

*В. И. Дунай<sup>1</sup>, Л. П. Пархач<sup>2</sup>, Н. Ю. Щербина<sup>2</sup>, А. Н. Антоненко<sup>1</sup>*

## **Влияние модуляции L-аргинин-NO-системы в онтогенезе на сократительную функцию сердца и физико-химические свойства крови у взрослых крыс**

*Белорусский государственный университет<sup>1</sup>  
ГУ «РНПЦ неврологии и нейрохирургии» МЗ РБ<sup>2</sup>*

Изучено влияние ингибирования NO-синтазы у крыс в раннем постнатальном онтогенезе на сократительную функцию сердца, на процессы тканевого массопереноса кислорода, ПОЛ и КОС крови у взрослых животных. Получены новые данные о снижении внутрижелудочкового давления, увеличении поглощения кислорода сердечной мышцей, ускорении свободно-радикальных процессов на фоне метаболического некомпенсированного ацидоза у половозрелых животных с блокадой синтеза NO в онтогенезе.

Ключевые слова: онтогенез, NO-синтаза, L-МЭНА.

В настоящее время установлено, что монооксид азота (NO) вовлекается во многие физиологические процессы [1]. Микроинъекции NO-донора – нитропруссид натрия или билатеральный микродиализ спинномозговой жидкости, насыщенной NO в паравентрикулярное ядро гипоталамуса приводят к уменьшению системного кровяного давления, но не изменяют частоты сердечных сокращений у крыс под наркозом [2]. Также было установлено [2], что NO, выделяемый CNO-позитивными нервными клетками паравентрикулярного ядра, способен ослабить прессорный эффект, вызываемый электрической стимуляцией субфорникального органа. Показано, что NG-метил-L-аргинин – ингибитор CNO, при системном введении стимулирует активность симпатического почечного нерва как примера вазоконстрикторного нерва [3]. В артериальной крови NO в реакции с оксигемоглобином образует нитрат и метгемоглобин, а в венозной – нитрозилгемоглобин ( $HbFe^{2+}NO$ ), способный при высоких  $pO_2$  дезинтегрироваться с участием молекулярного кислорода до гемоглобина и  $NO_3^-$ . Реально влияние NO на кислородсвязывающие свойства крови может носить лишь опосредованный характер, вследствие его малого содержания (сотые доли процента) по сравнению с концентрацией гемоглобина в организме. Известно, что ингибирование NO-синтазы приводит к снижению  $pO_2$  в течение получаса с 29 до 11 мм рт. ст. [4] и с другой стороны введение L-аргинина и ингибитора NO-синтазы сопровождалось увеличением  $p50$  стандарт с 33 до 37 мм рт.ст. [4]. Оксид азота, синтезируемый из аминокислоты L-аргинина и молекулярного кислорода, при активации  $Ca^{2+}$ -зависимой NO-синтазы реагирует с супероксид-анионом, образуя пероксинитрит. Высвобождение свободных радикалов способствует повреждению клеточных мембран и в дальнейшем митохондриальной дисфункции. Однако введение ингибитора NO-синтазы L-МЭНА при моделировании церебральной ишемии приводило к дисбалансу и в некоторых случаях (в зависимости от дозы вводимого

ингибитора) увеличению про- и антиоксидантных реакций ПОЛ и снижению параметров массопереноса кислорода при реперфузии, а введение донора NO – аминокислоты L-аргинина оказывало благоприятный эффект на состояние реакций ПОЛ [5]. Следует заметить, что для синтеза NO необходим кислород, а в условиях церебральной ишемии его недостаточно для поддержания нормальных жизненных функций. Неоднозначность литературных данных указывает на сложную, вероятно в большей мере опосредованную, систему воздействия NO на метаболизм организма. Еще более сложным ожидается пролонгированный эффект ингибирования NO-синтазы, в частности, в онтогенезе.

В связи с вышесказанным представлялось перспективным исследовать влияние блокады NO-зависимых механизмов в раннем постнатальном онтогенезе на сократительную способность сердца и физико-химические свойства крови.

#### Материалы и методы исследования

Исследования выполнены на 36 крысах. Эксперименты проводили на двух группах животных. Первой группе животных (n = 18) вводили подкожно ингибитор NO-синтазы – метиловый эфир N\*-нитро-L-аргинин (L-МЭНА) в дозе 750 мкг/кг двукратно на первом и третьем дне жизни (А.В. Гурин, В.И. Дунай, 1999). В качестве контроля второй группе животных (n = 18) вводили неактивный по отношению к СНО энантиомер – метиловый эфир N\*-нитро-D-аргинин (D-МЭНА) подкожно в дозе 750 мкг/кг двукратно на первом и третьем дне жизни. Через три месяца крыс брали повторно в эксперимент.

С целью изучения влияния ингибирования NO-синтазы у крыс в раннем постнатальном онтогенезе на процесс регулирования сократительной способности сердца измеряли максимальное систолическое давления в левом желудочке сердца и частоту сердечных сокращений. Наркотизацию животных производили путем внутривентрикулярного введения тиопентала-натрия (80 мг/кг). После трахеотомии осуществляли доступ к сердцу через диафрагму, при этом животных переводили на искусственное дыхание. Развиваемое давление в левом желудочке регистрировали на многоканальном поликардиографе «Мингограф-81» (Элема, Швеция).

Параметры дыхания и транспорта кислорода исследовали по методу, разработанному в экспериментальной лаборатории НИИ ННХФТ (Титовец Э.П. и Пархач Л.П., патент РБ № 2813.1998). Изучали скорость тканевого дыхания сердечной мышцы, скорость транспорта кислорода через перикардиальную сумку сердца у взрослых крыс первой и второй групп.

Определяли показатели ПОЛ в крови: содержание первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови, вторичных ТБК-активных продуктов (ТБК-П) в сыворотке и активность антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (ГП) в гемолизатах эритроцитов, исходя из расчета на 1 мл крови, взятой из сонной артерии животных с ингибированной NO-синтазой в раннем постнатальном онтогенезе и крыс контрольной группы.

Оценивали КОС артериальной крови у двух групп животных. Исследовали актуальную кислотность крови (рН), напряжение CO<sub>2</sub> (рCO<sub>2</sub>), содержание гидрокарбоната (НСО<sub>3</sub>-), дефицит буферных оснований (ВЕ), парциальное

давление кислорода (pO<sub>2</sub>) и сатурацию (SO<sub>2</sub>) артериальной крови с помощью газоанализатора ABL-50 («Radiometr», Дания).

Данные, полученные в ходе исследований, обрабатывали с помощью программы Excel и методов вариационной статистики.

#### Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что у животных, которым на раннем этапе постэмбрионального развития вводили ингибитор NO-синтазы, частота сердечных сокращений не отличалась от таковой у контрольной группы, однако максимальное внутрижелудочковое давление сердца существенно изменялось. Так, максимальное внутрижелудочковое давление сердца у экспериментальных крыс составило  $92,0 \pm 4,7$  мм рт. ст. (рисунок 1), в то время как у контрольных крыс оно составило  $120,6 \pm 6,4$  мм рт. ст.

Таким образом, установлено, что у животных, которым на раннем этапе постэмбрионального развития вводили ингибитор NO-синтазы максимальное внутрижелудочковое давление сердца существенно изменялось. P<sub>max</sub> у экспериментальных крыс было на 23,7 % меньше, чем у контрольных животных (p \* 0,05) (таблица 1).

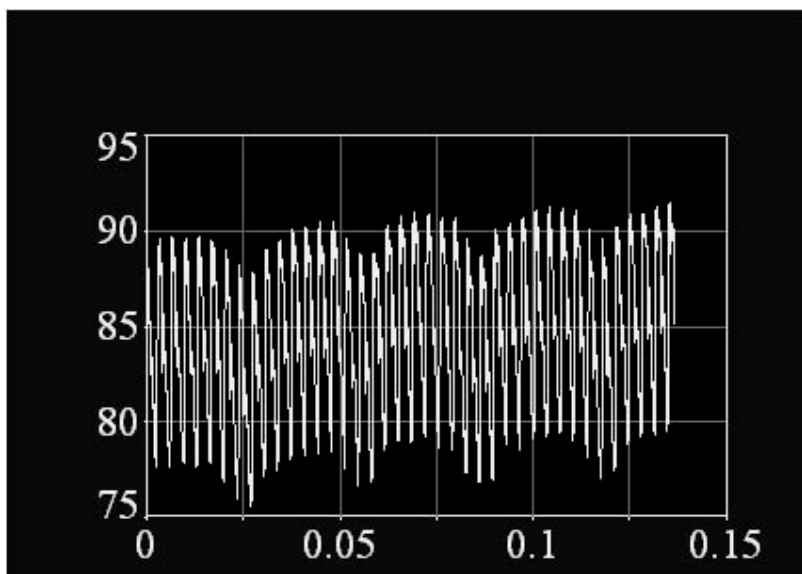


Рисунок 1 – Влияние ингибитора синтазы NO (L-МЭНА), введенного на первый и третий дни жизни, на максимальное внутрижелудочковое давление сердца у взрослых крыс

Таблица 1 – Функциональные показатели сердца зрелых крыс после применения ингибитора NO-синтазы на раннем этапе постнатального онтогенеза

Группа/Показатель	ЧСС, сокр./мин	P <sub>max</sub> , мм рт. ст.
Контрольная	294,8 ± 9,2	120,6 ± 6,4
Подверженная воздействию L-МЭНА	282,1 ± 7,3	92,0 ± 4,7*

Примечание – \* различия достоверны по отношению к контролю;  $p < 0,05$ ; ЧСС – частота сердечных сокращений; P<sub>max</sub> – максимальное давление в левом желудочке сердца.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении инотропной функции сердца после применения ингибитора NO-синтазы в неонатальном периоде. Данная модификация функционального состояния сердца может быть обусловлена нарушением периферических механизмов нейрогормональной регуляции сократительной способности миокарда.

В ходе проведенных исследований обнаружено увеличение тканевого дыхания поверхностью сердечной мышцы и проницаемости перикардиальной сумки сердца крыс. Скорость поглощения O<sub>2</sub> увеличивалась на 7,67 %, проницаемость перикардиальной сумки – на 10 % (таблица 2).

Таблица 2 – Скорость поглощения O<sub>2</sub> сердечной мышцей крыс и проницаемость перикардиальной сумки сердца крыс

Измеряемые величины	Контрольная серия	Серия с ингибированным синтезом NO
Скорость поглощения O <sub>2</sub> мм рт. ст./мин	373 ± 11	404 ± 15*
Проницаемость перикардиальной сумки, мм рт.ст./мин	459 ± 36	508 ± 33*

Примечание – \* различия достоверны по отношению к контролю;  $p < 0,05$ .

Обнаружено увеличение активности ПОЛ. Содержание ТБК-П повышалось на 26 %, а уровень ДК на 18 %. Изменения активности ГП были незначительными. Баланс про- и антиоксидантных механизмов оценивали по соотношению ДК и активности ГП (прооксидантный индекс) (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы

Показатели	Экспериментальные группы	
	Контрольная серия	Серия с ингибированным синтезом NO
Дневные конъюгаты, о.е.	1,76 ± 0,10	2,15 ± 0,17*
ТБК-активные продукты, о.е.	0,028 ± 0,001	0,038 ± 0,003*

Примечание – \* различия достоверны по отношению к контролю;  $p < 0,05$ .

Оценивали КОС артериальной крови. Наблюдали снижение рН на 2 %, рO<sub>2</sub> на 23 %, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> на 25 %, SO<sub>2</sub> на 12 %, ABE на 20 %, увеличение рCO<sub>2</sub> на 10,05 % (таблица 4).

Таблица 4 – Показатели КОС артериальной крови 2 серий крыс - контрольной и  $\bar{x} \pm X$  с ингибированной NO-синтазой в раннем постнатальном онтогенезе,

Группа/ Показатель	Показатели КОС крови					
	SO <sub>2</sub> , %	рO <sub>2</sub> ммHg	рН, ед.	ABE, ммоль/л	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ммоль/л	PCO <sub>2</sub> , ммHg
Контрольная	97 ± 4	90 ± 3	7,37 ± 0,01	1,2 ± 0,1	21,0 ± 1,2	30,4 ± 1,0
Подверженная воздействию L-МЭНА	85 ± 3*	69 ± 4*	7,22 ± 0,03*	-0,96 ± 0,2*	15,8 ± 1,2*	33,8 ± 1,2*

Примечание – \* различия достоверны по отношению к контролю;  $p < 0,05$ .

В условиях ингибирования NO-синтазы в онтогенезе проявлялась тенденция к увеличению прооксидантных процессов. В ходе проведенных исследований выявлены изменения КОС крови, снижение рН, истощение гидрокарбонатного буфера и выраженный дефицит буферных оснований. Выявленное снижение SO<sub>2</sub> может коррелировать с увеличением тканевого дыхания сердечной мышцы. Полученные данные можно охарактеризовать как метаболический некомпенсированный ацидоз, ускорение свободно-радикальных процессов. Взаимосвязь значительного изменения жизненно важных показателей КОС и ПОЛ у половозрелых крыс с ингибированием NO-синтазы в раннем постнатальном онтогенезе представляется более сложной, чем ее объяснение с позиций непосредственного отсутствия регулирующего фактора нитрозотиолов в организме крыс, и требует дополнительных исследований.

#### Заключение

Изучено влияние ингибирования NO-синтазы у крыс в раннем постнатальном онтогенезе на сократительную способность сердца: максимальное систолическое давление в левом желудочке, частоту сердечных сокращений; на

внутрисосудистое давление, на процессы тканевого массопереноса кислорода, ПОЛ и КОС крови у взрослых животных.

Получены новые данные показывают, что у половозрелых крыс, которым на 1–3 сутки после рождения вводили подкожно L-NAME снижалось максимальное систолическое внутрижелудочковое давление, возрастало тканевое дыхание сердечной мышцы, наблюдалось ускорение свободно-радикальных процессов на фоне метаболического некомпенсированного ацидоза, определяемого по результатам КОС крови крыс.

## Литература

1. Гурин, А. В. Функциональная роль оксида азота в центральной нервной системе / А. В. Гурин // Успехи физиологических наук. 1997, Т. 28. № 1, С. 53–57.
2. Bains, J. S. Inhibition of nitric oxide synthase potentiates cardiovascular responses to electrical stimulation of the subfornical organ / J. S. Bains, A. V. Ferguson // Abstracts of XXXII International Congress of Physiological Sciences. Glasgow. 1993. Vol. 2. P. 249.
3. Sakuma, I. NG-Methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo – a role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone / I. Sakuma, S. S. Gross, R. Levi // Circulation Res. 1992. Vol. 70, № 3. P. 607–611.
4. Зинчук, В. В. Участие сродства гемоглобина к кислороду в поддержании прооксидантно-антиоксидантно состояния организма / В. В. Зинчук // Медицинские новости. Минск, 2002. № 2. С. 20–25.
5. Нечипуренко, Н. И. Особенности мозговой оксигенации при моделировании локальной ишемии головного мозга в условиях модуляции NO-ергических процессов / Н. И. Нечипуренко // Актуальные проблемы неврологии и нейрохирургии. Минск, 2002. Вып. 4. С. 132–140.