

ПРОДУКЦИЯ ОКСИДА АЗОТА В ТКАНЯХ КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

© 2021 г. Р.И. Зарипова*, Г.Г. Яфарова*, В.В. Андрианов*, **, Х.Л. Гайнутдинов*, **, Т.Л. Зефирин*

*Казанский федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

**Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 420034, Казань, ул. Сибирский тракт, 10/7

E-mail: kh_gainutdinov@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2019 г.

После доработки 23.03.2020 г.

Принята к публикации 04.03.2021 г.

Проведено ЭПР-исследование интенсивности продукции оксида азота у крыс путем анализа количества NO-содержащих парамагнитных комплексов в тканях сердца и печени в постнатальном онтогенезе. Количество оксида азота оценивали по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу $(\text{DЭТК})_2\text{—Fe}^{2+}\text{—NO}$. Полученные результаты показывают, что содержание NO в тканях печени с 28- до 56-суточного возраста возрастает, в постпубертатный период изменяется незначительно. В тканях сердца наблюдается повышение количества NO к половозрелому периоду по сравнению с пубертатным периодом. Во всех исследованных возрастных группах содержание NO в печени крыс было значительно больше, чем в тканях сердца.

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

DOI: 10.31857/S0006302921030170

Оксид азота (NO) — газообразный химический мессенджер, являющийся высокореактивным, короткоживущим, реактивным свободным радикалом, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов [1–6]. В организме оксид азота синтезируется двумя основными путями: ферментативным и неферментативным. Ферментативный синтез NO осуществляется ферментом NO-синтазой в присутствии O_2 и НАДФ-Н в результате окисления аминокислоты L-аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты — L-цитруллина [7]. Коронарный и эндокардиальный эндотелий, кардиомиоциты в норме являются источником базальной продукции NO и регулируют функции сердца через сосудистозависимые и сосудистонезависимые эффекты [1, 8–11]. NO контролирует сосудистый тонус, артериальное давление, пролиферацию эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудистой стенки, участвует в возникновении атеросклероза и гипертензий, регулирует сократимость миокарда [9–14]. Доказано токсическое

действие NO на кардиомиоциты при патологических состояниях [15].

NO широко представлен в центральной и периферической нервной системе [6, 16–17]. NO выполняет роль сигнальной молекулы, модулируя адренергические и холинергические влияния на сердце [4, 10, 16–19]. Система NO играет важную роль при адаптации организма к различным изменениям внешней среды и внешних условий жизнедеятельности, в том числе и на изменение двигательной активности [20–22]. Активация NO-системы — один из тех механизмов, за счет которого организм предупреждает стрессорные повреждения. Система оксида азота, играющая роль в активации антиоксидантных ферментов, ограничивает стресс-реакцию [23, 24]. NO ввиду свойственной ему реактивности способен взаимодействовать с разнообразными веществами, образуя структуры, служащие в качестве депо для NO, — тиолами, белками, сахарами, ионами металлов, гемами, протеинами и т.д., локализованными в самых различных тканях и органеллах, что предполагает наличие NO и его комплексов в различных тканях. Депо NO может служить дополнительным неферментативным источником NO в случае его дефицита. Под неферментативным пу-

Сокращения: NO — оксид азота, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс.

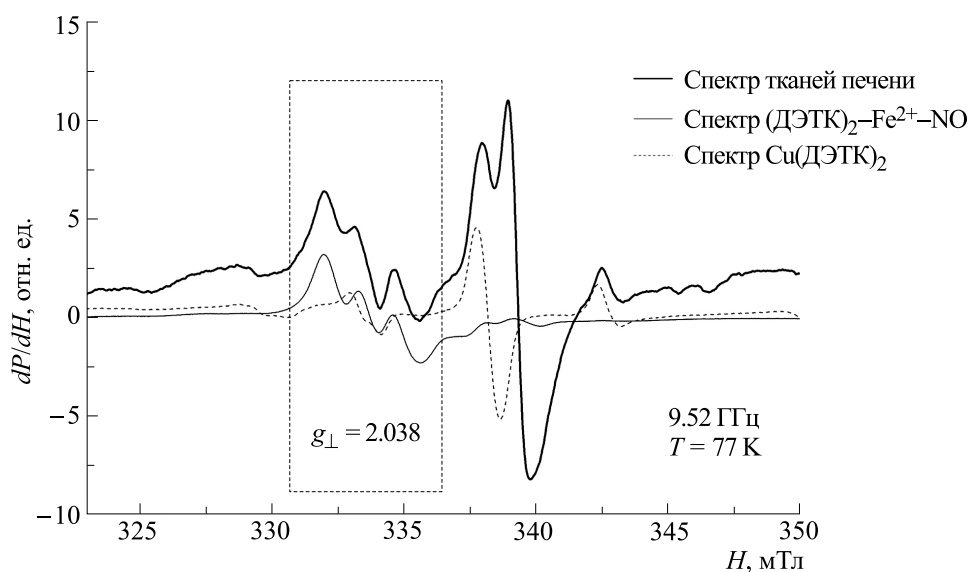


Рис. 1. Спектр ЭПР тканей печени крысы. Пунктиром выделен сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{—Fe}^{2+}\text{—NO}$, $p < 0.05$.

тем обычно понимают восстановление нитритов или нитратов до NO [3]. Данная способность является одним из способов предупреждения токсических эффектов избытка NO [25, 26].

Значительная роль NO во многих физиологических и патофизиологических процессах, а также недостаточность сведений об интенсивности синтеза NO в растущем организме предопределяют значимость исследований в данном направлении. Является актуальным определение количественного содержания NO как внутриклеточного, межклеточного, тканевого и межорганного посредника в различных тканях.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание NO в тканях сердца и печени крыс определяли методом спинного захвата в четырех возрастных группах животных: 28-, 56-, 81- и 110-суточного возрастов, в каждой возрастной группе $n = 10$. Эксперименты проводили в соответствии с нормативными положениями о правилах обращения с лабораторными животными. Метод спинного захвата основан на реакции радикала NO со спиновой ловушкой [27, 28]. Был применен комплекс Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{—Fe}^{2+}\text{—NO}$ [27–29]. Для образования в организме данного комплекса животным вводили водный раствор ДЭТК-Na в дозе 500 мг/кг в 2.5 мл воды внутривентриально и раствор цитрата железа (сульфат железа (II) $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, Sigma, США) в дозе 37.5 мг/кг + цитрат натрия, 187.5 мг/кг) внутримышечно (подробности метода описаны

нами ранее [30, 31]). Комплекс ДЭТК—Fe(II) взаимодействует с NO, в результате чего образуется стабильный радикал $(\text{ДЭТК})_2\text{—Fe}^{2+}\text{—NO}$. Данный комплекс является парамагнитным ($S_{\text{Fe}} = 1/2$, и $I_N = 3/2$) и может быть зарегистрирован методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [28]. Комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g -фактора $g = 2.038$ и триплетной сверхтонкой структурой (рис. 1). Количество NO оценивали по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу $(\text{ДЭТК})_2\text{—Fe}^{2+}\text{—NO}$. Сигналы сравнивали по величине интегральной интенсивности, так как интегральная интенсивность сигнала ЭПР прямо пропорциональна концентрации парамагнитных комплексов [29]. Через 30 мин после введения препаратов наркотизированную уретаном крысу фиксировали на операционном столе, вскрывали, извлеченные органы быстро просушивали и замораживали в жидком азоте в капиллярах для измерений. Регистрацию спектров ЭПР приготовленных образцов проводили при 77 K на ЭПР-спектрометре X-диапазона ER-200E-SRC EMX/plus (Bruker, США) с температурной приставкой ER-4112HV. Во всех экспериментах сохраняли постоянными следующие параметры: СВЧ мощность — 30 мВт, модуляция — 5 Гс, усиление — $4 \cdot 10^4$, постоянная времени — 100 мс, время записи спектра — 50 с, число накоплений — 8. При накоплениях и регистрации спектров использовали компьютер спектрометра Aspect 3000 (Bruker, США).

При статистической обработке получали среднее значение измеряемой величины и стандарт-

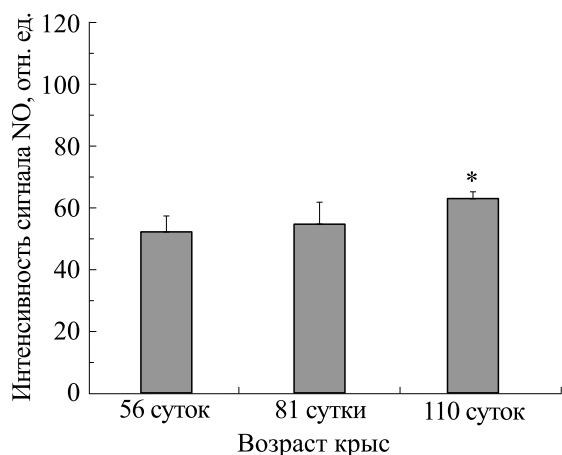


Рис. 2. Интенсивность сигнала ЭПР спиновой ловушки $(\text{ДЭТК})_2\text{--Fe}^{2+}\text{--NO}$ в тканях предсердий сердца крыс. По оси ординат — интегральная интенсивность сигнала от комплекса, * — $p < 0.05$.

ную ошибку среднего $M \pm SEM$. С применением t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна—Уитни проверяли достоверность отличия средних значений уровней NO в разных тканях крыс разного возраста. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, 28-суточные крысы являются неполовозрелыми, пик становления симпатической иннервации в сердце; 56-суточный возраст соответствует пубертатному периоду развития, сопровождающемуся выраженными изменениями эндокринной системы, ока-

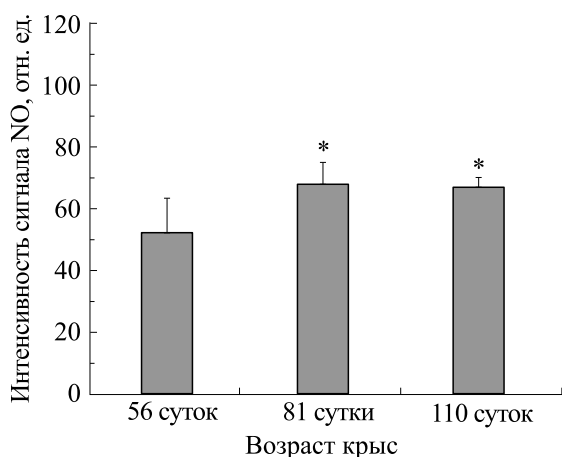


Рис. 3. Интенсивность сигнала ЭПР спиновой ловушки $(\text{ДЭТК})_2\text{--Fe}^{2+}\text{--NO}$ в тканях желудочков сердца крыс. По оси ординат — интегральная интенсивность сигнала от комплекса, * — $p < 0.05$.

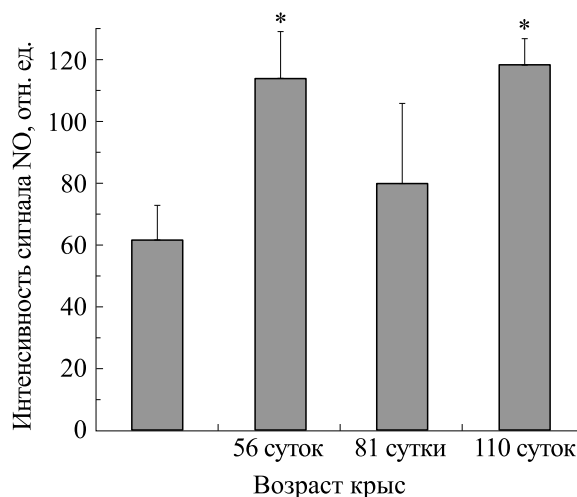


Рис. 4. Интенсивность сигнала ЭПР спиновой ловушки $(\text{ДЭТК})_2\text{--Fe}^{2+}\text{--NO}$ в тканях печени крыс. По оси ординат — интегральная интенсивность сигнала от комплекса, * — $p < 0.05$.

зывающей активное влияние на регуляцию сердечной деятельности, 81-суточные животные — переходный период от пубертата к половозрелости, 110-суточные — половозрелые крысы [32–34]. При таком подходе, на наш взгляд, удастся охватить основные периоды развития крыс и проследить формирование регуляции сердечной деятельности в разные этапы постнатального онтогенеза. При сопоставлении спектров ЭПР тканей предсердий сердца крыс разных возрастов было обнаружено, что количество NO с 56- по 81-суточный возраст существенно не изменяется. К 110-суточному возрасту количество $(\text{ДЭТК})_2\text{--Fe}^{2+}\text{--NO}$ повысилось в среднем на 19% по сравнению с 56-суточным возрастом ($p < 0.05$, рис. 2). Количество NO в тканях желудочков сердца крыс с 56- по 81-суточный возраст, в отличие от предсердий, увеличивается в среднем на 30% ($p < 0.05$), у 81- и 110-суточных крыс количество NO не отличается (рис. 3). Выявлено, что в тканях печени крыс интенсивность сигналов ЭПР у крыс с 28- до 56-суточного возраста увеличивается в среднем на 85% ($p < 0.05$), а к 110-суточному возрасту существенно не изменяется (рис. 4). Оксид азота участвует в большинстве метаболических процессов, протекающих в печени, поэтому его динамика свидетельствует об изменениях интенсивности метаболизма в печени в ходе онтогенеза.

Наибольшее содержание NO у крыс обнаружено в печени, далее по убывающей — в тканях предсердий и желудочков сердца. Возможно, это объясняется тем, что печень является мощным фильтратом крови. Влияние NO на печень не ограничивается септическими состояниями.

Имеются сведения о важной роли NO в функциональных сдвигах, наблюдаемых в печени при ишемии и реперфузии, злокачественных новообразованиях, циррозе и ряде других патологических состояний [35].

Исследованиями показано, что концентрация оксида азота в организме различается в зависимости от возраста людей. Так, максимальное содержание этого соединения наблюдалось в возрасте 5–12 лет и составляло 152.0 ± 16.2 мкг/мл. Далее с увеличением возраста продукция NO снижалась и в 19–30 лет достигала минимальных значений [36]. По мере старения организма нарушается функция эндотелия сосудов, и главной причиной дисфункции эндотелия считается снижение продукции эндотелиального NO [37].

В возрасте 7–10 лет выявлены высокие темпы нарастания показателей плотности холин- и адренергических терминалей в миокарде, наибольшая их концентрация постоянно регистрируется в стенке правого предсердия, затем по количественным показателям следуют левое предсердие, правый желудочек и, наконец, — стенка левого желудочка. В период половой зрелости насыщенность стенок сердца нервными сплетениями становится максимальной. С 35–40-летнего возраста возникает снижение симпатической активности. В результате применения иммуногистохимических методов обнаружена солокализация оксида азота в перичеселлюлярных окончаниях, нейронах сердца и холинергических синапсах человека и животных. Установлено, что эффекты оксида азота и его метаболитов выражены в областях мозга, которые контролируют симпатическую активность и влияния блуждающего нерва, и, кроме того, оксид азота модулирует трансмиссию вегетативной деятельности на органы-мишени, воздействуя на уровне спинного мозга, ганглиев и нейромышечных контактов [38].

Полученные нами результаты показывают, что содержание NO в тканях печени с 28- до 56-суточного возраста возрастает, а в постпубертатный период изменяется не существенно. В тканях сердца наблюдается повышение количества NO к половозрелому периоду по сравнению с пубертатным периодом. Было обнаружено, что установление стабильного уровня NO в исследованных нами тканях происходит в разные возрастные периоды: в тканях печени — в начале пубертатного периода (56-суточный возраст), в тканях желудочков сердца — к 81-суточному, а в предсердиях — к 110-суточному возрасту. NO модулирует или опосредует почти все сигнальные пути сердечно-сосудистой системы на каждом уровне, начиная от центральной нервной системы и кончая кардиомиоцитами [39, 40]. Видимо, оксид азота наряду с нейромедиаторами и гормонами является ключевой молекулой в становлении регуляции

деятельности сердечно-сосудистой системы в постнатальном онтогенезе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидией, выделенной Казанскому федеральному университету по Государственному заданию № 0671-2020-0059 в сфере научной деятельности.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ф. Ванин, Соросовский образоват. журн. **7** (11), 7 (2001).
2. Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков и В. П. Реутов, Биохимия **65** (4), 485 (2000).
3. В. П. Реутов, В. Е. Охотин, А. В. Щуклин и др., Успехи физиол. наук **38** (4), 39 (2007).
4. E. M. Schuman and D. V. Madison, Annu. Rev. Neurosci. **17**, 153 (1994).
5. D. Boehning and S. H. Snyder, Annu. Rev. Neurosci. **26**, 105 (2003).
6. J. R. Steinert, T. Chernova, and I. D. Forsythe, Neuroscientist **16**, 435 (2010).
7. M. Mori and T. Gotoh, Biochem. Biophys. Res. Commun. **275**, 715 (2000).
8. А. А. Сосунов, Соросовский образоват. журн. **6** (12), 31 (2000).
9. D. L. Brutsaert, Physiol. Rev. **83**, 59 (2003).
10. В. В. Андрианов, Ф. Г. Ситдинов, Х. Л. Гайнутдинов и др., Онтогенез **39** (6), 437 (2008).
11. B. Casadei and E. C. Sears, Prog. Biophys. Mol. Biol. **82**, 67 (2003).
12. A. Piech, C. Dessy, X. Havaux, et al., Cardiovasc. Res. **57**, 456 (2003).
13. A. I. Ismailova, O. I. Gnezdilov, L. N. Muranova, et al., Appl. Magn. Res. **28**, 421 (2005).
14. R. I. Zaripova, N. I. Ziyatdinova, and T. L. Zefirov, Bul. Exp. Biol. Med. **161** (2), 215 (2016).
15. В. А. Невзорова, М. В. Зуга и Б. И. Гельцер, Терапевт., № 3, 64 (1997).
16. V. V. Andrianov, S. G. Pashkevich, G. G. Yafarova, et al., Appl. Magn. Res. **47** (9), 965 (2016).
17. А. Л. Зефилов и А. Х. Уразаев, Успехи физиол. наук **30** (1), 547 (1999).
18. M. P. Gallo, D. Malan, I. Bedendi, et al., Pflugers Arch. **441** (5), 621 (2001).

19. S. Thomas and R. Robitaille, *J. Neurosci.* **21** (4), 1087 (2001).
20. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б., *Биохимия*, **63** (7), 992 (1998).
21. Р. И. Зарипова, Х. Л. Гайнутдинов и Т. Л. Зефилов, *Бюл. эксперим. биол. мед.* **157** (5), 554 (2014).
22. Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов, В. С. Июдин и др., *Биофизика* **58** (2), 276 (2013).
23. Ю. Г. Камскова, *Теория и практика физ. культуры*, № 10, 20 (2002).
24. Л. Л. Гудков, К. Б. Шумаев, Е. И. Каленикова и др., *Биофизика* **52** (3), 503 (2007).
25. А. Н. Осипов, Г. Г. Борисенко и Ю. А. Владимиров, *Успехи биол. химии* **47**, 259 (2007).
26. А. А. Тимошин, Ц. Р. Орлова, А. Ф. Ванин и др., *Рос. хим. журн.* **52** (1), 88 (2007).
27. V. V. Khrantsov and L. B. Volodarsky, *Biol. Magn. Res.* **14**, 109 (1998).
28. A. F. Vanin, A. Huisman, and E. E. Van Faassen, *Methods Enzymol.* **359**, 27 (2003).
29. В. Д. Микоян, Л. Н. Кубрина и А. Ф. Ванин, *Биофизика* **39**, 915 (1994).
30. Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S. et al, *Appl. Magn. Res.* **40**, 267 (2011).
31. Р. И. Зарипова, В. В. Андрианов, Г. Г. Яфарова и др., *Росс. физиол. журн.* **100** (8), 926 (2014).
32. И. А. Аршавский, *Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития* (Наука, М., 1982).
33. Т. Л. Зефилов, Н. В. Святова и Н. И. Зиятдинова, *Бюл. эксперим. биол. мед.* № 6, 611 (2000).
34. A. M. Kuptsova, N. I. Ziyatdinova, R. G. Biktemirova, and T. L. Zefirov, *Intern. J. Pharm. Technol.* **8** (3), 14999 (2016).
35. З. А. Лупинская, А. Г. Зарифьян, Т. Ц. Гурович и С. Г. Шлейфер, *Эндотелий. Функция и дисфункция* (КРСУ, Бишкек, 2008).
36. О. В. Клименко, Дис. ... к-та мед. наук (Читинская гос. мед. академия, Чита, 2002).
37. О. Д. Остроумова и Р. Э. Дубинская, *Кардиоваскулярная терапия и профилактика* **3** (4), 83 (2004).
38. В. Швалева, *Тихоокеанский мед. журн.*, № 2, 94 (2012).
39. J. R. Docherty, *Autonom. Neurosci., Basic and Clinical* **96**, 8 (2002).
40. M. D. Esler, A. G. Tumer, D. M. Kaye, et al., *Am. J. Physiol.* **268**, 278 (1995).

Nitric Oxide Production in Rat Tissues in Postnatal Ontogenesis: Studies by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy

R.I. Zaripova*, G.G. Jafarova*, V.V. Andrianov*, **, Kh.L. Gainutdinov*, **, and T.L. Zefirov*

*Kazan Federal University, Kremlevskaya ul.18, Kazan, 420008 Russia

**Kazan E.K. Zavoisky Physical-Technical Institute of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
ul. Sibirskij tract 10/7, Kazan, 420034 Russia

The EPR spectroscopy was used to study the intensity of nitric oxide production in rats by evaluating the level of nitric oxide-containing paramagnetic complexes in heart and liver tissues in postnatal ontogenesis. The amount of nitric oxide was estimated by the intensity of a characteristic EPR signal belonging to the (DETC)₂-Fe²⁺-NO complex. The results show that the content of NO in liver tissues increases after the age of 28 days till 56-days without significant changes in the post-puberty period. In heart tissues, the nitric oxide level increases in the mature period as compared to puberty. The nitric oxide level in the rat liver was significantly higher than that in heart tissues in all studied age groups.

Keywords: nitric oxide, rat, ontogenesis, heart, liver, electron paramagnetic resonance