

ПОКАЗАТЕЛИ ПРОДУКЦИИ ОКИДА АЗОТА В ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ АНТЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Томилова И. К.*, кандидат медицинских наук,
Слободин В. Б., доктор медицинских наук

Кафедра биологической химии ГОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия»
Минздравсоцразвития России, 153012, г. Иваново, просп. Ф. Энгельса, д. 8

РЕЗЮМЕ Исследованы особенности метаболизма оксида азота в головном мозге плодов и новорожденных при экспериментальном нарушении маточно-плацентарного кровообращения. Установлено, что наиболее вероятной причиной гиперпродукции NO является активация нитритредуктазной составляющей цикла окиси азота, что имеет практическое значение для коррекции его цитотоксического эффекта.

Ключевые слова: нейроонтогенез, оксид азота, нарушение маточно-плацентарного кровообращения, гипоксия.

* Ответственный за переписку (corresponding author): тел.: 8-910-990-86-09

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-97552

Одним из наиболее ярких открытий последних десятилетий является установление важной роли оксида азота (NO) в регуляции многочисленных физиологических и патофизиологических процессов в организме, в том числе в центральной нервной системе (ЦНС). С одной стороны, он является мощным вазодилататором [8], что способствует улучшению кровоснабжения тканей, а также нейромодулятором и медиатором [7]. Известны и антиоксидантные свойства оксида азота, которые препятствуют процессам перекисного окисления липидов, в частности, нейтрализации супероксид-аниона [4, 9]. С другой стороны, в последние годы установлено, что NO играет важную роль в гибели клеток под действием гипоксии, поскольку он реагирует с липофильными пероксидными радикалами, приводя к генерации значительно более стабильных алкилпероксинитритов (LOONO), а также высокореакционноспособного пероксинитрита ONOO [1, 5]. Поэтому крайне важным и интересным представляется исследование метаболизма оксида азота в ЦНС новорожденных в условиях антенатальной гипоксии.

Цель работы – изучить особенности обмена оксида азота в головном мозге плодов и новорожденных крысят, развивавшихся при нарушении маточно-плацентарного кровообращения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на белых беспородных беременных крысах массой 220–280 г. Модель нарушения маточно-плацентарного кровообращения воспроизводилась по методике М. М. Вартановой [2] путем перевязки 1/3 преплацентарных сосудов на 16–17-е сутки беременности, т. е. в тот период, когда после завершения плацентации плод полностью переходит на плацентарное кровообращение. У одной группы животных на 21–22-й день беременности после эвтаназии плоды извлекались, декапитуировались, выделялся головной мозг и готовился гомогенат. Плоды контрольной рога матки составили контрольную группу, экспериментального рога – опытную. У другой группы животных после рождения крысят на вторые сутки производились их взвешивание, измерялась длина, оценивалось состояние кожных покровов, двигательная активность. Они рас-

Tomilova I. K., Slobodin V. B.

NITRIC OXIDE PRODUCTION INDICES IN ONTOGENESIS UNDER ANTENATAL HYPOXIA IN RATS

ABSTRACT The peculiarities of nitric oxide metabolism in the brain of fetus and newborns in experimental disorder of uteroplacental blood circulation were investigated. It was stated that the activation of nitrite reductase component of nitric oxide cycle was the most probable cause of NO hyperproduction and this fact had the practical significance for its cytotoxic effect correction.

Key words: neuroontogenesis, nitric oxide, disorder of uteroplacental blood circulation, hypoxia.

пределялись на контрольную и опытную группы, после чего новорожденные крысы также декапитировались, выделялся головной мозг и готовился гомогенат.

Метаболизм оксида азота оценивался по концентрации в гомогенатах мозга его конечных метаболитов – нитрит- и нитрат-ионов, а также содержанию субстрата NO-синтазной реакции – аргинина.

Содержание нитрит-ионов в гомогенатах определялось после предварительного осаждения белков сульфатом цинка в реакции диазотирования сульфаниловой кислоты с последующим соединением соли диазония с α -нафтиламином и образованием азокрасителя красного цвета [10]. Концентрация нитрат-ионов устанавливалась ионоселективным методом. Уровень аргинина определяли методом тонкослойной ионообменной хроматографии на носителе «Fixion». Статистическая обработка результатов была проведена по общепринятым методикам вариационной статистики. Достоверность различий данных рассчитывалась по критерию Стьюдента с помощью программы «Statistica 5.5».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании содержания нитритов – конечных метаболитов оксида азота (II) – отмечалось его достоверное увеличение (в 1,3 раза по сравнению с контролем) в головном мозге плодов опытной группы (табл. 1).

Известно, что биосинтез NO происходит из L-аргинина. Эксперименты, проведенные на новорожденных крысах, развивавшихся в условиях нарушенного маточно-плацентарного кро-

вообращения, показали достоверное увеличение содержания данной аминокислоты в головном мозге опытных животных в 1,7 раза ($p < 0,05$) (табл. 2). По сравнению с контролем повышенной оказалась и концентрация конечных продуктов метаболизма NO: содержание нитрит-анионов увеличилось в 2,4 раза ($p < 0,05$), а нитрат-анионов – в 1,4 раза ($p < 0,01$) (табл. 2).

Как видно из таблицы, в головном мозге новорожденных крыс опытной группы возрастало содержание как субстрата для синтеза NO, так и конечных продуктов его метаболизма. Ожидаемого снижения пула L-аргинина в нашем эксперименте не происходило.

При интерпретации полученных данных следует учитывать, что метаболизм оксида азота является универсальным циклическим механизмом, однако нитритредуктазная его компонента часто остается вне поля зрения исследователей.

В нормальных физиологических условиях NO синтезируется только тогда, когда он необходим, и в таком количестве, которое нужно в каждый конкретный момент. При дефиците кислорода роль NO-синтазного механизма может снижаться, при этом активируется более мощная нитритредуктазная компонента, которая почти на три порядка выше, чем NO-синтазная [5, 11] (рис.).

Для ферментативного окисления L-аргинина с участием NO-синтаз требуется кислород. Поэтому при ишемии/гипоксии NO-синтазный механизм должен ингибироваться. В то же время дефицит кислорода обеспечивает активную работу нитритредуктазных систем, связанных с гемсодержащими белками – гемоглобином, миоглобином, цитохромоксидазой и цитохромом

Таблица 1. Содержание нитрит-ионов в головном мозге плодов крыс ($M \pm m$)

Группа	Содержание нитрит-ионов, мг/г ткани
Контрольная (n = 23)	$0,027 \pm 0,005$
Опытная (n = 18)	$0,036 \pm 0,002^*$

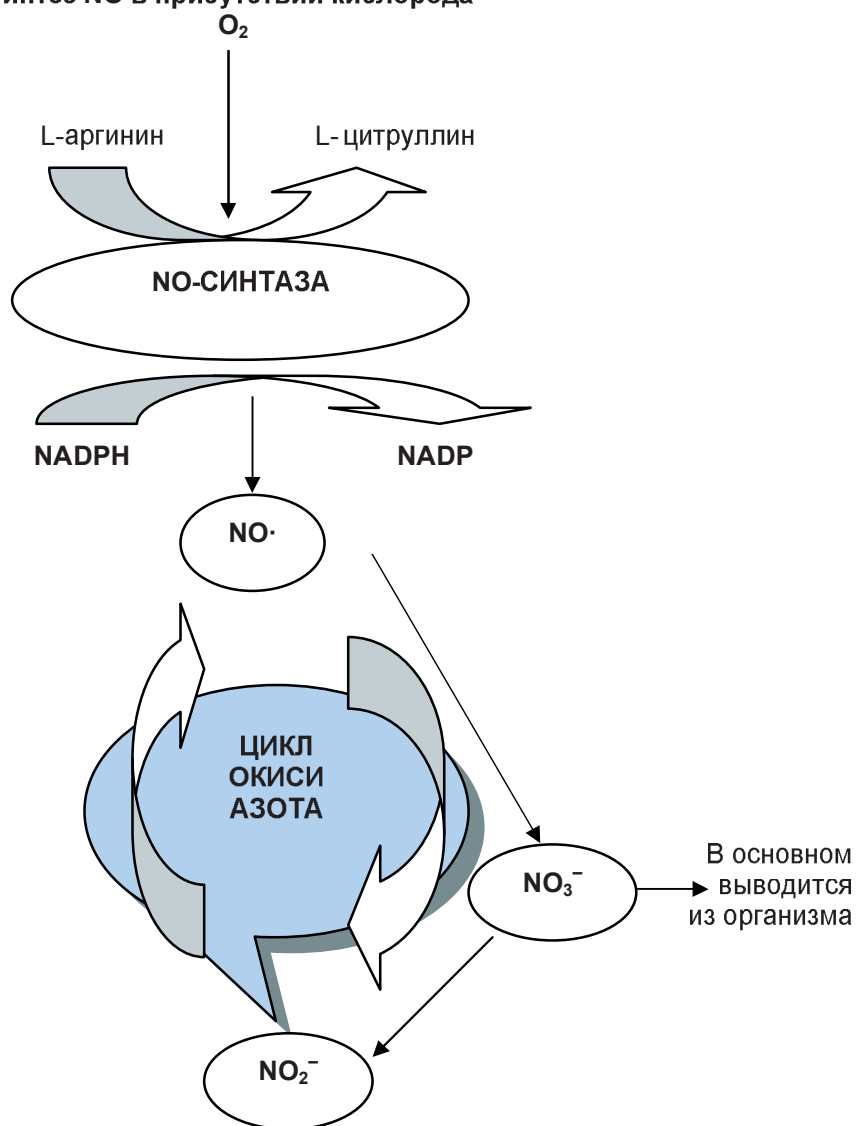
Примечание. Достоверность различий с показателем контрольной группы: * – $p < 0,001$.

Таблица 2. Показатели обмена оксида азота (II) в головном мозге новорожденных крысят ($M \pm m$)

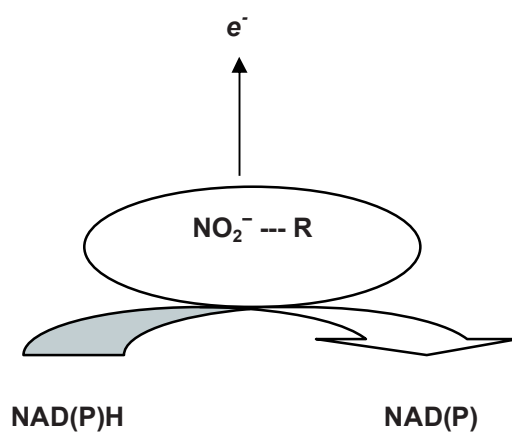
Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
L-аргинин, ммоль/г ткани	$0,101 \pm 0,013$, (n = 13)	$0,171 \pm 0,022^*$, (n = 12)
Нитрит-анионы, ммоль/г ткани	$0,038 \pm 0,01$, (n = 12)	$0,088 \pm 0,02^*$, (n = 12)
Нитрат-анионы, ммоль/г ткани	$0,206 \pm 0,009$, (n = 12)	$0,286 \pm 0,025^{**}$, (n = 12)

Примечание. Достоверность различий с показателями контрольной группы: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Синтез NO в присутствии кислорода



Синтез NO в отсутствие кислорода

Рис. NO-синтазная и нитритредуктазная ($NO_2^- - R$) компоненты цикла оксида азота (по В. П. Реутову)

P-450. В составе нитритредуктазных систем содержатся пиридиннуклеотиды, флавопротеиды и цитохромы, а также низкомолекулярные соединения, в частности восстановленный глутатион, входящие в состав митохондриальных мембран. Ферменты дыхательной цепи митохондрий могут принимать участие в восстановлении ионов NO_2^- в NO^- [11]. Усиленное образование его в ранний период ишемического повреждения препятствует запуску апоптотических процессов программируемой гибели нейронов и отражает попытку нервных клеток использовать NO в качестве протектора против нарушения кровоснабжения. Однако акцептирование электронов ионами NO_2^- с электронно-транспортной цепи, особенно в условиях гипоксии, может усугублять нарушение окислительных энергетических процессов, превращая компенсаторный механизм в патологический.

Механизм цикла окиси азота обеспечивает не только эффективную выработку NO, но и достаточно быстрое выведение высокореакционноспособных свободно-радикальных соединений путем превращения в менее активные вещества, например, ионы NO_2^- и NO_3^- , что мы выявили в нашем эксперименте. Благодаря наличию циклической связи между отдельными метаболитами, при циклизации метаболитических путей повышение концентрации продуктов, способных к регенерации, увеличивает скорость их превращения в цикл и не оказывает токсического действия на клетки вследствие накопления.

С этой точки зрения гиперпродукцию NO можно рассматривать как компенсаторно-приспособительную реакцию в условиях гипоксии при нарушении маточно-плацентарного кровообращения, направленную на усиление кровотока в ткани мозга с ишемией, поскольку NO является мощным вазодилататором. Однако цитопротективный эффект NO с нарастанием его концентрации в тканях сменяется цитотоксическим эффектом. Это связано с рядом причин.

Во-первых, происходит активация более «сильной» нитритредуктазной компоненты цикла оки-

си азота, с акцептированием электронов с дыхательной цепи и окислением восстановленного глутатиона, что в условиях ишемии/гипоксии может быть одной из составляющих ишемического повреждения нейронов в период реоксигенации.

Во-вторых, интенсивная гиперпродукция оксида азота в совокупности с пониженной активностью супероксиддисмутазы в мозге может привести к взаимодействию NO^- с O_2^- и образованию другой высокоактивной молекулы – пероксинитрита (ONOO^-) [1, 12, 13]. Оба радикала могут вызвать зависимые от концентраций процессы апоптоза и/или некроза. Образующийся пероксинитрит способен ингибировать белки митохондриальной дыхательной цепи [5], включая НАДН-убихинонредуктазу, сукцинатубихинонредуктазу, фермент цикла трикарбоновых кислот аконитазу, что вызывает снижение продукции АТФ и нарушение кальциевого гомеостаза [6]. OONO^- модифицирует и разрывает цепи ДНК, одновременно ингибируя ДНК-лигазу, вследствие чего происходит еще большее повреждение ДНК [3, 4, 9]. Наконец, одной из важных реакций является диссоциация этого аниона с образованием гидроксильного радикала, мощного активатора процессов пероксидации.

В-третьих, NO, как и АФК, способен мобилизовать железо из ферритина [1], что может стимулировать продукцию активных форм кислорода.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в головном мозге плодов и новорожденных при экспериментальном нарушении маточно-плацентарного кровообращения активируется нитритредуктазная составляющая цикла окиси азота, что, очевидно, носит компенсаторно-приспособительный характер. Полученные данные важны для обоснования коррекции цитотоксического эффекта гиперпродукции NO, поскольку использование ингибиторов NO-синтазы при данной патологии нецелесообразно, т. к. последние и так находятся при гипоксии в неактивном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Успехи физиологических наук. – 2003. – Т. 34, № 3. – С. 21–34.
2. Вартанова М. М. Патогенез и профилактика синдрома отставания в развитии плода при плацентарной недостаточности и его отдаленные последствия : дис. ... д-ра мед. наук. – Л., 1984.
3. Гуревич К. Г., Шимановский Н. Л. Оксид азота: биосинтез, механизмы действия, функции // Вопр. биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2000. – № 4. – С. 16–21.
4. Зенков Н. К., Меньшикова Е. Б., Реутов В. П. NO-синтаза в норме и при патологии различного генеза // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С. 30–34.
5. Малышев И. Ю., Манухина Е. Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 7. – С. 992–1006.

6. Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К., Реутов В. П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 485–490.
7. Охотин В. Е., Калиниченко С. Г., Дудина Ю. В. NO-ергическая трансмиссия и NO как объемный нейротрансмиттер. Влияние NO на механизмы синаптической пластичности и эпилептогенез // Успехи физиологических наук. – 2002. – Т. 33, № 2. – С. 41–55.
8. Роль оксида азота в механизмах формирования рефлекторных вазомоторных реакций / А. А. Мойбенко [и др.] // Успехи физиологических наук. – 2005. – Т. 36, № 4. – С. 3–12.
9. Смирнов В. В., Горбунов Г. Е. Роль оксида азота в физиологии и патологии органов и систем // Педиатрия. – 2010. – Т. 89, № 6, прилож. 1. – С. 182–188.
10. Способ определения содержания нитрит-ионов как конечного метаболита оксида азота II / Р. Дж. Фланаган [и др.] ; Всемирная организация здравоохранения // Основы аналитической токсикологии. – Женева, 1997.
11. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / В. П. Реутов [и др.]. – М. : Наука, 1997.
12. Antoniades C., Tousoulis D., Stefanadis C. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on oxidative stress, inflammatory status and coronary atherosclerosis: an example of a transient phenotype // J. Am. Coll. Cardiol. – 2007. – Vol. 49, № 11. – P. 1226–1235.
13. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons // Physiological Reviews. – 1999. – Vol. 79, № 4. – P. 1431–1568.

Поступила 30.03.11