOS) [26–30]. Экспрессия iNOS, в норме наблюдаемая в гладких миоцитах артерий

в относительно небольшом количестве [26], повышается при определяемой у крыс линии SHR артериальной гипертензии в сравнении с нормотензивными крысами WKY [27] и у крыс с экспериментально индуцированным сахарным диабетом [28]. Кроме того, гладкие миоциты сосудов выделяют nNOS, экспрессия которой в пупочной вене характеризуется существенным снижением при преэклампсии [29] и также уменьшается в артериях гипертензивных крыс SHR при воздействии ангиотензина II в сравнении с нормотензивными крысами WKY [30]. Вполне вероятно, что синтез NO в сосудистой стенке при артериальной гипертензии регулируется всеми тремя формами NO-синтазы (eNOS в ЭК и iNOS с nNOS в гладких миоцитах), что в сочетании с дополнительной посттрансляционной регуляцией обуславливает отсутствие неконтролируемых изменений экспрессии любой из указанных форм. Помимо вышеуказанного следует отметить сочетанную регуляцию артериального давления посредством воздействия целого ряда вазоконстрикторов (эндотелин 1, ангиотензин II, тромбоксан A2) и вазодилаторов (эндотелиальный гиперполяризирующий фактор, брадикинин, простагландин H2) [31], а также воздействие симпатической и парасимпатической нервной системы и соответствующих нейромедиаторов (адреналина/норадреналина [32] и ацетилхолина) [33], которые еще более усложняют регуляцию экспрессии eNOS. Вероятнее всего, особенно сложными связи между компонентами данной системы становятся при артериальной гипертензии, когда организму приходится модифицировать интенсивность синтеза различных компонентов для поддержания способности сосудов реагировать на циклические изменения артериального давления и на увеличение их амплитуды. Тем не менее повы-

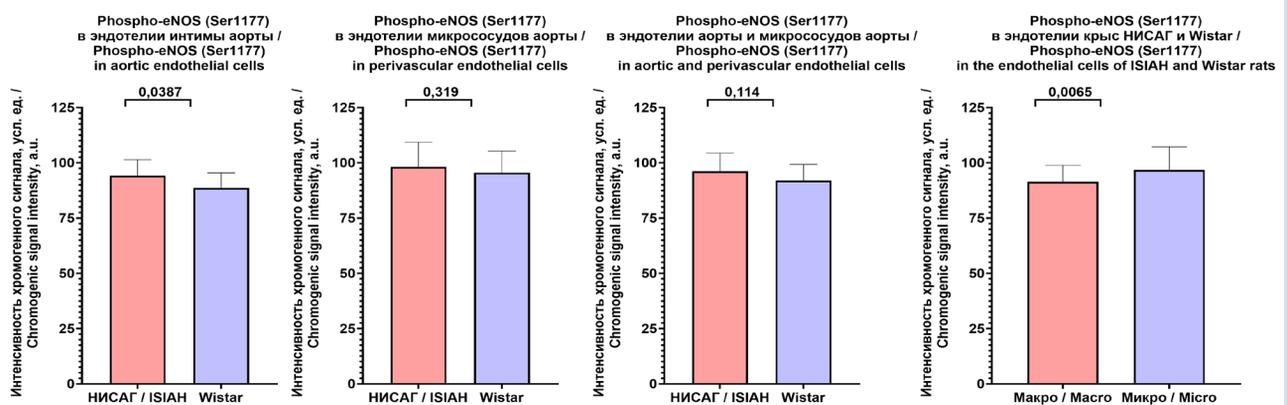


Рисунок 14. Полуколичественный анализ интенсивности хромогенного сигнала при иммуногистохимическом окрашивании эндотелиальных клеток интимы аорты и микрососудов периаортальной жировой ткани гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс Wistar с использованием антитела к фосфорилированной форме эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в позиции серин-1177. Для крайнего правого графика использован критерий Уилкоксона, для остальных графиков – критерий Манна – Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p указаны над графиками

Figure 14. Semi-quantitative analysis of immunohistochemical signal in aortic and perivascular endothelial cells of hypertensive (ISIAH) and normotensive (Wistar) rats. Staining against the phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser1177 position. Right bar graph: Wilcoxon matched-pairs signed-rank test; other bar graphs: Mann–Whitney U test. P values are indicated above the bars

шение экспрессии форм eNOS с ингибирующим фосфорилированием (Ser117 и Thr495) в сосудах микроциркуляторного русла гипертензивных крыс может свидетельствовать о важности данной биохимической модификации для развития вазоспастической дисфункции эндотелия, характерной для артериальной гипертензии.

Говоря о роли eNOS в развитии вазоспастической дисфункции, следует отметить чрезвычайно низкую экспрессию гена NOS3 *in vitro* независимо от используемых праймеров (которые могут таргетировать как одну, так и несколько изоформ eNOS) при активной пролиферации и физиологическом функционировании ЭК, необходимость малого разведения антител к eNOS и ее фосфорилированным формам при иммуноблоттинге (1:200), а также отсутствие значительного количества нитратов и нитритов в культуральной среде от ЭК после ее депротеинизации. Таким образом, вполне правоме-

рен вывод о том, что функционирование ЭК *in vitro* существенно не зависит от экспрессии eNOS или ее фосфорилирования в различных сайтах (в первую очередь в силу отсутствия развития вазодилатации как таковой). Безусловно, при воздействии пульсирующего потока *in vivo* экспрессия eNOS и генерация NO имеют существенно большую значимость, поскольку эффективность эндотелий-зависимой вазодилатации напрямую определяет степень сужения сосудистого просвета, которая влияет на биомеханические параметры потока крови (которые, в свою очередь, напрямую влияют на активацию тех или иных сигнальных путей через различные механосенсоры и механотрансдукцию). Тем не менее само наличие механизмов эндотелий-зависимой вазодилатации, в первую очередь определяемой воздействием потока, [34] и эндотелий-независимой вазодилатации [35], зависящей именно от вазорактивности гладких миоцитов сосудов, в сочетании

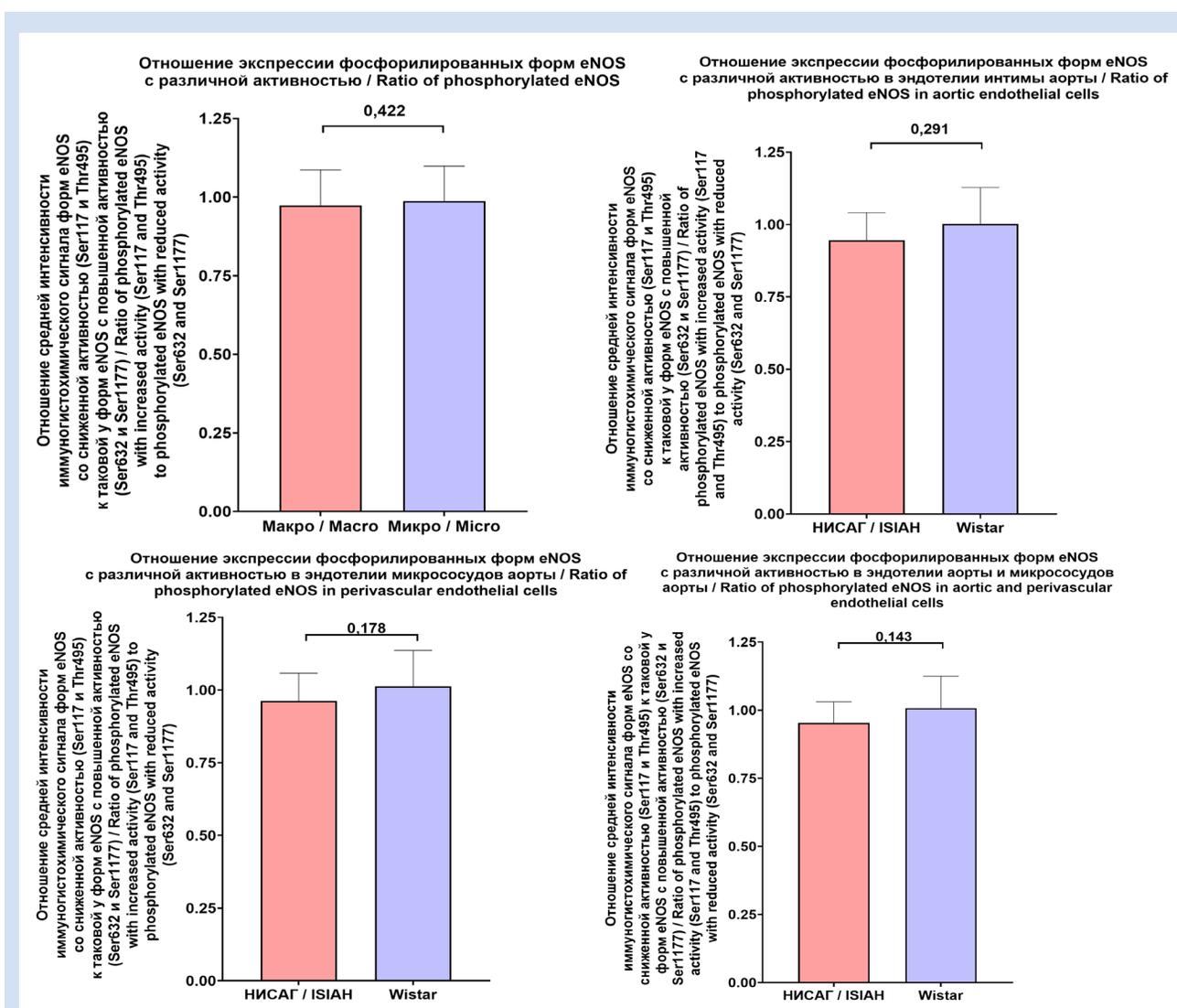


Рисунок 15. Полуколичественный анализ отношения экспрессии фосфорилированных форм eNOS со сниженной активностью (Ser117 и Thr495) к таковым с повышенной активностью (Ser632 и Ser1177). Для правого нижнего графика использован критерий Уилкоксона, для остальных графиков – критерий Манна – Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p указаны над графиками

Figure 15. Semi-quantitative analysis ratio of phosphorylated eNOS (inhibiting forms Ser117 and Thr495 and activating forms Ser632 and Ser1177). Right lower bar graph: Wilcoxon matched-pairs signed-rank test; other bar graphs: Mann–Whitney U test. P values are indicated above the bars

со множественностью ранее упомянутых вазоконстрикторов и вазодилататоров определяет способность к компенсации недостаточной экспрессии гена NOS3 или к преобладанию ингибирующего фосфорилирования NOS3 над активирующим. Последующие исследования могут быть направлены на изучение экспрессии патогенетически значимых для артериальной гипертензии молекул в гладких миоцитах артерий гипер- и нормотензивных крыс, а также на исследование других потенциальных маркеров вазоспастической дисфункции эндотелия (к примеру, атеропротективных транскрипционных механочувствительных факторов, различных изоформ NADPH-оксидазы, ксантинооксидазы, маркеров окислительного стресса).

Заключение

Гипертензивные крысы НИСАГ, в сравнении с нормотензивными крысами Wistar, характеризовались повышением экспрессии различных фосфорилированных форм eNOS в эндотелии интимы аорты (где преобладают формы, повышающие активность eNOS – Ser632 и Ser1177) и эндотелии микрососудов периаортальной жировой ткани (где преобладают формы, снижающие активность eNOS – Ser117 и Thr495). В сравнении с эндотелием интимы аорты

эндотелий микрососудов периаортальной жировой ткани гипер- и нормотензивных крыс демонстрировал повышенную экспрессию как общей фракции eNOS, так и ее фосфорилированных форм, что указывало на повышенную активность биосинтеза и метаболизма NO в микроциркуляторном русле.

Конфликт интересов

Л.А. Богданов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Кондратьев заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.А. Кошелев заявляет об отсутствии конфликта интересов. Р.А. Мухамадияров заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Ю. Канонькина заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Е. Тюрина заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-75-10057 «Идентификация клеточных маркеров дисфункции эндотелия», <https://rscf.ru/project/24-75-10057/>.

Информация об авторах

Богданов Лев Александрович, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Кондратьев Егор Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0002-1834-6045

Кошелев Владислав Александрович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-6840-1116

Мухамадияров Ринат Авхадиевич, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-5558-3229

Канонькина Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины

Author Information Form

Bogdanov Leo A., PhD, Researcher, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Kondratiev Egor A., BSc, Junior Researcher, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0002-1834-6045

Koshelev Vladislav A., MSc, Junior Researcher, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-6840-1116

Mukhamadiyarov Rinat A., PhD, Senior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-5558-3229

Kanonykina Anastasia Yu., MSc, Junior Researcher, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State

федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-2810-3100

Лазебная Анастасия Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Тюрина Арина Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0002-6293-6974

Кутихин Антон Геннадьевич, доктор медицинских наук заведующий отделом экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2810-3100

Lazebnaya Anastasia A., MSc, Junior Researcher, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Tyurina Arina E., BSc, Junior Researcher, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0002-6293-6974

Kutikhin Anton G., MD, DSc, Head of the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

БЛА – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КЕА – получение, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КВА – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МРА – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАЮ – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЛАИ – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ТАЕ – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАГ – вклад в концепцию и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

BLA – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

KEA – data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

KVA – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MRA – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAY – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

LAI – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

TAE – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAG – contribution to the concept and design of the study, data analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kutikhin AG, Shishkova DK, Velikanova EA, Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Markova VE. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol.* 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
2. Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell

Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

3. Шишкова Д.К., Фролов А.В., Маркова В.Е., Маркова Ю.О., Канонькина А.Ю., Лазебная А.И., Матвеева В.Г., Торгунакова Е.А., Кутихин А.Г. Современные подходы к моделированию дисфункции эндотелия и системному поиску ее циркулирующих маркеров. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024. Т. 13. № S3. С. 173-190. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-173-190.

4. Богданов Л.А., Кошелев В.А., Мухамадияров Р.А., Канонькина А.Ю., Лазебная А.И., Кондратьев Е.А., Степанов А.Д., Кутихин А.Г. Современные подходы к идентификации клеточных маркеров дисфункции эндотелия. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024. Т. 13. № S3. С. 191-207. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-191-207.

5. da Silva FC, de Araújo BJ, Cordeiro CS, Arruda VM, Faria BQ, Guerra JFDC, Araújo TG, Fürstenau CR. Endothelial dysfunction due to the inhibition of the synthesis of nitric oxide: Proposal and characterization of an in vitro cellular model. *Front Physiol*. 2022;13:978378. doi: 10.3389/fphys.2022.978378.

6. Ghosh S, Gupta M, Xu W, Mavrakis DA, Janocha AJ, Comhair SA, Haque MM, Stuehr DJ, Yu J, Polgar P, Naga Prasad SV, Erzurum SC. Phosphorylation inactivation of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(11):L1199-205. doi: 10.1152/ajplung.00092.2016.

7. Li G, Zhang H, Zhao L, Zhang Y, Yan D, Liu Y. Angiotensin-converting enzyme 2 activation ameliorates pulmonary endothelial dysfunction in rats with pulmonary arterial hypertension through mediating phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Am Soc Hypertens*. 2017;11(12):842-852. doi: 10.1016/j.jash.2017.10.009.

8. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120(4):713-735. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.

9. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

10. Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol*. 2013;4:347. doi: 10.3389/fphys.2013.00347.

11. Heiss EH, Dirsch VM. Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Curr Pharm Des*. 2014;20(22):3503-13. doi: 10.2174/13816128113196660745.

12. Iring A, Jin YJ, Albarrán-Juárez J, Siragusa M, Wang S, Dancs PT, Nakayama A, Tonack S, Chen M, Künne C, Sokol AM, Günther S, Martínez A, Fleming I, Wettschureck N, Graumann J, Weinstein LS, Offermanns S. Shear stress-induced endothelial adrenomedullin signaling regulates vascular tone and blood pressure. *J Clin Invest*. 2019;129(7):2775-2791. doi: 10.1172/JCI123825.

13. Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2001;276(21):17625-8. doi: 10.1074/jbc.C100122200.

14. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*. 2001;88(11):E68-75. doi: 10.1161/hh1101.092677.

15. Lee CH, Wei YW, Huang YT, Lin YT, Lee YC, Lee KH, Lu PJ. CDK5 phosphorylates eNOS at Ser-113 and regulates NO production. *J Cell Biochem*. 2010;110(1):112-7. doi: 10.1002/jcb.22515.

16. Kennard S, Ruan L, Buffett RJ, Fulton D, Venema RC. TNF α reduces eNOS activity in endothelial cells through serine 116 phosphorylation and Pin1 binding: Confirmation of a direct, inhibitory interaction of Pin1 with eNOS. *Vascul Pharmacol*. 2016;81:61-8. doi: 10.1016/j.vph.2016.04.003.

17. Li C, Ruan L, Sood SG, Papapetropoulos A, Fulton D, Venema RC. Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2007;47(5-6):257-64. doi: 10.1016/j.vph.2007.07.001.

18. Shishkova D, Markova V, Markova Y, Sinitsky M, Sinitskaya A, Matveeva V, Torgunakova E, Lazebnaya A, Stepanov A, Kutikhin A. Physiological Concentrations of Calcioprotein Particles Trigger Activation and Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Monocytes. *Biochemistry (Mosc)*. 2025;90(1):132-160. doi: 10.1134/S0006297924604064.

19. Ku KH, Dubinsky MK, Sukumar AN, Subramaniam N, Feasson MYM, Nair R, Tran E, Steer BM, Knight BJ, Marsden PA. In Vivo Function of Flow-Responsive Cis-DNA Elements of eNOS Gene: A Role for Chromatin-Based Mechanisms. *Circulation*. 2021;144(5):365-381. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.051078.

20. Jin YJ, Chennupati R, Li R, Liang G, Wang S, Iring A, Graumann J, Wettschureck N, Offermanns S. Protein kinase N2 mediates flow-induced endothelial NOS activation and vascular tone regulation. *J Clin Invest*. 2021;131(21):e145734. doi: 10.1172/JCI145734.

21. Cattaneo MG, Vanetti C, Decimo I, Di Chio M, Martano G, Garrone G, Bifari F, Vicentini LM. Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):9612. doi: 10.1038/s41598-017-10139-x.

22. Smith AR, Visioli F, Frei B, Hagen TM. Age-related changes in endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and nitric oxide dependent vasodilation: evidence for a novel mechanism involving sphingomyelinase and ceramide-activated phosphatase 2A. *Aging Cell*. 2006;5(5):391-400. doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00232.x.

23. Sansbury BE, Cummins TD, Tang Y, Hellmann J, Holden CR, Harbeson MA, Chen Y, Patel RP, Spite M, Bhatnagar A, Hill BG. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. *Circ Res*. 2012 Oct 12;111(9):1176-89. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.266395.

24. Bu S, Nguyen HC, Nikfarjam S, Michels DCR, Rasheed B, Maheshkumar S, Singh S, Singh KK. Endothelial cell-specific loss of eNOS differentially affects endothelial function. *PLoS One*. 2022;17(9):e0274487. doi: 10.1371/journal.pone.0274487.

25. Shu X, Keller TC 4th, Begandt D, Butcher JT, Biwer L, Keller AS, Columbus L, Isakson BE. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(23):4561-75. doi: 10.1007/s00018-015-2021-0.

26. Fries DM, Paxinou E, Themistocleous M, Swanberg E, Griendling KK, Salvemini D, Slot JW, Heijnen HF, Hazen SL, Ischiropoulos H. Expression of inducible nitric-oxide synthase and intracellular protein tyrosine nitration in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22901-7. doi: 10.1074/jbc.M210806200.

27. Singh A, Sventek P, Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells from prehypertensive spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1996;9(9):867-77. doi: 10.1016/s0895-7061(96)00104-5.

28. Di Pietro N, Di Tomo P, Di Silvestre S, Giardinelli A, Pipino C, Morabito C, Formoso G, Mariggio MA, Pandolfi A. Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: potential role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKIIdelta(2)). *Atherosclerosis*. 2013;226(1):88-94. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.062.

29. Preeclampsia is associated with loss of neuronal nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells of the human umbilical cord. Schönfelder G, Fuhr N, Hadzidiakos D, John M, Hopp H, Paul M. *Histopathology*. 2004;44(2):116-28. doi: 10.1111/j.1365-2559.2004.01806.x.

30. Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 1998;83(12):1271-8. doi: 10.1161/01.res.83.12.1271.

31. Gomez-Alamillo C, Juncos LA, Cases A, Haas JA, Romero JC. Interactions between vasoconstrictors and vasodilators in regulating hemodynamics of distinct vascular beds. *Hypertension.* 2003;42(4):831-6. doi: 10.1161/01.HYP.0000088854.04562.DA.

32. Bruno RM, Ghiadoni L, Seravalle G, Dell'oro R, Taddei S, Grassi G. Sympathetic regulation of vascular function in

health and disease. *Front Physiol.* 2012;3:284. doi: 10.3389/fphys.2012.00284.

33. Sheng Y, Zhu L. The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2018;10(1):17-28.

34. Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation.* 2013;20(3):239-47. doi: 10.1111/micc.12040.

35. Maruhashi T, Kihara Y, Higashi Y. Assessment of endothelium-independent vasodilation: from methodology to clinical perspectives. *J Hypertens.* 2018;36(7):1460-1467. doi: 10.1097/HJH.0000000000001750.

REFERENCES

1. Kutikhin AG, Shishkova DK, Velikanova EA, Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Markova VE. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol.* 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.

2. Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

3. Шишкова Д.К., Фролов А.В., Маркова В.Е., Маркова Ю.О., Канонькина А.Ю., Лазебная А.И., Матвеева В.Г., Торгунакова Е.А., Кутихин А.Г. Современные подходы к моделированию дисфункции эндотелия и системному поиску ее циркулирующих маркеров. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024. Т. 13. № S3. С. 173-190. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-S3-173-190.

4. Богданов Л.А., Кошелев В.А., Мухамадияров Р.А., Канонькина А.Ю., Лазебная А.И., Кондратьев Е.А., Степанов А.Д., Кутихин А.Г. Современные подходы к идентификации клеточных маркеров дисфункции эндотелия. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024. Т. 13. № S3. С. 191-207. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-S3-191-207.

5. da Silva FC, de Araújo BJ, Cordeiro CS, Arruda VM, Faria BQ, Guerra JFDC, Araújo TG, Fürstenau CR. Endothelial dysfunction due to the inhibition of the synthesis of nitric oxide: Proposal and characterization of an in vitro cellular model. *Front Physiol.* 2022;13:978378. doi: 10.3389/fphys.2022.978378.

6. Ghosh S, Gupta M, Xu W, Mavrakis DA, Janocha AJ, Comhair SA, Haque MM, Stuehr DJ, Yu J, Polgar P, Naga Prasad SV, Erzurum SC. Phosphorylation inactivation of endothelial nitric oxide synthesis in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;310(11):L1199-205. doi: 10.1152/ajplung.00092.2016.

7. Li G, Zhang H, Zhao L, Zhang Y, Yan D, Liu Y. Angiotensin-converting enzyme 2 activation ameliorates pulmonary endothelial dysfunction in rats with pulmonary arterial hypertension through mediating phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Am Soc Hypertens.* 2017;11(12):842-852. doi: 10.1016/j.jash.2017.10.009.

8. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017;120(4):713-735. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.

9. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

10. Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol.* 2013;4:347. doi: 10.3389/fphys.2013.00347.

11. Heiss EH, Dirsch VM. Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Curr Pharm Des.* 2014;20(22):3503-13. doi: 10.2174/13816128113196660745.

12. Iring A, Jin YJ, Albarrán-Juárez J, Siragusa M, Wang S, Dancs PT, Nakayama A, Tonack S, Chen M, Künne C, Sokol AM, Günther S, Martínez A, Fleming I, Wettschureck N,

Graumann J, Weinstein LS, Offermanns S. Shear stress-induced endothelial adrenomedullin signaling regulates vascular tone and blood pressure. *J Clin Invest.* 2019;129(7):2775-2791. doi: 10.1172/JCI123825.

13. Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2001;276(21):17625-8. doi: 10.1074/jbc.C100122200.

14. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 2001;88(11):E68-75. doi: 10.1161/hh1101.092677.

15. Lee CH, Wei YW, Huang YT, Lin YT, Lee YC, Lee KH, Lu PJ. CDK5 phosphorylates eNOS at Ser-113 and regulates NO production. *J Cell Biochem.* 2010;110(1):112-7. doi: 10.1002/jcb.22515.

16. Kennard S, Ruan L, Buffett RJ, Fulton D, Venema RC. TNF α reduces eNOS activity in endothelial cells through serine 116 phosphorylation and Pin1 binding: Confirmation of a direct, inhibitory interaction of Pin1 with eNOS. *Vascul Pharmacol.* 2016;81:61-8. doi: 10.1016/j.vph.2016.04.003.

17. Li C, Ruan L, Sood SG, Papapetropoulos A, Fulton D, Venema RC. Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 2007;47(5-6):257-64. doi: 10.1016/j.vph.2007.07.001.

18. Shishkova D, Markova V, Markova Y, Sinitsky M, Sinitskaya A, Matveeva V, Torgunakova E, Lazebnaya A, Stepanov A, Kutikhin A. Physiological Concentrations of Calciprotein Particles Trigger Activation and Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Monocytes. *Biochemistry (Mosc).* 2025;90(1):132-160. doi: 10.1134/S0006297924604064.

19. Ku KH, Dubinsky MK, Sukumar AN, Subramaniam N, Feasson MYM, Nair R, Tran E, Steer BM, Knight BJ, Marsden PA. In Vivo Function of Flow-Responsive Cis-DNA Elements of eNOS Gene: A Role for Chromatin-Based Mechanisms. *Circulation.* 2021;144(5):365-381. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.051078.

20. Jin YJ, Chennupati R, Li R, Liang G, Wang S, Iring A, Graumann J, Wettschureck N, Offermanns S. Protein kinase N2 mediates flow-induced endothelial NOS activation and vascular tone regulation. *J Clin Invest.* 2021;131(21):e145734. doi: 10.1172/JCI145734.

21. Cattaneo MG, Vanetti C, Decimo I, Di Chio M, Martano G, Garrone G, Bifari F, Vicentini LM. Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):9612. doi: 10.1038/s41598-017-10139-x.

22. Smith AR, Visioli F, Frei B, Hagen TM. Age-related changes in endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and nitric oxide dependent vasodilation: evidence for a novel mechanism involving sphingomyelinase and ceramide-activated phosphatase 2A. *Aging Cell.* 2006;5(5):391-400. doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00232.x.

23. Sansbury BE, Cummins TD, Tang Y, Hellmann J, Holden CR, Harbeson MA, Chen Y, Patel RP, Spite M, Bhatnagar A, Hill BG. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. *Circ Res.* 2012 Oct 12;111(9):1176-89. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.266395.
24. Bu S, Nguyen HC, Nikfarjam S, Michels DCR, Rasheed B, Maheshkumar S, Singh S, Singh KK. Endothelial cell-specific loss of eNOS differentially affects endothelial function. *PLoS One.* 2022;17(9):e0274487. doi: 10.1371/journal.pone.0274487.
25. Shu X, Keller TC 4th, Begandt D, Butcher JT, Biwer L, Keller AS, Columbus L, Isakson BE. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(23):4561-75. doi: 10.1007/s00018-015-2021-0.
26. Fries DM, Paxinou E, Themistocleous M, Swanberg E, Griendling KK, Salvemini D, Slot JW, Heijnen HF, Hazen SL, Ischiropoulos H. Expression of inducible nitric-oxide synthase and intracellular protein tyrosine nitration in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22901-7. doi: 10.1074/jbc.M210806200.
27. Singh A, Sventek P, Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells from prehypertensive spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1996;9(9):867-77. doi: 10.1016/s0895-7061(96)00104-5.
28. Di Pietro N, Di Tomo P, Di Silvestre S, Giardinelli A, Pipino C, Morabito C, Formoso G, Marigliò MA, Pandolfi A. Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: potential role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKIIdelta(2)). *Atherosclerosis.* 2013;226(1):88-94. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.062.
29. Preeclampsia is associated with loss of neuronal nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells of the human umbilical cord. Schönfelder G, Fuhr N, Hadziidakos D, John M, Hopp H, Paul M. *Histopathology.* 2004;44(2):116-28. doi: 10.1111/j.1365-2559.2004.01806.x.
30. Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 1998;83(12):1271-8. doi: 10.1161/01.res.83.12.1271.
31. Gomez-Alamillo C, Juncos LA, Cases A, Haas JA, Romero JC. Interactions between vasoconstrictors and vasodilators in regulating hemodynamics of distinct vascular beds. *Hypertension.* 2003;42(4):831-6. doi: 10.1161/01.HYP.0000088854.04562.DA.
32. Bruno RM, Ghiadoni L, Seravalle G, Dell'oro R, Taddei S, Grassi G. Sympathetic regulation of vascular function in health and disease. *Front Physiol.* 2012;3:284. doi: 10.3389/fphys.2012.00284.
33. Sheng Y, Zhu L. The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2018;10(1):17-28.
34. Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation.* 2013;20(3):239-47. doi: 10.1111/micc.12040.
35. Maruhashi T, Kihara Y, Higashi Y. Assessment of endothelium-independent vasodilation: from methodology to clinical perspectives. *J Hypertens.* 2018;36(7):1460-1467. doi: 10.1097/HJH.0000000000001750.

Для цитирования: Богданов Л.А., Кондратьев Е.А., Кошелев В.А., Мухамадияров Р.А., Канонькина А.Ю., Лазебная А.И., Тюрина А.Е., Кутихин А.Г. Сравнение экспрессии модифицированных форм эндотелиальной синтазы монооксида азота у гипер- и нормотензивных крыс. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2025;14(2): 110-126. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-2-110-126

To cite: Bogdanov L.A., Kondratiev E.A., Koshelev V.A., Mukhamadiyarov R.A., Kanonykina A.Yu., Lazebnaya A.I., Tyurina A.E., Kutikhin A.G. Comparison of modified endothelial nitric oxide synthase forms in hypertensive and normotensive rats. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2025;14(2): 110-126. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-2-110-126
