

УДК 612.828: 612.181.2: 612.146.3

© Колектив авторів, 2012.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ОКСИДУ АЗОТУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ МЕДУЛЯРНИХ КАРДІОВАСКУЛЯРНИХ НЕЙРОНІВ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Л.М. Шаповал, О.В. Дмитренко, Л.Г. Степаненко, Л.С. Побігайло, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, відділ фізіології кровообігу (зав. – член-кор. НАН України В.Ф.Сагач), м.Київ.

IMPACT OF NITRIC OXIDE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE MEDULLARY CARDIOVASCULAR NEURONS IN RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

L.N. Shapoval, O.V. Dmitrenko, L.G. Stepanenko, L.S. Pobegailo, V.F. Sagach

SUMMARY

In rats with experimental streptozotocin-induced diabetes, activation of neuronal NO-synthase (NOS-1) by injections of L-arginine, and inhibition of NOS-1 by injections of its antagonist L-NNA in the medullary neurons are accompanied by the development of less pronounced changes in systemic arterial pressure, compared to rats with normal sugar levels in the blood. The data obtained suggest that violations of the NOS-1 are available in these animals.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОКСИДА АЗОТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕДУЛЛЯРНЫХ КАРДІОВАСКУЛЯРНЫХ НЕЙРОНОВ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДІАБЕТОМ

Л.Н. Шаповал, О.В. Дмитренко, Л.Г. Степаненко, Л.С. Побегайло, В.Ф. Сагач

РЕЗЮМЕ

У крыс с экспериментальным стрептозотоксин-индуцированным сахарным диабетом активация нейрональной NO-синтазы (NOS-1) инъекциями L-аргинина, а также угнетение NOS-1 с помощью инъекций ее антагониста L-NNA в медуллярные нейроны сопровождаются развитием менее выраженных изменений системного артериального давления, чем у крыс с нормальным уровнем сахара в крови. Полученные данные свидетельствуют о нарушениях NOS-1 у этих животных.

Ключові слова: нейрональна NO-синтаза, цукровий діабет.

В чисельних дослідженнях показано, що у хворих на цукровий діабет головним ускладненням є кардіоваскулярна дисфункція, в патогенезі якої значне місце посідають оксидативний стрес і порушення в системі оксиду азоту. Вона також опосередковується здатністю інсуліну посилювати симпатичну нервову активність [7] і впливати на барорефлекс [9], тобто реалізуватися через ЦНС. На цей час ендogenous інсулін і рецептори до нього ідентифіковані в ЦНС [5].

Відомо, що оксид азоту (NO) виконує сигнальну функцію в ЦНС [4]. Його участь в нервовому контролі функції кровообігу значною мірою реалізується через NO- синтезуючі нейрони довгастого мозку [6, 10, 11], ідентифіковані імуногістохімічними методами у різних експериментальних тварин, включаючи щурів [12]. Зважаючи на те, що внесок NO в медулярний нервовий контроль функції кровообігу при експериментальній гіперглікемії практично не вивчений, задачу проведеного дослідження становило вивчення ефектів активації і пригнічення нейрональної NO-синтази (NOS-1) в довгастому мозку щурів із експериментальною гіперглікемією.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експерименти проведені на щурах із стрептозотоксин-індукованим цукровим діабетом. Стрептозотоксин (50мг/кг) вводився одноразово внутрішньоочеревинно. Тварин утримували в умовах

віварію на стандартному харчовому раціоні. Утримання та використання тварин проводили згідно з біотичними вимогами Європейської конвенції про захист тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Експерименти проводились на наркотизованих уретаном (1600мг/кг, внутрішньоочеревинно) щурах через 60 днів після введення препарату.

В сонну артерію вводили канюлю для вимірювання системного артеріального тиску за допомогою тензодатчика. Частоту серцевих скорочень (ЧСС) розраховували по пульсовим коливанням артеріального тиску. Після фіксації голови тварини у стереотаксичному приладі СЕЖ-3, модифікованого для роботи на дрібних тваринах, відкривали поверхню довгастого мозку. Тест-речовини вводили у досліджувані ядра довгастого мозку (ядро солітарного тракту (NTS), обопільне ядро (AMB), латеральне ретикулярне ядро (LRN), парамедіанне ретикулярне ядро (PMn) шляхом мікроін'єкцій, згідно координат стереотаксичного атласу [8]. У медулярні структури вводили субстрат для синтезу ендogenous NO амінокислоту L-аргінін (5.8 нмоль) і антагоніст нейрональної NO-синтази N^G нітро-L-аргінін (L-NNA, 23 нмоль). Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з

використанням критерію Стьюдента за допомогою стандартної комп'ютерної програми; як статистично значимі розглядались відмінності з $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Ін'єкції L-аргініна (5.8 нмол) у ядра дорсомедіального відділу довгастого мозку щурів із експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом супроводжувались наступними змінами рівня САТ: після ін'єкцій у PMn рівень САТ знизився в середньому на 14.6 % ($P > 0,05$), в AMB – на 18.7 % ($P < 0,05$), ін'єкції в NTS супроводжувались зниженням рівня САТ на 15,2 % ($P > 0,05$) з наступним його підвищенням на 12.7 % ($P > 0,05$); а після його введення в каудальну частину LRN рівень САТ підвищувався в середньому на 8,9 % ($P > 0,05$) (рис.1).

В попередньому дослідженні нами виявлено, що у контрольних щурів введення L-аргініна (5.8 нмол) в PMn супроводжувалось зниженням САТ на 22.4 % ($P < 0,05$), в LRN - на 18.8 % ($P < 0,05$), в NTS – на 24.2 % ($P < 0,05$) [1]. Якщо порівняти ефекти введення L-аргініна у досліджувані ядра довгастого мозку контрольних щурів з нормальним рівнем цукру в крові і щурів із експериментальною гіперглікемією, то стає очевидним, що у останніх вони значно менш виражені, ніж у контрольних щурів і, як правило, статистично невірогідні. Звертає на себе увагу і той факт, що у щурів з експериментальним цукровим діабетом збільшується вірогідність розвитку гіпертензивних реакцій на введення L-аргініна у медулярні кардіоваскулярні ядра. Зміни ЧСС були незначні.

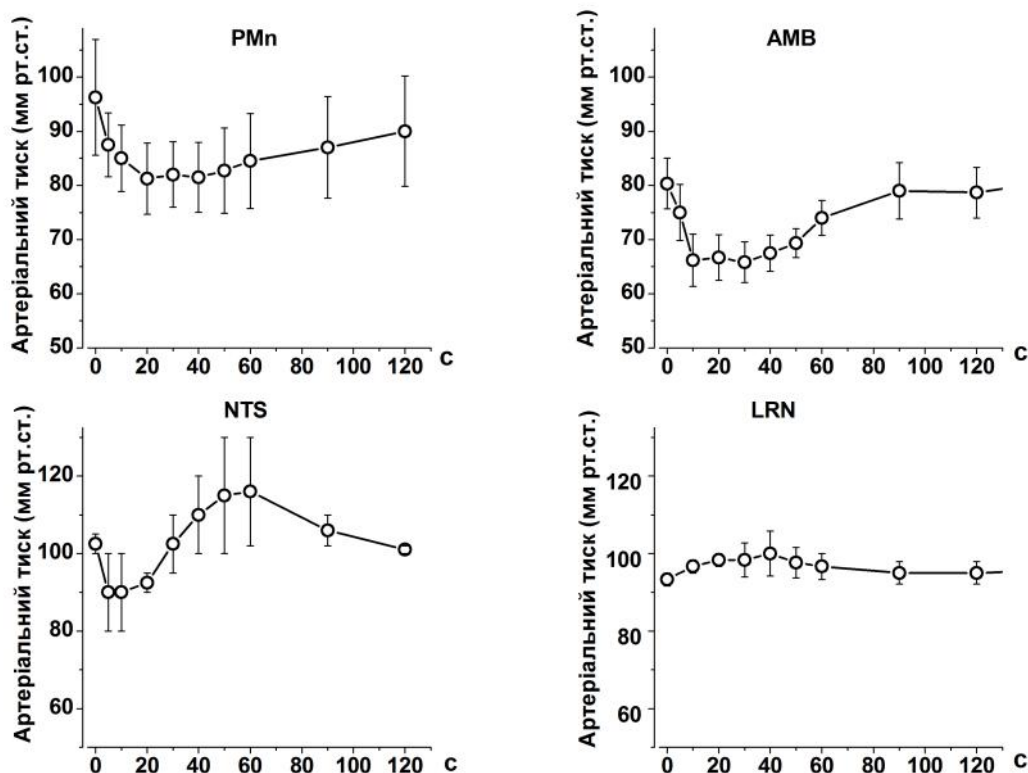


Рис.1. Динаміка змін системного артеріального тиску (САТ), викликаних ін'єкціями L-аргініна (5.8 нмоль) в парамедіанне ретикулярне ядро (PMn), обопільне ядро (AMB), латеральне ретикулярне ядро (LRN) і ядро солітарного тракту (NTS) у щурів із експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом. По осі абсцис – час (с), по осі ординат – значення САТ (мм рт.ст).

Після ін'єкцій антагоніста NOS-1 L-NNA в медулярні ядра у щурів із стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом спостерігався розвиток гіпертензивних реакцій, як і у щурів з нормальним рівнем цукру в крові, але кількісно менш вираженим, порівняно із таким у контрольних щурів (Рис. 2).

Кардіоваскулярні захворювання, в яких нейрональні ефекти NO мають важливе значення, включають гіпертензію, атеросклероз, серцеву

недостатність і діабет. На цукровий діабет хворіє 5 % населення планети, і ця цифра неухильно зростає. Провідною причиною смертності хворих на цукровий діабет (70 % випадків) є саме захворювання серцево-судинної системи. Саме тому особливо важливим є детальне дослідження механізмів розвитку цього захворювання. Незважаючи на досить велику кількість публікацій, які свідчать про важливе значення NO в нервовому контролі функції кровообігу, багато питань, які стосуються тонких

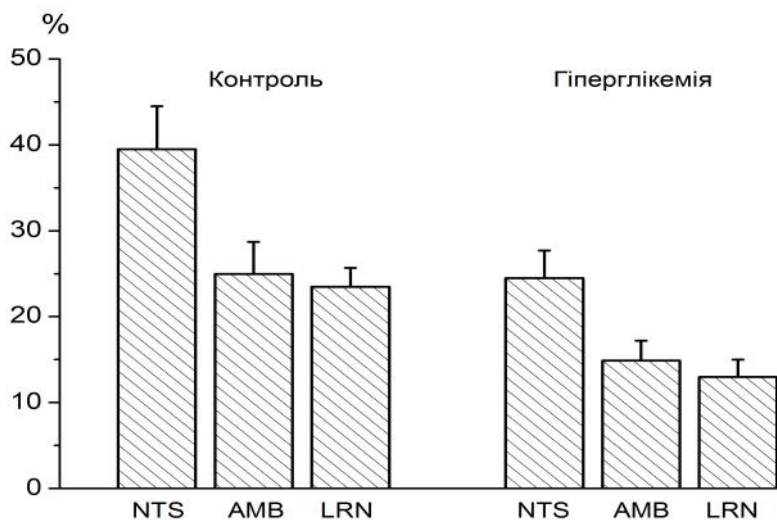


Рис. 2. Ефекти пригнічення нейрональної NO-синтази (NOS-1) медулярних нейронів у щурів із нормальним рівнем цукру в крові і щурів із експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом.

механізмів його участі в регуляції діяльності серцево-судинної системи, зокрема нейронами довгастого мозку в нормі і при патологічних станах залишаються недостатньо вивченими або не вивченими взагалі. Про зв'язок інсуліну із системою оксиду азоту в медулярних нейронах свідчать дані, що унілатеральні мікроін'єкції інсуліна в NTS викликають розвиток гіпотензивних реакцій і брадикардії, а після попереднього пригнічення нейрональної NO-синтази викликані інсуліном кардіоваскулярні ефекти послаблюються [2].

Отримані нами дані свідчать про те, що при цукровому діабеті порушується нервовий контроль функції кровообігу NO-синтезуючими нейронами довгастого мозку щурів за рахунок ушкодження NOS-1. В умовах інактивації ензиму внаслідок недостатньої кількості субстрату, як це відбувається, наприклад, при гіпертензії, введення L-аргініна в медулярні ядра активує ензим і супроводжується розвитком навіть більш виражених гіпотензивних реакцій, ніж на його введення нормотензивним щурам [2]. В досліді на щурах із експериментальним цукровим діабетом цього не відбувалось – реакції на ін'єкції L-аргініна залишались менш вираженими, ніж у щурів із нормальним рівнем цукра в крові.

ВИСНОВКИ

1. У щурів із експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом ін'єкції L-аргініна в медулярні нейрони супроводжуються розвитком менш виражених змін системного артеріального тиску, порівняно з такими у щурів з нормальним рівнем цукру в крові.

2. Ефекти пригнічення NOS-1 медулярних нейронів менш виражені у щурів із

експериментальним цукровим діабетом, порівняно із контрольними щурами.

3. Отримані дані свідчать про порушення нейрональної NO-синтази у щурів із стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шаповал ЛН, Сагач ВФ, Побегайло ЛС и др. Участие оксида азота в медулярном контроле функции кровообращения у нормотензивных крыс // *Нейрофизиология*. – 2002. – 34, 4. – С. 294-302.

2. Шаповал Л.Н., Дмитренко О.В., Побегайло Л.С., Степаненко Л.Г., Сагач В.Ф. Гемодинамические реакции, индуцируемые модуляцией активности системы оксида азота и проницаемости митохондриальных мембран в медулярных кардиоваскулярных ядрах крыс // *Нейрофизиология*, 2007. -39, 3. – 232-244.

3. Chiang HT, Cheng WH, Lu PJ, Huang HN, Lo WC, Tseng YC, et al. Neuronal nitric oxide synthase activation is involved in insulin-mediated cardiovascular effects in the nucleus tractus solitarius of rats // *Neuroscience*. – 2009. – 159 (2). – P. 727-734.

4. Garthwaite J., S. I. Charles, and R. Chess-Williams. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests its role as intercellular messenger in the brain // *Nature*. – 1988. – 336. – P.385-388.

5. Havrankova J., Schmechel D., Roth J., Brownstein M. Identification of insulin in rat brain // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. – 1978. – 75 (11). – P.5737 – 5741.

6. Krukoff TI. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions // *Brain Res. Rev.* 1999. – 30. – P.52-65.

7. McKernan AM, Calaresu FR. Insulin microinjection

into nucleus tractus solitarii of the vrat attenuates the baroreceptor reflex// J.Auton. Nerv.Syst. – 1996. – 61. – P. 128-138.

8. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Acad.Press, New York, 1982.

9. Pricher MP, Freeman KI, Brooks VL. Insulin in the brain increases gain of baroreflex control of heart rate and lumbar sympathetic nerve activity// Hypertension. – 2008. – 51. – P.514-520.

10. Shapoval LN, Sagach VF, Pobegailo LS. Nitric

oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat// Neurosci. Lett. – 1991. – 132. – P.47-50.

11. Zanzinger J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular functions// Cardiovasc.Res. – 1999. – 43. – P. 639-649.

12. Zanzinger J, Seller H. Species differences in the distribution of nitric oxide synthase in brain stem regions that regulate sympathetic activity// Brain res. – 1997. – 764. – P. 265-268.