

УДК 616.12-018.1-008.9:616.12-008.331.1-021.3-06: [616.153.455-008.61+616.13-004.6]]-092.9

© М.Ю. Колесник, 2012.

## НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ ОКСИДА АЗОТА КАРДИОМИОЦИТОВ У КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И АТЕРОСКЛЕРОЗА

**М.Ю. Колесник***Запорожский государственный медицинский университет, центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. – проф., д.мед.н. А.В. Абрамов), г. Запорожье.*

### THE ABNORMALITIES IN NITRIC OXIDE SYSTEM IN CARDIOMYOCYTES OF SPONTANEOUS HYPERTENSIVE RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA AND ATHEROSCLEROSIS

**M.Y. Kolesnyk**

#### SUMMARY

It was presented in the article the results of the cytosolic and mitochondrial nitric oxide system function in cardiomyocytes of spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes mellitus and atherosclerosis. It was established the deficiency of nitric oxide metabolism stable products and decreased activity of constitutional NO-synthase in hypertensive rats, mostly in the group with atherosclerosis. It was detected the high level of nitric stress markers and increased expression of inducible NO-synthase in hypertensive rats opposite to normotensive animals.

### ПОРУШЕННЯ У СИСТЕМІ ОКСИДУ АЗОТУ КАРДІОМІОЦИТІВ У ЩУРІВ ЗІ СПОНТАННОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ НА ФОНІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ ТА АТЕРОСКЛЕРОЗУ

**М.Ю. Колесник**

#### РЕЗЮМЕ

В статті представлені результати дослідження системи оксиду азоту в цитозолі та мітохондріях кардіоміоцитів щурів із спонтанною гіпертензією та експериментальним цукровим діабетом та атеросклерозом. Встановлено дефіцит стабільних продуктів оксиду азоту, зниження активності конституціональної NO-синтази у гіпертензивних щурів, найбільше в групі з атеросклерозом. Виявлено високий рівень маркерів нітрозуючого стресу та підвищену експресію індукційної NO-синтази в мітохондріях кардіоміоцитів гіпертензивних щурів порівняно із нормотензивними тваринами.

**Ключевые слова:** спонтанно гипертензивные крысы, оксид азота, митохондрии, гипергликемия, атеросклероз.

Несмотря на значительные достижения в изучении патогенеза артериальной гипертензии (АГ), остается много нерешенных вопросов относительно молекулярно-биохимических механизмов формирования и прогрессирования этого заболевания. Известно также, что в клинической практике АГ часто сочетается с сахарным диабетом (СД) и ишемической болезнью сердца (ИБС). В этой связи исследование патогенеза поражения органов-мишеней при сочетанной патологии является важным и перспективным направлением.

В последние годы активно изучается роль оксида азота (NO) при АГ [10]. Уникальная химическая природа, большое число внутриклеточных мишеней для NO и продуктов его превращения предполагают их важную роль в течении АГ. Рядом исследований было показано участие NO в регуляции артериального давления (АД), процессе формирования эндотелиальной дисфункции и повреждении органов-мишеней [7]. Получены данные о том, что у крыс со спонтанной гипертензией регистрируется снижение активности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), а параллельно отмечается повышение активности индуцибельной

NO-синтазы (iNOS) в гладких мышцах сосудов и макрофагов [11]. Считается, что увеличение iNOS на ранних стадиях гипертензии имеет компенсаторное значение, ограничивающее подъем АД, но в дальнейшем синтезируемый в избытке NO подавляет активность eNOS и запускает процесс нитрозирующего стресса.

Также в ряде экспериментальных работ было продемонстрировано, что нарушение нормальной регуляции АД происходит на фоне развивающегося энергетического дефицита [4,8]. Последнее во многом обусловлено особенностями функционирования митохондрий в условиях АГ. NO и его продукты оказывают многостороннее и разнонаправленное влияние на эти органеллы, участвуя в механизмах цитотоксичности и апоптоза [5,6]. Установлено, что продукты превращения NO - пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>), ион нитрозония (NO<sup>+</sup>), нитроксил (NO<sup>-</sup>) и диазоттриоксид (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) являются основными факторами реализации нитрозирующего оксидативного стресса [12]. При этом важное значение имеет исследование факторов, снижающих цитотоксичность NO и его метаболитов, в частности роль тиол-дисульфидной системы и ее компонентов.

Цель исследования - изучение состояния системы оксида азота и тиол-дисульфидной системы в цитозольной и митохондриальной фракциях кардиомиоцитов крыс со спонтанной гипертензией на фоне экспериментальной гипергликемии и атеросклероза.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовались нормотензивные белые беспородные крысы-самцы массой 220-270 г (n=10), а также спонтанно гипертензивные крысы-самцы (SHR) массой 220-300 г (n=30). Все манипуляции были проведены в соответствии с «Положениями про використання тварин у біомедичних дослідженнях», которые согласованы с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» [1]. Крысы линии SHR предоставлены научно-исследовательской лабораторией кафедры фармакологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца (зав. – член.-кор. НАН и НАМН Украины, профессор Чекман И.С.). Первая экспериментальная группа состояла из крыс линии SHR (n=10), которым моделировали сахарный диабет путем однократного внутривентриального введения стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг, разведенного ex tempore в 1 мл 0,1M цитратного буфера (pH 4,5) после 12-часового голодания. Далее каждое животное размещали в отдельной клетке при свободном доступе к воде и пище. В течение первых суток эксперимента крысам выпаивали 20 % раствор глюкозы, в течение вторых – 10 % [3]. Вторая экспериментальная группа была представлена крысами линии SHR (n=10), которым моделировали атеросклероз путем ежедневного перорального введения гиперлипидогенной смеси на протяжении 20 суток, состоящей из масляного раствора холестерина в дозе 40 мг/кг и эргокальциферола в дозе 350000 Ед/кг и твина-80 в дозе 10 мг/кг [9]. Третья группа состояла из 10 интактных крыс-самцов SHR. В качестве группы контроля использовали нормотензивных беспородных крыс-самцов (n=10).

На 20-й день исследования у крыс всех групп измерялось систолическое артериальное давление (АД) методом плетизмографии при помощи прибора «Trasonic Animal Research Flowmeter T-106 Series» («Trasonic Systems Inc.», США). Измерение проводилось трижды с усреднением полученных результатов. Уровень АД у нормотензивных крыс составил  $126 \pm 3$  мм рт.ст., а у крыс линии SHR  $155 \pm 5$  мм рт.ст. ( $p < 0,05$ ). После этого животных декапитировали под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг).

Материалом для исследований явилась ткань сердца, из которой выделяли митохондриальную и цитозольную фракцию по методике, описанной в наших предыдущих работах [2]. В этих фракциях

определяли показатели системы оксида азота – уровень нитрит-аниона, общую активность NO-синтазы, содержание нитротирозина, а также уровень восстановленных тиолов и активность глутатионредуктазы (ГР). Значения нитрит-аниона, восстановленных тиолов, активности NO-синтазы и ГР регистрировали спектрофотометрически на приборе Libra S32 PC («Biochrom Ltd.», Англия). Содержание нитротирозина анализировали методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции, прилагаемой к набору. Концентрацию индуцибельной NO-синтазы (iNOS) определяли методом Вестерн-блот анализа. Белки разделяли в 10% полиакриламидном геле. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроосмоцией в течение 45 мин. Преинкубацию образцов проводили в растворе трис-буфера с 5% обезжиренным молоком в течение 1 часа. Затем Вестерн-блоты инкубировали в присутствии первичных моноклональных антител против iNOS («Santa Cruz Biotechnology», США) в разведении 1:500 в течение 1 ч. После отмывки наносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение 1:1000) в течение 1 часа («Santa Cruz Biotechnology», США). Детекцию iNOS осуществляли путем расчета площади и интенсивности иммунологического свечения при помощи специализированных программ анализа изображения.

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ «Statistica 6.0» («StatSoft», США, № лицензии AXXR712D833214FAN5). Сравнительный анализ в группах проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием критерия Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений. Статистически значимыми считали отличия при  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено снижение образования нитрит-аниона и NO-синтазы как в митохондриях, так и в цитозоле миокарда всех групп крыс линии SHR (табл.1). Наибольший дефицит наблюдался в группе животных с атеросклерозом. При этом было выявлено значительное повышение экспрессии iNOS в митохондриях спонтанно гипертензивных животных -  $1,882 \pm 0,164$  против  $0,117 \pm 0,023$  у нормотензивных крыс ( $p < 0,05$ ). Такая высокая активность iNOS в митохондриях может приводить к образованию патологических метаболитов NO, а также вызывать необратимые повреждения этих органелл, путем открытия гигантской митохондриальной поры [5,8].

Подтверждением этому может служить повышенное содержание в митохондриях миокарда животных со спонтанной гипертензией

Таблица 1

## Показатели системы оксида азота в цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената сердца

Группа животных, уровень АД	Нитриты, мкмоль/г ткани		NOS, мкмоль НАДФ/мин/г белка	
	цитозольная фракция	митохондрия фракция	цитозольная фракция	митохондрия фракция
SHR + СД <sub>1</sub>	6,358 ± 0,8	6,745 ± 0,497	5,485 ± 0,31	2,427 ± 0,201
SHR + атеросклероз <sub>2</sub>	5,059 ± 0,98	5,308 ± 0,778	2,029 ± 0,324	3,263 ± 0,568
SHR <sub>3</sub>	7,762 ± 0,678	6,203 ± 0,952	5,155 ± 0,64	1,876 ± 0,079
Контроль <sub>4</sub>	12,233 ± 0,786	16,338 ± 1,061	9,748 ± 0,756	4,369 ± 0,264
	P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>1-4</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> >0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05 P <sub>3-4</sub> <0,05	P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>1-4</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> >0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05 P <sub>3-4</sub> <0,05	P <sub>1-2</sub> <0,05 P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>1-4</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> <0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05 P <sub>3-4</sub> <0,05	P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>1-4</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> <0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05 P <sub>3-4</sub> <0,05

Примечание: здесь и в таблице 2 – <sub>1</sub>SHR + СД – спонтанная гипертензия + сахарный диабет; <sub>2</sub>SHR + атеросклероз – спонтанная гипертензия + атеросклероз; <sub>3</sub>SHR – спонтанная гипертензия; <sub>4</sub>нормотензивные крысы.

нитротирозина – маркера оксидативного стресса. Его уровень у нормотензивных животных составил 89 ± 28,27 нмоль/г, что было достоверно ниже, чем у крыс линии SHR всех экспериментальных групп. Наиболее высокие значения нитротирозина были в группе крыс линии SHR с атеросклерозом – 303,7 ± 4,07 нмоль/г (в 2,9 раза по сравнению с нормотензивными животными, p<0,05).

Цитотоксические дериваты NO подавляют активность эндотелиальной NO-синтазы, что приводит

к интенсификации механизмов повреждения органов – мишеней. Фактором, обеспечивающим сохранение цитопротективных свойств NO, является антиоксидантная система клетки, в частности, тиол-дисульфидная. Нашими исследованиями было выявлено достоверное снижение ее активности в виде дефицита ГР и восстановленных тиольных соединений в цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената сердца спонтанно гипертензивных животных (табл. 2).

Таблица 2

## Показатели тиол-дисульфидной системы в цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената сердца

Группа животных, уровень АД	Глутатионредуктаза, мкмоль/мин/г белка		Восстановленные тиолы, ммоль/г белка	
	цитозольная фракция	митохондрия фракция	цитозольная фракция	митохондрия фракция
SHR + СД <sub>1</sub>	3,92 ± 0,28	1,578 ± 0,289	5,485 ± 0,31	2,427 ± 0,201
SHR + атеросклероз <sub>2</sub>	2,125 ± 0,3	1,051 ± 0,242	2,029 ± 0,324	3,263 ± 0,568
SHR <sub>3</sub>	3,586 ± 0,401	1,782 ± 0,213	5,155 ± 0,64	1,876 ± 0,079
Контроль <sub>4</sub>	7,653 ± 0,68	3,288 ± 0,36	9,748 ± 0,756	4,369 ± 0,264
	P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>1-4</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> >0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05 P <sub>3-4</sub> <0,05	P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>1-4</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> >0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05 P <sub>3-4</sub> <0,05	P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>1-4</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> >0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05 P <sub>3-4</sub> <0,05	P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>1-4</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> >0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05 P <sub>3-4</sub> <0,05

При этом нарушение активности тиол-дисульфидной системы в максимальной степени проявилось в группе животных со спонтанной гипертензией и атеросклерозом.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии системных нарушений обмена оксида азота у животных со спонтанной гипертензией. При моделировании у них сахарного диабета и атеросклероза патологические изменения приобретают более выраженный характер. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов поражения органов-мишеней при АГ может стать основой для создания новых подходов к фармакологической коррекции этого заболевания.

#### ВЫВОДЫ

1. В цитозоле и митохондриях кардиомиоцитов крыс со спонтанной гипертензией регистрируется дефицит стабильных продуктов оксида азота и активности eNOS по сравнению с нормотензивными животными.

2. В митохондриях кардиомиоцитов спонтанно гипертензивных крыс отмечается активация оксидативного нитрозирующего стресса, ассоциированная с высокой экспрессией iNOS.

3. У спонтанно гипертензивных крыс выявлено снижение активности тиол-дисульфидной системы в цитозоле и митохондриях кардиомиоцитов, участвующей в снижении цитотоксичности продуктов оксида азота.

4. Наиболее выраженные нарушения в системе оксида азота кардиомиоцитов были зарегистрированы у животных линии SHR с моделированным атеросклерозом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // Експер. та клін. фізіол. біохімія. – 2003. - №2 (22). – С. 108-109.

2. Колесник М.Ю. Особенности функционирования митохондрий миокарда у крыс со спонтанной гипертензией (SHR) на фоне экспериментального сахарного диабета и атеросклероза/М.Ю. Колесник, И.Ф. Беленичев, Г.В.

Дзяк, И.С. Чекман// Запорожский медицинский журнал. – 2012. - № 2. – С. 26-31.

3. Патент 53327 України, МПК G09B23/00. Спосіб визначення резистентності бета-клітин панкреатичних острівців підшлункової залози в експерименті / Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Ганчева О.В., Іваненко Т.В.; власники Запорізький державний медичний університет. - № u 2010 00744; заявл. 2010.01.26; опубл. 2010.10.11.\

4. Постнов Ю.В. К развитию мембранной концепции патогенеза первичной гипертензии (нарушенная функция митохондрий и энергетический дефицит)/Ю.В.Постнов// Кардиология. – 2000. – № 10. – С.4—12.

5. Bolacos J. Persistent mitochondrial damage by nitric oxide and its derivatives: neuropathological implications/ J. Bolacos, S. Heales// Front Neuroenergetics. - 2010. – Vol. 2(1).

6. Davidson S. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance/ S. Davidson, M. Duchon// Cardiovascular Research. – 2006. – Vol. 71(1). – P.10-21.

7. Excessive nitric oxide function and blood pressure regulation in patients with autonomic failure/ A. Gamboa, C. Shibao, A. Diedrich et al.// Hypertension. – 2008. – Vol. 51(6). – P. 1531–1536.

8. Gustaffson A. Heart mitochondria: gates of life and death / A. Gustaffson, R. Gottlieb // Cardiovascular Research. – 2008. – Vol. 77. – P. 334-343.

9. Iousufzai S.Y.K. 3-Hydroxy-3-Methyl-glutaric Acid and Experimental Atherosclerosis in Rats / S.Y.K. Iousufzai, M. Siddigi // Experientia. - 1976. – Vol. 32. - P.1033-1036.

10. Nitric oxide and cardiac function/ P. Massion, O. Ferron, C. Dessy et al.// Circulation Research. – 2003. – Vol. 93. – P.388-398.

11. Renal NOS activity, expression, and localization in male and female spontaneously hypertensive rats/ J. Sullivan, J. Pardieck, K. Hyndmann et al.// AJP Journal. – 2010. – Vol. 298 (1). – P. 61-68.

12. Shiffrin E. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase/ E. Shiffrin// Hypertension. – 2008. – Vol. 51. – P. 31-32.