© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

РОЛЬ ИНДУЦИРОВАННОЙ NO-СИНТАЗЫ В ЭНДОТЕЛИЙ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА АРТЕРИАЛЬНЫХ СОСУДОВ ПРИ АДАПТАЦИИ КОРОТКИМИ СТРЕССОРНЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ

ЛАЗУКО С.С.*, СОЛОДКОВ А.П., ШИЛИН К.А.***

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»
**УО «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

Резюме.
Цель настоящей работы состояла в том, чтобы оценить вклад монооксида азота, образуемого индуцированной NO-синтазой, в изменение эндотелий-зависимой вазодилатации и α_1-адренореактивности изолированного кольца аорты крыс, адаптированных короткими стрессорными воздействиями.
Опыты были проведены на препаратах изолированного кольца аорты крыс, адаптированных короткими стрессорными воздействиями. Повторяющиеся короткие стрессорные воздействия приводили к развитию окислительного стресса и увеличивали образование монооксида азота, синтезируемого индуцированной NO-синтазой, в клетках аорты. Активация индуцированной NO-синтазы в результате адаптации к стрессу играет важную роль в сохранении количества биодоступного NO, способного обеспечить эндотелий-зависимые механизмы регуляции тонуса артериальных сосудов.

Ключевые слова: индуцированная NO-синтаза, вазодилатация, тонус сосудов, адаптация.

Abstract.
The purpose of the given research was to estimate the contribution of nitrogen monoxide formed by the induced NO-synthase (iNOS) to the modification of endothelium-dependent vasodilatation and α_1-adrenoreactivity of isolated aortic rings of rats adapted by short stress stimulation.
Experiments were carried out on the preparations of isolated aortic rings of rats adapted by short stress stimulation. Repeated short stress stimulation resulted in the development of oxidative stress and the increase in the formation of nitrogen monooxide, synthesized by the iNOS in the aortic cells. The induced NO-synthase activation as a result of adaptation to stress plays an important role in the maintenance of the amount of bioavailable NO, capable of providing endothelium-dependent mechanisms of arterial vascular tone regulation.

Key words: induced NO-synthase, vasodilatation, vascular tone, adaptation.

При инфаркте миокарда, гипертензии, стенокардии, кардиомиопатиях, сердечной недостаточности и других заболеваниях обнаруживается высокая активность и экспрессия индуцированной NO-синтазы (iNOS), которая сопровождается выраженным ростом уровня оксида азота в миокарде и развитием нарушения функции сердечно-сосудистой системы [1]. Адаптация сердца короткими интервалами ишемии, так же, как и короткими стрессорными воздействиями, проявляется уменьшением размера зоны инфаркта, улучшением сократительной функции снижением появления аритмий во время реперфузии, а также улучшением функции эндотелия [2]. При этих состояниях увеличивается образование монооксида азота (NO), к адаптогенным эффектам которого можно отнести его способность стимулировать образование белков теплового шока (HSP-70), которые защищают клетку от ишемии, уменьшают активность апоптоза, выраженность некроза, и снижают выраженность воспаления [3]. Кроме того, благодаря активации циклооксигеназы и супероксиддисмутазы монооксид азота способен увеличивать синтез цитопротективных простагландинов E2 и I2 и мощность антиоксидантных систем [4]. Также был установлен факт участия монооксида

азота в адаптации организма к физическим нагрузкам. Остается неясным вопрос, образуется ли iNOS в стенке сосудов при адаптации короткими стрессорными воздействиями и каков вклад образуемого ею NO в эндотелий-зависимую дилатацию и α_1-адренореактивность артериальных сосудов.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы оценить вклад монооксида азота, образуемого индуцированной NO-синтазой, в изменение эндотелий-зависимой вазодилатации и α_1-адренореактивности изолированного кольца аорты крыс, адаптированных короткими стрессорными воздействиями.

Методы

Исследование проводилось на 28 белых нелинейных крысах-самках массой 180-220 г. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Для устранения влияния сезонной и циркадной зависимости на исследуемые показатели эксперименты проводились в весенне-летний период в первой половине дня. Все животные находились в одинаковых условиях. Эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями Женевской конвенции «Internetional Guiding Principals for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990).

Животные были подразделены на группы: 1-ая - контрольная (n=7); 2-ая - группа животных, адаптированных короткими стрессорными воздействиями (n=7).

Кольца аорты шириной по 3 мм иссекали из средней трети грудной аорты и помещали в термостатируемые ванночки, наполненные раствором Кребса-Хензелайта следующего состава (мМ/л): NaCl – 118; KCl – 4,8; $MgSO_4$ – 1,18; KH_2PO_4 – 1,2; $CaCl_2$ – 2,5; $NaHCO_3$ – 25,0; глюкоза – 11; pH – 7,4; насыщенным карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2) при температуре 37°С.В течение периода стабилизации, который составлял 2 часа, каждые 15 минут обновляли, омывающий препарат аорты, раствор Кребса-Хензелайта. Эксперимент проводили на приборе Schuler Organ bath Type 809 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ). Кольцо аорты сокращалось в изометрическом режиме (датчик силы F30 Type372 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ). Вазоконстрикцию изучали путем введения в перфузионный раствор возрастающих концентраций α1-адреностимулятора фенилэфрина (от 10^{-15} до 10^{-6}М). На высоте предсокращения препарата и после его стабилизации в ванночку добавляли ацетилхолин в дозозависимой манере от 1×10^{-10} до 3×10^{-5}М. Таким образом, вазоконстрикцию и вазодилатацию изучали на одном и том же сегменте аорты. Для выяснения роли iNOS использовали ее высокоселективный блокатор S-метилизотиомочевину (S-MT) (10 мкМ, Sigma, США). О чувствительности сосудов сердца судили по величине EC_{50}, представляющей собой концентрацию исследуемого вещества, вызывающую 50% ответную реакцию аортальных колец.

Адаптацию короткими стрессорными воздействиями проводили по следующей схеме: крысу помещали в пластиковый пенал и опускали вертикально в воду (t=22-23°С) до уровня шеи в первый день на 5 минут, второй день на 10, в третий день на 15 минут. После двухдневного перерыва процедуру повторяли по той же схеме. Через сутки животных брали в эксперимент [5].

Оценку активности процесса перекисного окисления липидов и общую антиоксидантную активность в плазме крови производили на биохемилюминометре БХЛ-06 (Россия). Для оценки активности перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности плазмы регистрировали максимальную интенсивность свечения (Imax, мВ), пропорциональную уровню перекисного окисления липидов, светосумму (S, мВ×сек) свечения, обратно пропорциональную антиоксидантной активности.

Определение стабильных продуктов деградации монооксида азота проводилось в плазме крови крыс. Метод основан на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди, с последующим фотометрическим определением нитрит ионов с помощью реакции Грисса [6].

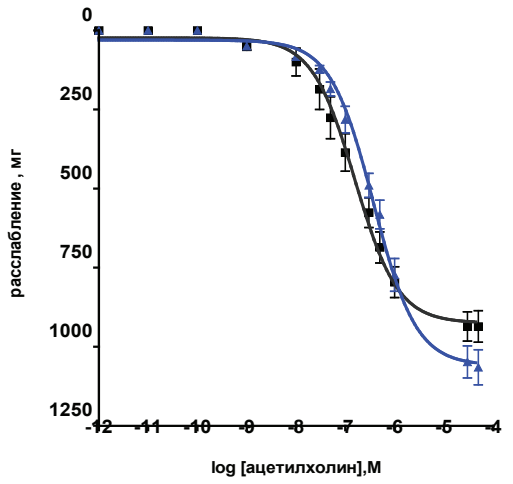
Обработка полученных результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 6.0, а также программного обеспечения GraphPad Prism (San Diego, California, USA).

Результаты

Эндотелийзависимая дилатация изолированного кольца аорты. В контрольной группе животных после добавления ацетилхолина дилатация кольца аорты начиналась при концентрации 3×10^{-8}М и составляла 12%. Максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе 3×10^{-5}М и достигала 60% (рис. 1). Величина EC_{50} равнялась $1{,}66\times10^{-7}$М. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-MT в контрольной группе животных не оказало влияние на выраженность эндотелийзависимой дилатации и величину EC_{50}.

После адаптации животных короткими стрессорными воздействиями, дилатация изолированного кольца аорты, так же, как и в контроле, начиналась при концентрации ацетилхолина в ванночке 3×10^{-8}М (составляла 11%),а максимальная ее величина достигала 70% при концентрации ацетилхолина 3×10^{-5}М ($p<0{,}05$, по сравнению с контролем, рис. 1). Однако чувствительность гладкомышечных клеток аортальных сосудов к ацетилхолину между группами не различалась (EC50 составила при «адаптации» – $1{,}84\times10^{-7}$М, в контроле – $1{,}66\times10^{-7}$М. Инкубирование сегмента аорты с S-MT уменьшало эндотелийзависимую вазодилатацию. Дилатация изолированного кольца аорты начиналась при концентрации ацетилхолина 3×10^{-8}М и была выражена в 2 раза меньше по сравнению с контролем, а ее максимум достигался при концентрации ацетилхолина 3×10^{-5}М и составлял всего лишь 43% (в контроле - 60%, $p<0{,}05$). Чувствительность гладкомышечных клеток аортальных сосудов уменьшилась и составила $8{,}84\times10^{-7}$М ($p<0{,}05$, по сравнению с контролем).

Адренергическая констрикция кольца аорты. Дозозависимое (от 10^{-15} до 10^{-6} М) введение α_1-адреностимулятора фенилэфрина приводило к увеличению сократительной активности изолированного кольца аорты крысы. В контрольной группе животных прирост напряжения изолированного кольца начинался при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М (прирост 15% от исходного напряжения), а при концентрации 10^{-6} М ответная реакция достигала максимального значения 94%. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-MT в контрольной группе животных не оказало влияние на выраженность адренергической констрикции кольца аорты (рис. 2).



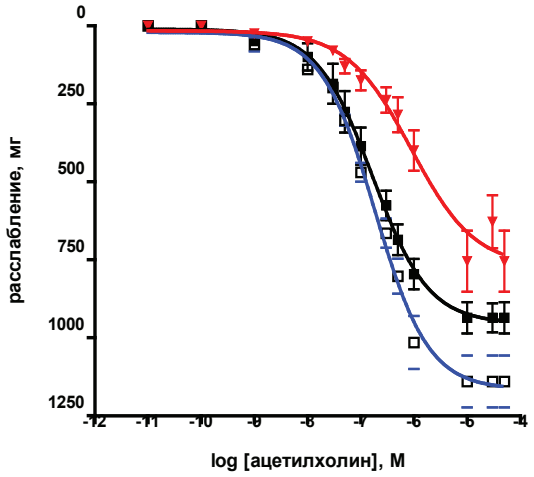


Рисунок 1 – Влияние возрастающих концентраций ацетилхолина на величину дилататорного ответа изолированного кольца аорты адаптированных животных на фоне введения S-метилизотиомочевины.

Примечание: по оси абсцисс – log концентрации ацетилхолина (М); по оси ординат – процент расслабления, развившегося в ответ на введение в перфузионный раствор ацетилхолина, * - $p<0{,}05$, по сравнению с контролем. ■ – контроль, ▲ – контроль + S-метилизотиомочевина, □ – адаптация, ▼ – адаптация+S-метилизотиомочевина.

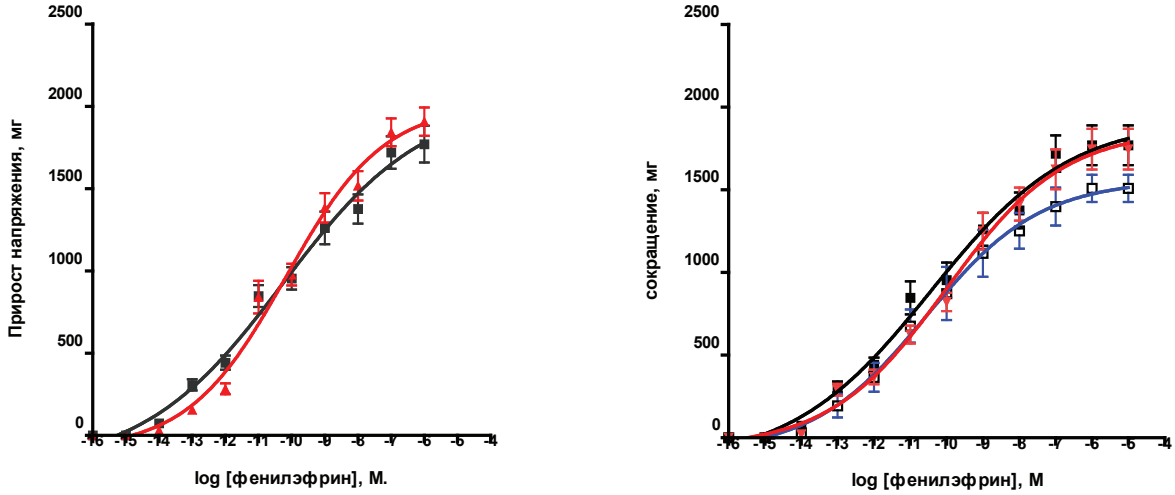


Рисунок 2 – Влияние возрастающих концентраций фенилэфрина на величину сократительного ответа изолированного кольца аорты адаптированных животных на фоне введения S-метилизотиомочевины.
Примечание: по оси абсцисс – log концентрации фенилэфрина (М); по оси ординат – процент сокращения, в ответ на введение в перфузионный раствор фенилэфрина,
* - p<0,05, по сравнению с контролем. ■ – группа «контроль», ▲ – «контроль + S-метилизотиомочевина», □ – «адаптация», ▼ – «адаптация + S-метилизотиомочевина».

В группе животных, адаптированных короткими стрессорными воздействиями, сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М (прирост 11% от исходного напряжения), достигая максимума при 10^{-6} М (прирост 85% от исходного напряжения) (рис. 2). Следовательно, в группе адаптированных животных при реакции на фенилэфрин наблюдалось несущественное снижение сократительного ответа гладкомышечных клеток артериальных сосудов. После адаптации короткими стрессорными воздействиями чувствительность аортальных сосудов к фенилэфрину не отличалась от контроля (в группе «адаптация» EC_{50} – $2{,}73\times10^{-11}$М, против контроля EC_{50} – 3,65×10-11М).

После добавления в перфузионный раствор ингибитора iNOSS-MT в группе животных, адаптированных короткими стрессорными воздействиями, сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина 10^{-13} М (прирост 16% от исходного напряжения), достигая максимума при 10^{-6} М (прирост 99% от исходного напряжения). Таким образом, инкубация сегмента аорты с S-MT возвращала сократительную реакцию гладкихмиоцитов, вызываемую фенилэфрином к контрольным показателям, чувствительность кольца аорты к фенилэфрину при этом не изменялась по сравнению с контрольными показателями, EC_{50} составляла $9{,}92\times10^{-11}$М.

Адаптация к коротким стрессорным воздействиям не оказала влияния на интенсивность перекисного окисления липидов (Imax) и антиоксидантную активность (S, обратно пропорциональна суммарной хемилюминесценции) по сравнению с контрольными животными (табл. 1). Содержание NO_2/NO_3 в плазме крови контрольных крыс составило 29,2±1,45 мкМ/л, а в группе адаптированных животных наблюдалось достоверное увеличение данных показателей (табл. 1).

Обсуждение

В результате проведенных экспериментов установлено, что высокое содержание в плазме крови продуктов деградации монооксида азота закономерно приводило к усилению эндотелий-зависимой вазодилатации изолированного кольца аорты адаптированных крыс, в ответ на введение в перфузион-

Таблица 1 – Изменение интенсивности перекисного окисления липидов и общей антиоксидантной активности, а также концентрации нитратов/нитритов у адаптированных короткими стрессорными воздействиями животных

Группы	I max, Мв	S, мв×сек	NO_2/NO_3 мкМ/л
Контроль (n=7)	1,137±0,042	10,4±0,3	29,2±1,45
Адаптация (n=7)	1,163±0,042	11,0±0,2	34,2±2,7*

Примечание: * - p<0,05 по сравнению с контролем; n-количество животных в группе.

ный раствор ацетилхолина. Добавление в органную ванночку селективного ингибитора индуцируемой NO-синтазы S-MT, в группе адаптированных животных, ухудшало эндотелий-зависимую вазодилатацию, указывая на чрезвычайно важную роль iNOS для сохранения нормальных взаимоотношений в регуляторных механизмах тонуса артериальных сосудов при адаптации, особенно в регуляции эндотелий-зависимой дилатации.

Этот факт указывает на то, что при адаптации короткими стрессорными воздействиями возрастает роль монооксида азота, синтезируемого индуцируемой NO-синтазой. Вышеприведенные рассуждения наводят на мысль о том, что при адаптации некоторая часть NO, продуцируемого как эндотелиальной (eNOS), так и индуцируемой NO-синтазами, по-видимому, связывается с супероксид-радикалом, тем самым исключаясь из процесса вазодилатации, но при этом, не позволяя увеличиться активности свободнорадикального окисления. Подобное явление получило название «уменьшение биодоступности NO», и при адаптации короткими стрессорными воздействиями оно продемонстрировано впервые. Таким образом, образование индуцируемой NO-синтазы необходимо для того, чтобы поддержать на должном уровне продукцию вазоактивного NO, обеспечить который единственная эндотелиальная NO-синтаза в данных условиях уже не способна.

Важным является и тот факт, что влияние значительного образования NO практически бесследно проходит в отношении адренореактивности. Данный факт еще раз подтверждает наше предположение об использовании монооксида азота в клетке в качестве молекулы-ловушки супероксидрадикала. Кроме того, Манухиной Е.Б. было показано, что некоторое количество монооксида азота при адаптации переходит в депонированную форму и затем при необходимости высвобождается [7].

Наиболее вероятным стимулом, экспрессирующим гены, ответственные за синтез мРНК iNOS, является выраженный окислительный стресс, характерный для начальных стадий адаптации [8]. Вполне вероятно, что при вовлечении NFkB он способен активировать гены, ответственные за синтез индуцированной NO-синтазы, появление активности которой доказано в наших экспериментах с использованием ее селективного ингибитора S-MT.

Таким образом, при адаптации короткими стрессорными воздействиями параллельно с развитием окислительного стресса увеличивается образование монооксида азота, синтезируемого iNOS. Активация индуцированной NO-синтазы в результате адаптации к стрессу играет важную роль в сохранении количества биодоступного NO, способного обеспечить эндотелий-зависимые механизмы регуляции тонуса артериальных сосудов.

Заключение

На основании представленных данных можно заключить, что при адаптации короткими стрессорными воздействиями возрастает значение NO, образуемого индуцированной NO-синтазой как в регуляции сосудистого тонуса, так и в усилении антиоксидантной защиты клетки.

Литература

1. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction

and higher mortality after myocardial infarction in mice / Q.Feng [et al.] // Circulation. – 2001. – 104, № 6. – P. 700–704.
2. Bolli, R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research /R.Bolli // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2001. – 33, №11. – P. 1897–18.
3. Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70 / S.U. Trost [et al.] //J Clin Invest. – 1998. - Vol.101. – P. 855–862.
4. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors / V. Mollace [et al.] //Pharmacol Rev. – 2005. - Vol. 57. – P. 217–252.
5. Манухина, Е.Б. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите / Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев, Ю.В. Архипенко // Вестник РАМН. – 2000. – № 4. – С. 16-20.
6. Веремей, И.С. Восстановление NO_2/NO_3 цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди / И.С. Веремей, А.П. Солодков // Сборник научных трудов. – Витебск, 1999. – С. 274-277.
7. Депонирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе / Е.Б. Манухина [и др.] // Известия РАН. Сер.биологическая. – 2002. – № 5. – С. 585-596.
8. Меерсон, Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшенникова. – М.: Медицина, 1988. – 252 с.

Поступила 11.10.2013 г.
Принята в печать 06.12.2013 г.

Сведения об авторах:
Лазуко С.С. – к.б.н., доцент кафедры нормальной физиологии УО «ВГМУ»;
Солодков А.П. – д.м.н., профессор, ректор УО «ВГУ»;
Шилин К.А. – магистрант кафедры нормальной физиологии УО «ВГМУ».

Адрес для корреспонденции: 210023, г.Витебск, пр-т Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра нормальной физиологии. E-mail: lazuko71@mail.ru – Лазуко Светлана Степановна.