

УДК 612.66/68+612.173+612.897+53.083.2

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В СЕРДЦЕ ИНТАКТНЫХ И ДЕСИМПАТИЗИРОВАННЫХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА¹

© 2008 г. В. В. Андрианов, Ф. Г. Ситдинов*, Х. Л. Гайнутдинов, С. В. Юртаева, Г. Г. Яфарова,
Л. Н. Муранова, А. А. Обычный, Ф. К. Каримов*, В. М. Чиглинец*, В. С. Июдин

Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН им. Е.К. Завойского
420029 Казань, Сибирский тракт, д. 10/7

*Татарский государственный гуманитарно-педагогический университет
420021 Казань, ул. Татарстан, д. 2

E-mail: gainutdinov@mail.knc.ru

Поступила в редакцию 30.01.08 г.
Окончательный вариант получен 04.04.08 г.

Методом электронного парамагнитного резонанса с использованием спиновой ловушки анализировали продукцию оксида азота в тканях сердца у крыс разного возраста в норме, а также при фармакологической десимпатизации. В эксперименте были использованы крысы следующего возраста: 14-, 21-, 70- и 100-суточные. Обнаружено, что концентрация оксида азота, образующегося в тканях сердца крысы, в ходе онтогенеза существенно уменьшается. Фармакологическая десимпатизация сопровождается заметным снижением выработки оксида азота в сердце у 14- и 21-суточных крыс: уменьшается концентрация оксида азота в составе спиновой ловушки и количество R- и T-конформеров нитрозильных комплексов гемоглобина. У 70-суточных крыс фармакологическая десимпатизация не оказывает явного влияния на уровень содержащих оксид азота парамагнитных комплексов.

Ключевые слова: онтогенез, оксид азота, сердце, десимпатизация, электронный парамагнитный резонанс.

Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных посредников, участвующих в функционировании разнообразных систем организма. В жизнедеятельности позвоночных животных особо значима роль NO в функционировании сердечно-сосудистой системы (Марков, 2001). Коронарный и эндокардиальный эндотелий, кардиомиоциты в норме являются источником базальной продукции NO и регулируют функции сердца через сосудистозависимые и сосудистонезависимые эффекты (Kojda et al., 1997; Han et al., 1998; Сосунов, 2000; Ванин, 2001; Brutsaert, 2003; Ситдинова, Зефирова, 2006). NO контролирует сосудистый тонус, артериальное давление, коронарную вазодилатацию, пролиферацию эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудистой стенки, участвует в возникновении атеросклероза и гипертензий, регулирует сократимость миокарда и процессы сопряжения возбуждения и сокращения (Guo et al., 1995; Cooke, 1996; Chowdhary, 1999; Casadei, Sears, 2003; Piech et al., 2003). Избыточная продукция NO может прямо угнетать сократительную функцию миокарда, что наблюдается при острым ин-

фаркте миокарда; существует и противоположная точка зрения, согласно которой избыток NO служит компенсаторным фактором (Манухина, Мальшев, 2000; Реутов и др., 2003; Ismailova et al., 2005). Следовательно, актуальным является вопрос: какая концентрация NO стимулирует или угнетает те или иные функции организма. Показаны уменьшение под влиянием NO частоты спонтанных сокращений пейсмекерных клеток и противоположный эффект ингибирования NO-синтазы (NOS), что демонстрирует регуляторную роль системы NOS-NO-цГМФ, однако ряд авторов оспаривают роль этой системы в регуляции частоты сердечных сокращений (см.: Реутов и др., 2007). Детальный анализ показывает, что причиной расхождения точек зрения, возможно, являются разные условия экспериментов, в том числе разный возраст животных (Реутов и др., 2007). Таким образом, изучение содержания NO в тканях сердца в ходе онтогенеза представляет большой интерес.

Для исследования функционирования сердца применяются нарушение (фармакологическая десимпатизация) или исключение (перерезка холинэргических проводников) одного из отделов вегетативной нервной системы, а также раздражение

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 06-04-48834).

идущих к сердцу парасимпатических или симпатических нервов (Абзалов, Ситдииков, 1986; Зефилов, Святова, 1997; Миннахметов и др., 2002; Нигматуллина и др., 2002). В настоящее время распространённым способом исследования роли симпатической нервной системы в функционировании сердца является фармакологическая десимпатизация (Heath, Burnstock, 1977; Ситдииков, Савин, 1987; Зефилов, Святова, 1997; Нигматуллина и др., 2002). Установлено, что гуанетидин сульфат вызывает деструкцию более 90% симпатических нейронов и не оказывает влияния на нейроны других отделов вегетативной нервной системы сердца (Johnson, Manning, 1984; Родионов и др., 1988).

Цель исследования – в тканях сердца крысы изучить NO-содержащие парамагнитные комплексы иона железа в процессе онтогенеза и определить изменения содержания NO при фармакологической десимпатизации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для экспериментов использовали белых беспородных крыс различного возраста: 14-, 21-, 70- и 100-суточных. Изучали содержание NO в тканях сердца. Для деструкции нейронов симпатической системы применяли раствор гуанетидина сульфата (Абзалов, Ситдииков, 1986; Родионов, 1996; Зефилов, Святова, 1997), который ежедневно в одно и то же время начиная с 1-х сут жизни крысы в течение 28 сут вводили подкожно в физиологическом растворе из расчета 250 мг на кг массы тела животного.

В качестве спиновой ловушки для NO использовали диэтилдитиокарбамат (ДЭТК) натрия, который вводили крысам по методике, разработанной ранее (Микоян и др., 1994; Ванин, 2001). Методика приготовления образцов была подробно изложена нами ранее (Ismailova et al., 2005). Животным вводили водный раствор ДЭТК натрия в дозе 500 мг/кг в 2.5 мл воды внутривентриально и раствор цитрата железа (II) (сульфат железа (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, "Sigma", США) в дозе 37.5 мг/кг + цитрат натрия (х.ч.), 187.5 мг/кг) подкожно. ДЭТК натрия при взаимодействии с цитратом железа формирует водонерастворимый комплекс, который в свою очередь взаимодействует с NO, в результате чего образуется стабильный комплекс $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe-NO}$, который может быть зарегистрирован методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Через 40 мин после введения препаратов крысы декапитировали. Извлеченные ткани быстро просушивали и замораживали в жидком азоте. Масса образцов составляла 100 мг. Спектры ЭПР приготовленных образцов измеряли на спектрометре ЭПР X-диапазона ER-200E-SRC ("Bruker", Германия) при температуре жидкого азота (77 К). Измерения

проведены на образцах тканей сердца 21 интактной крысы и 25 десимпатизированных крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом ЭПР были изучены ткани сердца контрольных крыс 14-, 21-, 70- и 100-суточного возраста и крыс того же возраста, на которых была реализована модель десимпатизации. Анализировали изменение спектров ЭПР тканей (о содержании NO судили по интегральной интенсивности сигнала) в процессе онтогенеза, а также при фармакологической десимпатизации.

Во всех измеренных спектрах ЭПР регистрировали три типа парамагнитных комплексов иона железа с NO: комплекс на основе спиновой ловушки $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe-NO}$ и два типа комплексов железа в составе гема (Hb) с NO: R- и T-конформеры Hb-NO, которые в литературных данных обычно интерпретируют как шести- и пятикоординированные комплексы гемового железа в гемоглобине (Kon, 1968; Szabo et al., 1976). Спектр T-конформера без присутствия других сигналов возможно наблюдать только в случае пятикоординированного комплекса Fe(II)-NO для α -белковой цепи. В гемоглобине есть два типа белковых цепей – α и β , при присоединении NO к иону железа α -цепи возможны оба конформера, а при присоединении NO к β -цепи – только R-конформер (Nagai et al., 1978); таким образом, в суммарном спектре нитрозилгемоглобина практически всегда присутствуют оба конформера.

Соотношение интенсивностей сигналов всех перечисленных комплексов в тканях сердца крысы заметно отличалось в зависимости от возраста животного – от присутствия в спектрах только одного типа центров до наличия всех трех одновременно. Известно, что интегральная интенсивность сигнала ЭПР прямо пропорциональна концентрации парамагнитных комплексов (Ингрэм, 1972); этот факт лежит в основе оценки присутствия NO-содержащих комплексов в тканях. Для оценки их количества выполняли разложение наблюдаемого спектра на три основные компоненты: спектр ЭПР спиновой ловушки $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe-NO}$, спектр ЭПР R-конформера Hb-NO и спектр ЭПР T-конформера Hb-NO. Сигналы сравнивали по величине интегральной интенсивности, которую вычисляли путем двойного интегрирования.

Анализ спектров ЭПР тканей сердца 14- и 21-суточных крыс показал, что фармакологическая десимпатизация приводит к сильному снижению выработки NO (рис. 1). В то же время у крыс более старшего возраста (70-суточные) этот процесс практически не влиял на содержание образующегося NO в тканях сердца (рис. 2).

При сопоставлении спектров ЭПР тканей сердца у крыс разных возрастов было обнаруже-

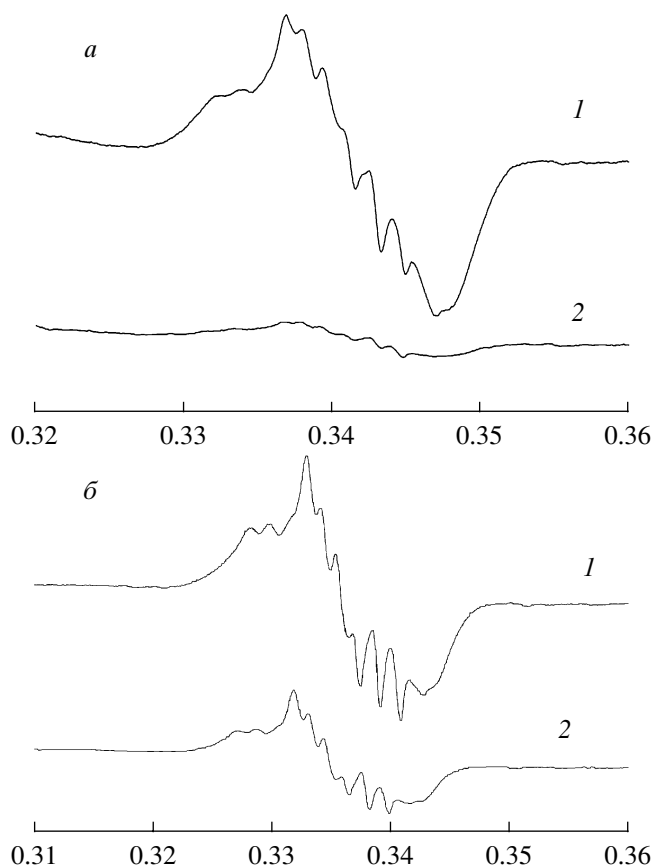


Рис. 1. Спектры электронного парамагнитного резонанса (интегральная интенсивность, относит. ед.) тканей сердца 14- (*a*) и 21-суточных (*б*) крыс: 1 – контрольные, 2 – десимпатизированные.

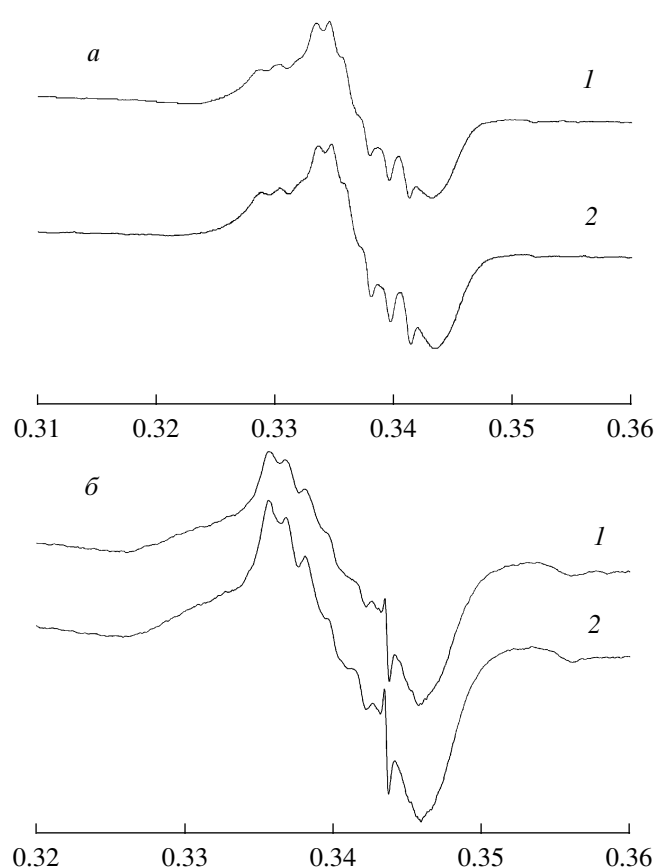


Рис. 2. Спектры электронного парамагнитного резонанса (интегральная интенсивность, относит. ед.) тканей сердца 70- (*a*) и 100-суточных (*б*) крыс: 1 – контрольные, 2 – десимпатизированные.

но, что число нитрозильных комплексов в тканях сердца крыс с возрастом уменьшается (рис. 3). Кроме того, показано, что для тканей сердца у крыс всех исследованных возрастов (14-, 21-, 70- и 100-суточных) было характерно большее содержание R-конформеров нитрозогемоглобинов относительно T-конформера, сигнал R-конформера был фактически основным в спектре. Этот факт объясняется особенностью тканей сердца, состоящей в том, что в сердечной мышце присутствует преимущественно миоглобин, для которого более характерна форма R-конформера (Ажипа и др., 1983).

ОБСУЖДЕНИЕ

По мере роста крыс происходят изменения в структуре и функциях сосудов и отделов сердца, которые со временем ведут к увеличению возможности кардиоваскулярных заболеваний (Marin, Rodriguez-Martinez, 1999). Кроме других механизмов интерес представляет также динамика синтеза NO в процессе постнатального развития, при патологических явлениях и при фармако-

логических воздействиях на сердце. Полученные нами результаты показывают, что содержание образующегося в тканях сердца крыс NO, измеренного по сумме сигналов в составе спиновой ловушки, R- и T-конформеров, в ходе онтогенеза уменьшается. Однако наши эксперименты не позволяют уточнить источник продукции NO. В одной из первых работ на эту тему было обнаружено, что в пренатальном онтогенезе эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) находится в эндокардиуме, однако когда миокард становится компактным, то eNOS сосудов становится доминирующей, а на момент рождения крыс распределение eNOS похоже на таковое у половозрелых животных (Ursell, Mayes, 1996). Другие авторы описали уменьшение активности митохондриальной NOS в сердце крыс в возрасте с 12 до 72 нед на 20% (Valdez et al., 2004). Отмечается также, что снижение с возрастом эндотелиального синтеза или освобождения NO ведет к снижению функции эндотелия в сердце (Marin, Rodriguez-Martinez, 1999; Brutsaert, 2003). Полного представления о динамике синтеза NO в процессе постнатального, особенно раннего, развития нет, учитывая, что источ-

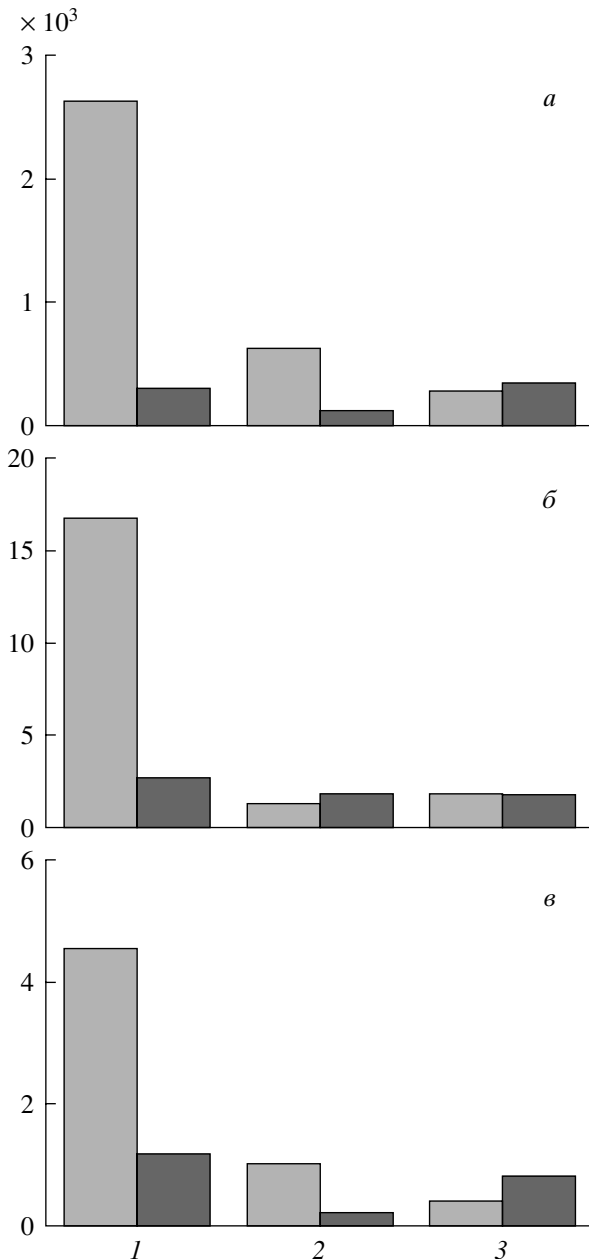


Рис. 3. Изменение количества NO-содержащих парамагнитных комплексов (*a* – (ДЭТК)₂-Fe-NO, *б* – R-конформер Hb-NO, *в* – T-конформер Hb-NO) в ткани сердца у контрольных (■) и десимпатизированных (■) крыс в онтогенезе.

По оси абсцисс – возраст крыс, сут: 1 – 14, 2 – 21, 3 – 70; по оси ординат – интегральная интенсивность спектра ЭПР, относит. ед.

ником NO может быть и нитроредуктазный путь (Реутов и др., 2003, 2007).

Сопоставление интегральных интенсивностей триплетного сигнала спиновой ловушки в тканях сердца крысы показало, что фармакологическая десимпатизация снижает выработку NO у 14- и 21-суточных животных. Наиболее сильный эф-

фект снижения (приблизительно в 10 раз) наблюдается в тканях сердца у 14-суточных крыс (рис. 1, 3). При этом наряду со спектрами от спиновой ловушки регистрировали и сигналы от комплексов Hb-NO. Из данных ЭПР (рис. 3) следует, что в результате фармакологической десимпатизации у 14- и 21-суточных крыс уменьшается продукция NO, входящего в состав всех перечисленных парамагнитных комплексов.

Крысы более старшего возраста (70- и 100-суточные) оказались менее подверженными воздействию десимпатизации: уровень NO-содержащих парамагнитных комплексов в тканях сердца либо незначительно повышался, либо оставался на прежнем уровне (как для R-конформеров Hb-NO).

Данные, полученные Малышевым и Манухиной (1998), показали практически полное подавление генерации NO при плавании крыс с тяжелым грузом и гиперпродукцию NO при острой гипоксии и тепловом ударе. Авторы высказали гипотезу о том, что стресс-реакция и долговременная адаптация приводят (или являются следствием) к уменьшению либо увеличению продукции NO. В наших исследованиях 14- и 21-суточных крыс рассмотрено влияние длительности процесса десимпатизации на динамику синтеза NO.

Выяснено, что десимпатизация наиболее сильно сказывается на продукции NO в раннем возрасте. Известно, что в этот период у крыс (14–42-е сут) в регуляции деятельности сердца наиболее активна симпатическая нервная система (Аникина и др., 2002), а после 6-недельного возраста роль адренергической системы в регуляции работы сердца уменьшается (Ситдииков, Савин, 1987). Это, по-видимому, также отражается в уменьшении влияния десимпатизации на выработку NO у крыс этого возраста. Не исключено, что в процессе роста и развития организма, когда роль симпатической нервной системы в выработке NO снижается, возникают другие механизмы, не связанные с работой симпатического отдела вегетативной нервной системы, компенсирующие выработку NO до физиологического уровня.

Характер изменения уровня NO в тканях сердца крысы исследованных возрастов, в том числе при десимпатизации, при которой происходит деструкция большинства симпатических нейронов, видимо, свидетельствует о том, что большое количество NO в раннем возрасте либо производится симпатическими нейронами непосредственно, либо ими стимулируется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абзалов Р.А., Ситдииков Ф.Г. Влияние десимпатизации гуанетидином на функции сердца крысят // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1986. № 2. С. 141–144.

- Ажина Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. и др.* Конформационные изомеры комплексов гемоглобина с окисью азота, возникающие в крови при действии нитрита натрия // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1983. № 2. С. 240–250.
- Аникина Т.А., Билалова Г.А., Ситдииков Ф.Г.* Влияние электрической стимуляции правого звездчатого ганглия на деятельность сердца крыс в постнатальном онтогенезе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. № 4. С. 377–379.
- Ванин А.Ф.* Оксид азота – регулятор клеточного метаболизма // Сорос. образоват. журн. 2001. Т. 7. № 11. С. 7–12.
- Зефиоров Т.Л., Святова Н.В.* Влияние ваготомии на ритм сердца интактных и десимпатизированных крыс разного возраста // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1997. № 7. С. 21–24.
- Ингрэм Д.* Электронный парамагнитный резонанс в биологии. М.: Мир, 1972. 297 с.
- Мальшиев И.Ю., Манухина Е.Б.* Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 992–1006.
- Манухина Е.Б., Мальшиев И.Ю.* Стресс-лимитирующая система оксида азота // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2000. Т. 86. № 10. С. 1283–1292.
- Марков Х.М.* Оксид азота и сердечно-сосудистая система // Успехи физиол. наук. 2001. Т. 32. № 3. С. 49–65.
- Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Ванин А.Ф.* Оксид азота образуется через L-аргинин зависимый путь в мозге мышей *in vivo* // Биофизика. 1994. Т. 39. С. 915–918.
- Миннахметов Р.Р., Гиззатуллин А.Р., Ситдииков Ф.Г. и др.* Влияние ваготомии на сердечную деятельность крыс в постнатальном онтогенезе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. № 1. С. 14–16.
- Нигматуллина Р.Р., Хурамышин Н.Г., Насырова А.Г.* Влияние десимпатизации на насосную функцию сердца в постнатальном онтогенезе крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2002. Т. 88. № 12. С. 1567–1577.
- Реутов В.П., Сорокин Е.Г., Косицын Н.С. и др.* Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности. М.: УРСС, 2003. С. 24–25.
- Реутов В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В. и др.* Оксид азота и цикл в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты // Успехи физиол. наук. 2007. Т. 38. № 4. С. 39–58.
- Родионов И.М.* Фактор роста нервов, гипертрофия и деструкция симпатической системы в эксперименте // Сорос. образоват. журн. 1996. Т. 2. № 3. С. 17–22.
- Родионов И.М., Ярыгин В.Н., Мухаммедов А.А.* Иммунологическая и химическая десимпатизация. М.: Наука, 1988. 150 с.
- Ситдиикова Г.Ф., Зефиоров А.Л.* Газообразные посредники в нервной системе // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92. № 7. С. 872–882.
- Ситдииков Ф.Г., Савин В.Ф.* Влияние химической десимпатизации на возрастную динамику сердечного ритма и чувствительность сердца к адреналину и ацетилхолину // Физиол. журн. СССР. 1987. Т. 73. № 1. С. 76–82.
- Сосунов А.А.* Оксид азота как межклеточный посредник // Сорос. образоват. журн. 2000. Т. 6. № 12. С. 27–34.
- Brutsaert D.L.* Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity // Physiol. Rev. 2003. V. 83. P. 59–115.
- Casadei B., Sears E.C.* Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2003. V. 82. P. 67–80.
- Chowdhary S.* Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic function // Clin. Sci. 1999. V. 97. P. 5–17.
- Cooke J.P.* Role of nitric oxide in procession and regression of atherosclerosis // West J. Med. 1996. V. 164. P. 419–424.
- Guo J.-P., Panday M.M., Consigny P.M. et al.* Mechanisms of vascular preservation by a novel NO donor following rat carotid artery intimal injury // Am. J. Physiol. 1995. V. 269. № 3. P. H122–H131.
- Han X., Kobzik L., Severson D., Shimoni Y.* Characteristics of nitric oxide – mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node // J. Physiol. 1998. V. 509. № 3. P. 741–54.
- Heath I.W., Burnstock G.* Selectivity of neuronal degeneration production by chronic guanethidine treatment // J. Neurocytol. 1977. V. 6. № 4. P. 397–405.
- Ismailova A.I., Gnezdilov O.I., Muranova L.N. et al.* ESR study of the nitric oxide production in tissues of animals under the external influence on the functioning of the cardiovascular and nervous systems // Appl. Magn. Res. 2005. V. 28. P. 421–430.
- Johnson J.E., Manning P.T.* Guanethidine-induced destruction of sympathetic neurons // Int. Rev. Neurobiol. 1984. V. 25. P. 1–37.
- Kojda G., Kottenberg K., Noak E.* Inhibition of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase induced cardiodepressive effects in normal rat hearts // Eur. J. Pharmacol. 1997. V. 334. P. 181–190.
- Kon H.* Paramagnetic resonance study of nitric oxide hemoglobin // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 4350–4355.
- Marin J., Rodriguez-Martinez M.A.* Age-related changes in vascular responses // Exp. Gerontol. 1999. V. 34. P. 503–512.
- Nagai K., Hori H., Yoshida S. et al.* The effect of quaternary structure on the state of the α and β subunits within nitrosil haemoglobin. Low temperature photodissociation and ESR spectra // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 532. P. 17–28.
- Piech A., Dessy C., Havaux X. et al.* Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats // Cardiovasc. Res. 2003. V. 57. P. 456–467.
- Szabo A., Perutz M.F., Szabo A.* Equilibrium between six- and five- coordinated hemes in nitrosilhemoglobin: Interpretation of electron spin resonance spectra // Biochemistry. 1976. V. 15. P. 4427–4428.
- Ursell P.C., Mayes M.* Endothelial isoform of nitric oxide synthase in rat heart increases during development // Anat. Rec. 1996. V. 246. P. 465–472.
- Valdez L.B., Zaobornyj T., Alvarez S. et al.* Heart mitochondrial nitric oxide synthase. Effects of hypoxia and aging // Mol. Aspects Med. 2004. V. 25. P. 49–59.

Changes in Nitric Oxide in Heart of Intact and Sympathectomized Rats of Different Age

V. V. Andrianov^a, F. G. Sitdikov^b, Kh. L. Gainutdinov^a, S. V. Yurtaeva^a, G. G. Yafarova^a, L. N. Muranova^a, A. A. Obynochnyi^a, F. K. Karimov^b, V. M. Chiglintsev^b, and V. S. Iyudin^a

^a Kazan Physicotechnical Institute, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Sibirskii trakt 10/7, Kazan, 420029 Russia

^b Tatar State Humanitarian Pedagogical University, ul. Tatarstan 2, Kazan, 420021 Russia
e-mail: gainutdinov@mail.knc.ru

Abstract—Nitric oxide production in heart tissues of rats of different age in the norm and after pharmacological sympathectomy was studied by electron spin resonance spin-trapping. Rats at the age of 14, 21, 70, and 100 days were used in the experiment. The concentration of nitric oxide produced in rat heart tissues proved to considerably decrease during ontogeny. Pharmacological sympathectomy notably decreased nitric oxide production in the heart in 14- and 21-day-old rats: the nitric oxide concentration in the spin trap as well as the level of R and T conformers of hemoglobin nitrosyl complexes decreased. In 70-day-old rats, pharmacological sympathectomy had no notable effect on the level of nitric oxide-containing paramagnetic complexes.

Key words: ontogeny, nitric oxide, heart, sympathectomy, electron spin resonance.