

С. А. Таланов, А. В. Коцюрба, Ю. П. Коркач,
член-корреспондент НАН Украины В. Ф. Сагач

Изменения синтеза оксида азота в сердечно-сосудистой системе у крыс с хроническим дефицитом церебрального дофамина

Показано, що у щурів з хронічним (3–4 міс.) дефіцитом церебрального дофаміну в тканинах серцево-судинної системи (еритроцитах, плазмі крові, гомогенаті серця і мітохондріях міокарда) відбуваються зміни в синтезі і метаболізмі NO: пригнічення активності конститутивної NO-синтази і посилення роботи її індукційної ізоформи, активація конкурентного аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, збільшення пулів нітрату на фоні зменшення вмісту нітриту. При цьому рівень цих порушень залежить від ступеня дегенерації нігостриатної дофамінергічної системи. Зроблено висновок, що зміни в синтезі і метаболізмі NO знаходяться в основі показаного нами раніше розвитку серцево-судинних розладів у цих тварин. Подібні механізми можуть бути причиною вегетативних розладів і у пацієнтів з хворобою Паркінсона.

За последнюю четверть века было установлено, что оксид азота (NO) является важным фактором многих как физиологических, так и патофизиологических процессов. Он принимает участие в регуляции функций буквально всех систем организма. Кроме всего прочего, NO может регулировать и продолжительность жизни клетки. Показано, что он способен как запускать механизмы апоптоза [1], так и тормозить его развитие [2]. Апоптотическая гибель клеток лежит в основе развития нейродегенеративных заболеваний, в том числе и болезни Паркинсона (БП). Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что гибель дофаминэргических клеток черной субстанции, лежащая в основе патогенеза БП, происходит преимущественно путем апоптоза [3].

Основным проявлением БП является нарушение пластичности двигательного акта. Однако в дальнейшем развитие болезни сопровождается вегетативными расстройствами, в том числе эндотелиальной дисфункцией и сердечной недостаточностью. Однако в связи с тем, что пациентами с БП являются, как правило, люди пожилого возраста, причиной ухудшения функционального состояния их сердечно-сосудистой системы (ССС) многие исследователи считают неспецифические возрастные изменения. Недавно на модели гемипаркинсонизма у крыс нами было показано, что у молодых животных с хроническим дефицитом церебрального дофамина (ДА) также имеет место дисфункция эндотелия [4] и нарушение сократительной функции миокарда [5].

Известно, что подобные нарушения при старении, диабете и других патологиях сопровождаются изменением в системе NO. Роли NO в регуляции функций ССС посвящено огромное количество работ. Однако результаты исследований неоднозначны и достаточно противоречивы. Поэтому цель нашего исследования состояла в изучении предполагаемых изменений синтеза NO у крыс с хроническим дефицитом церебрального ДА и его роли в развитии дисфункции ССС у этих животных.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 6–7-месячных самцах крыс линии Вистар. Исследовано три группы животных по пять особей в каждой. I группа слу-

жила контролем. Во II и III группы входили животные с хроническим (3–4 мес.) дефицитом нигростриатного ДА в левом полушарии вследствие односторонней стереотаксической инъекции в левый восходящий латеральный пучок переднего мозга селективного нейротоксина 6-гидроксидофамина. В опыт брали животных с незначительной (в среднем 44% — II группа) и существенной (в среднем 96% — III группа) деструкцией нигростриатной ДА-эргической системы левого полушария. Методика повреждения ДА-синтезирующих клеток компактной части черной субстанции и определения степени односторонней дегенерации ДА-эргической системы описана в работе [6].

В плазме крови, эритроцитах, гомогенате сердца и митохондриях миокарда определяли активность изоферментов NO-синтаз (NOS) и аргиназы, а также уровни стабильных метаболитов NO — нитрита (NO_2^-) и нитрата (NO_3^-) анионов.

Активность NOS определяли, используя комбинацию классического метода [7] и его современную модификацию [8], адаптированную к спектрофотометрическому измерению одного из продуктов реакции L-цитрулина. Аликвоты грубых гомогенатов тканей, содержащих 0,5–1,0 мг белка, инкубировали в общем объеме 1 мл субстратной смеси следующего состава, мкмоль/мл: KH_2PO_4 — 50, MgCl_2 — 1, CaCl_2 — 2, НАДФН — 1, L-аргинин — 2, pH 7,0, в течение 60 мин при 37 °С. Реакцию останавливали, добавляя 0,3 мл 2 N HClO_4 . Контролем служили пробы, содержащие полную субстратную смесь, и предварительно денатурированный 2 N HClO_4 белок. Смесь центрифугировали и в надосадочной безбелковой смеси определяли содержание L-цитрулина высокоспецифичным спектрофотометрическим методом по цветной реакции с антипирином.

Для определения активности кальцийнезависимой индуцибельной NOS (iNOS) в инкубационную смесь вместо CaCl_2 добавляли 2 мкмоль ЭДТА. Активность кальцийзависимой конститутивной NOS (cNOS) рассчитывали по разнице суммарной активности NOS и активности iNOS. Активность фермента выражали в пикомолях образованного L-цитрулина за 1 мин в перерасчете на 1 мг общего белка в пробе.

Содержание NO_2^- определяли в безбелковых аликвотах проб в колориметрической реакции при использовании реактива Гриса методом Грина [9]. Реактив Гриса готовили, смешивая 0,1%-й водный раствор нафтилэтилендиаминдигидрохлорида с 1%-м раствором сульфаниламина в 5% H_3PO_4 в равных частях непосредственно перед измерением. Количество NO_2^- рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием NaNO_2 .

Содержание NO_3^- определяли спектрофотометрически бруциновым методом в безбелковых аликвотах проб [9]. Аликвоты проб инкубировали с бруциновым реактивом при 100 °С в течение 10 мин, после чего охлаждали и определяли величину экстинкции при длине волны 405 нм. Бруциновый реактив готовили, растворяя 60 мг бруцина в 100 мл 50%-й серной кислоты. Количество NO_3^- рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием NaNO_3 .

Содержание общего белка определяли методом Бредфорда с использованием красителя Cumassi G-250 (“Ferak”, Германия).

Эритроциты выделяли центрифугированием, после чего их трижды промывали физиологическим раствором. Отбирали плазму, обогащенную тромбоцитами и лейкоцитами. Методика выделения митохондрий описана ранее [10].

Данные обрабатывали статистически с использованием компьютерных программ.

Результаты и их обсуждение. Согласно полученным данным, активность iNOS в плазме крови, эритроцитах, гомогенате сердца и митохондриях миокарда исследованных

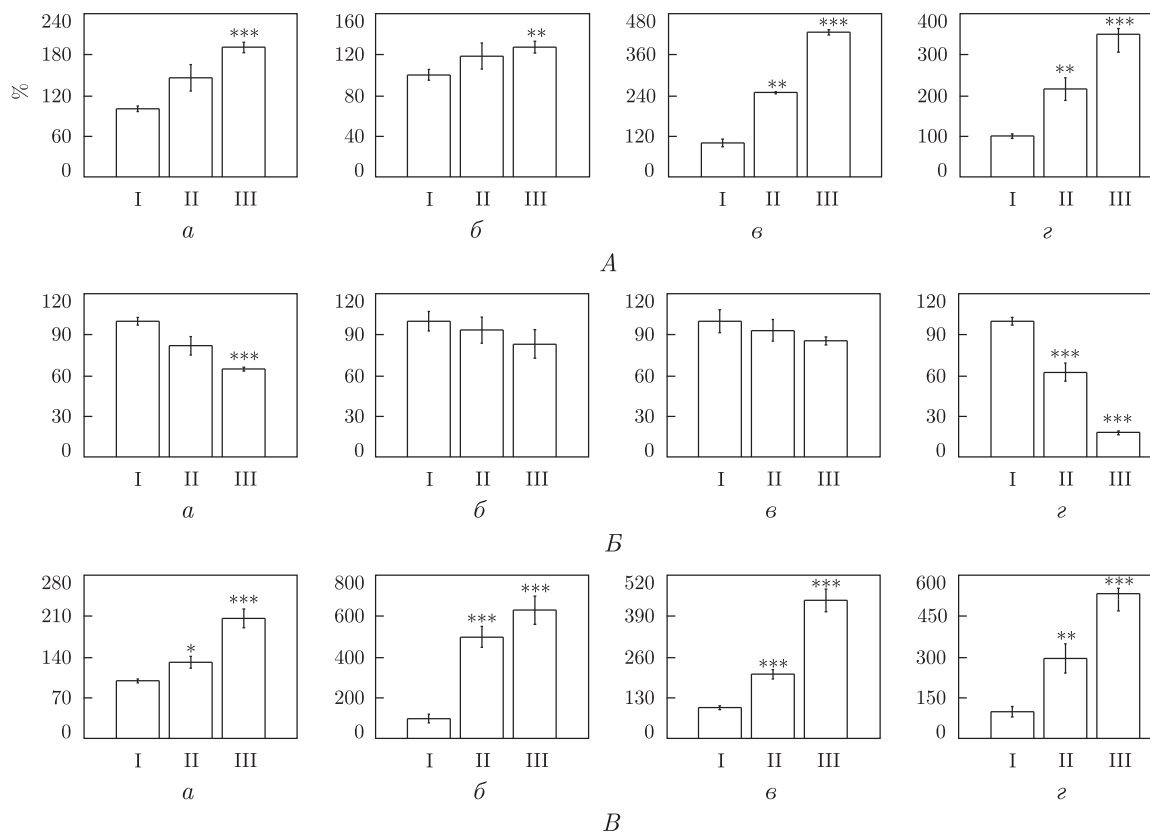


Рис. 1. Относительная активность iNOS (A), sNOS (B) и аргиназы (B) в плазме крови (a), эритроцитах (б), гомогенате сердца (в) и митохондриях миокарда (z) крыс с хроническим дефицитом церебрального дофамина (II, III группы). За 100% взяты показатели контрольной группы (I). Здесь и на рис. 2. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по отношению к контролю

животных составляла, пмоль/(мин · мг белка): в I группе $15,01 \pm 0,61$, $3,26 \pm 0,17$, $1,25 \pm 0,14$ и $1,42 \pm 0,08$ соответственно; во II группе — $21,83 \pm 2,94$, $3,86 \pm 0,41$, $3,10 \pm 0,04$ и $3,05 \pm 0,39$; в III группе — $28,58 \pm 1,18$, $4,14 \pm 0,19$, $5,31 \pm 0,10$, $4,92 \pm 0,41$ (рис. 1, A).

Активность sNOS в плазме крови, эритроцитах, гомогенате сердца и митохондриях миокарда составляла, пмоль/(мин · мг белка): у животных I группы — $7,99 \pm 0,24$, $1,24 \pm 0,09$, $5,91 \pm 0,50$ и $3,59 \pm 0,1$ соответственно; II группы — $5,55 \pm 1,13$, $1,16 \pm 0,12$, $5,51 \pm 0,48$ и $2,24 \pm 0,24$; III группы — $5,18 \pm 0,46$, $1,03 \pm 0,13$, $5,05 \pm 0,18$ и $0,65 \pm 0,05$ (см. рис. 1, B).

Активность аргиназы в плазме крови, эритроцитах, гомогенате сердца и митохондриях миокарда крыс составляла, нмоль/(мин · мг белка): в I группе — $0,88 \pm 0,03$, $0,29 \pm 0,06$, $1,13 \pm 0,07$ и $2,51 \pm 0,47$ соответственно; во II группе — $1,16 \pm 0,09$, $1,45 \pm 0,15$, $2,33 \pm 0,17$ и $7,44 \pm 1,31$; в III группе — $1,82 \pm 0,14$, $1,83 \pm 0,20$, $4,98 \pm 0,41$ и $13,40 \pm 1,04$ (см. рис. 1, B).

Как видно из рис. 1, A, B, у крыс с хроническим дефицитом церебрального ДА в ССС достоверное снижение активности кальцийзависимой sNOS сопровождается значительным увеличением активности кальцийнезависимой iNOS. Это приводит к дефициту NO, синтезированного эндотелиальной NOS, и, соответственно, нарушению NO-зависимого расслабления сосудов. Вместе с тем повышается чувствительность сосудистой стенки к вазоконстрикторным агентам и активизируются окислительные процессы.

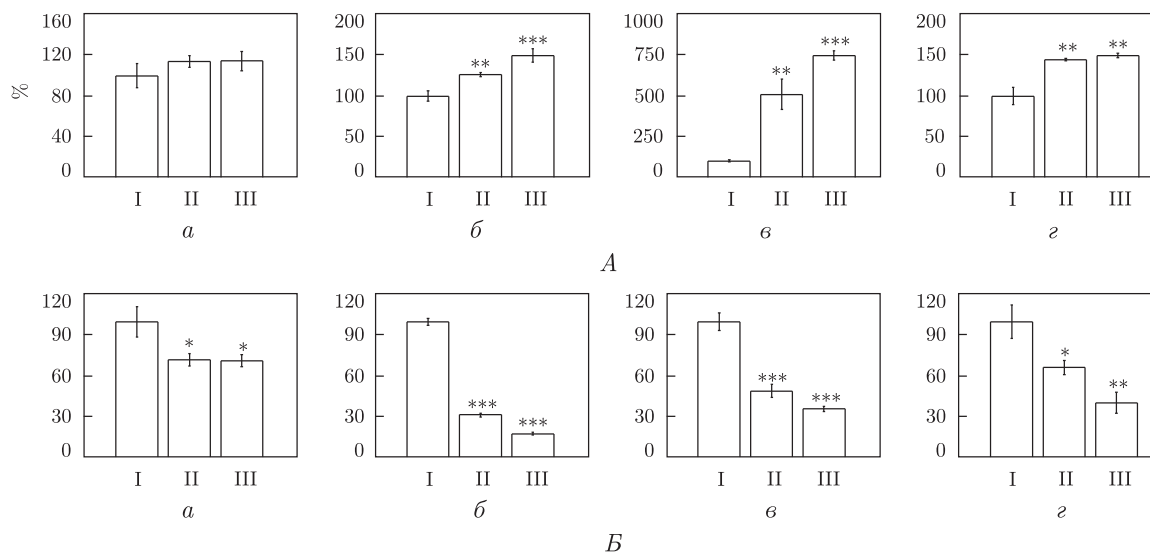


Рис. 2. Относительное содержание стабильных метаболитов окисления оксида азота нитрата (А) и нитрита (В) в плазме крови (а), эритроцитах (б), гомогенате сердца (в) и митохондриях миокарда (г) крыс с хроническим дефицитом церебрального дофамина (II, III группы). За 100% взяты показатели контрольной группы (I)

Экспрессия и активность NOS определяются необходимым количеством субстрата и кофакторов. Нехватка хотя бы одного из кофакторов cNOS приводит к так называемому разобщению в работе этого фермента, вследствие чего может увеличиться синтез супероксиданион-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$). Наблюдаемое нами увеличение активности iNOS, которое, как известно, определяется уровнем ее экспрессии, обусловлено именно повышенной генерацией $\cdot\text{O}_2^-$ разобщенной cNOS. В свою очередь, ввиду того что активность iNOS гораздо выше, чем активность cNOS, чрезмерная кальцийнезависимая генерация NO может ингибировать его кальцийзависимый конститутивный синтез, тем самым вызывая эндотелиальную дисфункцию. Это подтверждается нашими данными о нарушении эндотелийзависимых вазомоторных реакций у животных с дефицитом церебрального ДА [4].

Одновременно с гиперактивностью iNOS увеличивается активность и аргиназы (см. рис. 1, В). Это, в свою очередь, тоже может обуславливать уменьшение конститутивного синтеза NO за счет конкурентной утилизации общего для cNOS и аргиназы субстрата — L-аргинина.

Содержание NO_2^- в плазме крови, эритроцитах, гомогенате сердца и митохондриях миокарда исследованных животных составляло, пмоль/мг белка: в I группе — $139,52 \pm 15,61$, $18,27 \pm 0,46$, $353,0 \pm 22,6$ и $488,2 \pm 60,3$ соответственно; во II группе — $100,52 \pm 6,29$, $5,70 \pm 0,27$, $173,1 \pm 17,1$ и $323,9 \pm 25,3$; в III группе — $99,30 \pm 6,33$, $3,16 \pm 0,21$, $126,1 \pm 6,6$ и $196,3 \pm 37,2$ (рис. 2, Б).

Содержание NO_3^- в плазме крови, эритроцитах, гомогенате сердца и митохондриях миокарда крыс составляло, нмоль/мг белка: в I группе — $15,35 \pm 1,82$, $1,44 \pm 0,09$, $12,96 \pm 0,75$ и $67,06 \pm 7,33$ соответственно; во II группе — $17,50 \pm 0,88$, $1,82 \pm 0,04$, $66,08 \pm 11,82$ и $96,90 \pm 1,10$; в III группе — $17,54 \pm 1,44$, $2,16 \pm 0,12$, $97,10 \pm 3,75$ и $100,50 \pm 1,73$ (см. рис. 2, А).

Полученные нами данные (см. рис. 2) свидетельствуют о том, что в ССС крыс в условиях хронического дефицита нигростриатного ДА происходит существенное изменение пулов стабильных метаболитов NO: уменьшение уровня NO_2^- и увеличение уровня NO_3^- . Известно,

что именно NO_2^- является продуктом спонтанного окисления NO. Снижение содержания NO_2^- в наших экспериментах происходило на фоне возрастания уровня NO_3^- , т. е. доля нитрита в суммарном пуле окисленных стабильных метаболитов NO при дефиците церебрального ДА уменьшалась. В свою очередь, NO_3^- является наиболее окисленным метаболитом NO, а кроме того, субстратом нитрат-редуктаз для его ресинтеза [11, 12]. Нитрат образуется при деградации пероксинитрита одновременно со свободными радикалами кислорода и азота. Таким образом, увеличение содержания NO_3^- в тканях ССС крыс при недостатке нейротрансмиттера ДА подтверждает активацию синтеза NO индуцибельной изоформой NOS и свидетельствует об увеличении генерации $\cdot\text{O}_2^-$, что согласуется с нашими прежними данными о развитии оксидативного стресса в ССС крыс [13].

Итак, нами установлено, что в тканях ССС крыс с моделью гемипаркинсонизма имеет место значительное снижение конститутивного синтеза NO на фоне усиления его индуцибельной продукции. Известно, что подобные изменения происходят при старении и различных патологических состояниях ССС. Различные изоформы NOS имеют разную локализацию в ССС и разное, иногда противоположное, физиологическое действие.

В свое время R. Volli, проанализировав данные 92 исследований, установил, что в 73% работ показан кардиопротекторный эффект эндогенного и экзогенного NO и лишь в 12% исследований отмечалось его негативное влияние [14]. Неоднозначность результатов объясняется прежде всего дозозависимым эффектом. Кроме того, различный физиологический эффект NO (цитотоксический или цитопротекторный) может зависеть не только от его концентрации в тканях, но и от изоформы активированной NOS, от разной компартиментализации ферментов, от взаимодействия NO с другими свободными радикалами [15].

Таким образом, нами показаны изменения в синтезе и метаболизме NO в ССС крыс с хроническим дефицитом церебрального ДА: угнетение активности cNOS и усиление работы iNOS, активизация аргиназного пути метаболизма L-аргинина, изменение пулов нитрита и нитрата. Причем уровень этих нарушений, вероятно, опосредованных вегетативной нервной системой, зависел от степени дегенерации nigrostriatной ДА-эргической системы. Подобные изменения на фоне развивающегося оксидативного стресса [13], по всей видимости, лежат в основе развития сердечно-сосудистых расстройств у этих животных [4, 5]. Подобные механизмы могут быть причиной вегетативных нарушений и у пациентов с БП.

1. Taimor G., Hofstaetter B., Piper H. M. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – **45**, No 3. – P. 588–594.
2. Hofstaetter B., Taimor G., Insette J. et al. Inhibition of apoptotic responses after ischemic stress in isolated hearts and cardiomyocytes // *Basic Res. Cardiol.* – 2002. – **97**, No 6. – P. 479–488.
3. Крыжановский Г. Н., Карабань И. Н., Магаева С. В. и др. Болезнь Паркинсона. – Москва: Медицина, 2002. – 335 с.
4. Таланов С. О., Ткаченко М. М., Базілюк О. В. та ін. Вплив еналаприлу на вазомоторні реакції у щурів з хронічним дефіцитом дофаміну в мезенцефало-стріатній системі // *Фізіол. журн.* – 2007. – **53**, № 3. – С. 16–22.
5. Таланов С. А., Сагач В. Ф. Нарушение функционального состояния миокарда у крыс с хроническим дефицитом nigro-striatного дофамина и коррекция этих нарушений мелатонином // *Нейрофизиология.* – 2008. – **40**, № 2. – С. 100–104.
6. Таланов С. А., Олешко Н. Н., Ткаченко М. Н., Сагач В. Ф. Фармакопротекторные влияния на различные звенья механизма дегенерации nigro-striatных дофаминергических нейронов, вызванной действием 6-гидроксидофамина // Там же. – 2006. – **38**, № 2. – С. 150–157.
7. Salter M., Knowles R. G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide syntases // *FEBS Lett.* – 1991. – **291**, No 1. – P. 145–149.

8. *Chin S. Y., Pandey K. N., Shi S. J. et al.* Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**, No 5. – P. 797–804.
9. *Green L. L., Wagner D. A., Glogowski J. et al.* Analysis of nitrate, nitrite and [+5N] nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**, No 1. – P. 131–138.
10. *Сагач В. Ф., Вавілова Г. Л., Рудик О. В., Струтинська Н. А.* Вивільнення неідентифікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори серця щурів // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, № 5. – С. 3–12.
11. *Ignarro L. J., Cirino G., Casini A., Napoli C.* Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1999. – **34**, No 6. – P. 879–886.
12. *Мойбенко О. О., Сагач В. Ф., Ткаченко М. Н. та ін.* Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань // *Фізіол. журн.* – 2004. – **50**, № 1. – С. 11–30.
13. *Таланов С. А., Коцюруба А. В., Коркач Ю. П., Сагач В. Ф.* Окисний стрес в серцево-судинній системі у щурів з хронічним дефіцитом церебрального дофаміну // *Там само.* – 2009. – **55**, № 4. – С. 32–40.
14. *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 // *J. Moll. and Cell. Cardiol.* – 2001. – **33**, No 11. – P. 1897–1918.
15. *Schulz R., Kelm M., Heusch G.* Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – **61**, No 3. – P. 402–413.

*Институт физиологии им. А. А. Богомольца
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 09.04.2009

S. A. Talanov, A. V. Kotsuruba, Yu. P. Korkach,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. F. Sahach**

Changes of nitric oxide synthesis in cardiovascular system in rats with chronic cerebral dopamine deficiency

In rats with chronic (3–4 months) cerebral dopamine deficiency, changes in the synthesis and metabolism of nitric oxide (NO) have been shown in tissues of the cardiovascular system (erythrocytes, plasma, homogenate, and mitochondria of myocardium). We observed an inhibition of the activity of a constitutive NO-synthase, but an increase in its inducible isoform, an activation of the arginase way of L-arginine metabolism, an increase in nitrate pools, and a decrease in nitrite amount. Those changes depended on the degeneration level in the nigro-striatal dopaminergic system. We have concluded that changes in the synthesis and metabolism of NO are the basis for cardiovascular disturbances determined previously in those animals. Similar mechanisms can be a cause of the vegetative disbalance in patients with Parkinson's disease.