

УДК 619:612(018):542.951.8

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ОКСИДА АЗОТА В ОРГАНИЗМЕ КРЫС

Каримова Р.Г., Билалов И.Н., Гарипов Т.В.

*ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины
имени Н.Э. Баумана» Казань, e-mail: ilfat_bilalov@mail.ru*

Изучена интенсивность образования оксида азота в организме белых крыс под влиянием L-аргинина – субстрата NO-синтазы, 4-хлор-6,7-фуросанобензофуразана (хлофузана) – экзогенного донора оксида азота и электромагнитного излучения крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ). Об уровне содержания оксида азота в крови судили по суммарной концентрации нитрат- и нитрит-анионов (NO_x) в плазме крови. В результате проведенных экспериментов было установлено, что физиологические эффекты L-аргинина, хлофузана и ЭМИ КВЧ зависят от пола животного. Физиологический эффект электромагнитного излучения крайне высоких частот на систему оксида азота более длительный по сравнению с донорами NO. Стимуляция образования NO за счет L-аргинина, хлофузана и ЭМИ КВЧ более выражена у самок по сравнению с таковой у самцов.

Ключевые слова: электромагнитное излучение крайне высоких частот, оксид азота, нитрит- и нитрат-анионы, почки, крысы

ACTIVIZATION OF NITRIC OXIDE FORMATION IN THE RATS ORGANISM BY DIFFERENT FACTORS

Karimova R.G., Bilalov I.N., Garipov T.V.

Kazan State Academy of Veterinary Medicine N.E. Bauman, Kazan, e-mail: ilfat_bilalov@mail.ru

Studied the rate of formation of nitric oxide in the body of white rats under the influence of L-arginine – NO-synthase substrate, 4-chlor-6, 7-furoksanobenzofurazan (hlofuzan) – exogenous nitric oxide donor and electromagnetic radiation of extremely high frequency (EHF EMR). On the levels of nitric oxide in the blood to be judged by the total concentration of nitrate and nitrite anions (NO_x) in the blood plasma. As a result of experiments conducted it was established that the physiological effects of L-arginine and chlofuzan, EHF EMR on the sex of the animal. Physiological effect of electromagnetic radiation of the highest frequencies on nitroxidergic system is longer comparison with donors of NO. Stimulation of NO formation at the expense of L-arginine, chlofuzan and EMR OHF is more expressed at females comparison with that at males.

Keywords: electromagnetic radiation of the highest frequencies, nitric oxide, nitrite and nitrate anions, kidney, rat

С момента раскрытия физиологической роли оксида азота как вторичного мессенджера остаётся актуальным вопрос выявления новых способов стимуляции его образования в организме. На данный момент не существуют доноры, которых можно было бы назвать идеальными для исследований, так как NO-доноры различаются по эффективности высвобождения NO и в разной степени способны влиять на клетки, также они могут являться источниками побочных токсичных соединений. Для повышения активности системы оксида азота в организме применяют различные эндогенные доноры NO-синтаз как L-аргинин и ряд соединений, которые являются экзогенными донорами оксида азота [5]. Одним из классов гетероциклических соединений, производные которого проявляют NO-донорские свойства, являются фуросаны [2]. Эти соединения представляют большую ценность тем, что в организме происходит их медленная трансформация, что позволяет избежать развития нитратной толерантности. При этом остаётся актуальным изучение нитроксидергической реакции целостного

организма на поступление экзогенных доноров оксида азота. Выявление физиологических эффектов соединений фуросанового ряда на различные системы организма позволит дать комплексное представление о роли оксида азота без учета влияния активности ферментов (NO-синтаз), а также раскроет пути дальнейшего исследования их в роли корректоров состояния нитроксидергической системы, послужит основой для создания новых биологически активных средств [5].

Кроме того, известно, что ЭМИ КВЧ повышает интенсивность Ca^{2+} -зависимого конституционного синтеза NO [9]. ЭМИ КВЧ достаточно широко вошли в медицинскую практику и показали свою эффективность в лечении широкого ряда заболеваний, оказывая нормализующее (восстанавливающее) действие на основные механизмы развития общепатологических процессов, лежащих в основе любых заболеваний. Этот аспект их применения получил название КВЧ терапия, которая в частности применяется в комплексном лечении заболеваний сердечно-сосудистой

системы – острого инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии, также ЭМИ КВЧ оказывает противовоспалительное действие, которое выражается в уменьшении экссудации и гиперемии очага воспаления, снижает фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови [1, 6]. Преимуществом такого воздействия является высокая эффективность, неинвазивность, практическое отсутствие побочных реакций и противопоказаний к применению.

Исходя из этого, целью настоящего исследования явилось изучение интенсивности образования оксида азота в организме белых крыс под влиянием различных факторов.

Для достижения поставленной цели были обозначены следующие задачи:

1. Изучение влияния на NO-систему L-аргинина – субстрата NO-синтазы.

2. Изучение влияния на NO-систему хлофузана – экзогенного донора оксида азота.

3. Изучение влияния на NO-систему ЭМИ КВЧ.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 120 белых беспородных крысах обоего пола массой тела 230–260 г, разделенных на 24 группы. Для повышения активности системы NO вводили L-аргинин, субстрат NO-синтазы, в дозах: 20, 100, 200, 500, 1000 мг/кг внутривенно в виде 10% водного раствора, а также 4-хлор-6,7-фуросанобензофуразан (хлофузан) – экзогенный донор NO в дозах: 1 и 2 мг/кг внутривенно в виде 0,1% суспензии. Забор крови из хвостовой вены производили через 2 часа после введения исследуемых веществ.

Для изучения действия ЭМИ КВЧ на активность NO-системы внутривенно вводили физиологический раствор 3 мл, подвергнутый воздействию электромагнитного излучения крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ) аппаратом «Аист» в режиме непрерывного сеанса в течение 30 минут прямоугольным волноводом на расстоянии 10 см от источника излучения. Контролем служила группа крыс, получавшая 3 мл воды внутривенно, и крысы, которым внутривенно вводили необлученный физиологический раствор, две группы состояли из интактных животных. Об уровне содержания оксида азота в крови судили по суммарной концентрации нитрат- и нитрит-анионов (NO_x) в плазме крови, которую определяли путём восстановления нитратов до нитритов однократной навеской цинковой пыли, обработанной аммиачным комплексом сульфата меди, с последующим фотометрическим определением нитритов с помощью реактива Грисса при длине волны 520,0 нм на КФК – 3 – 01 [8].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведённых экспериментов было установлено, что физиологические эффекты L-аргинина, хлофузана и ЭМИ КВЧ зависят от пола животного (табл. 1–2).

В физиологических условиях синтез NO из L-аргинина происходит с помощью

ферментов NO-синтаз. Это единственный известный на данный момент фермент, использующий в этом процессе одновременно 5 кофакторов/простетических групп (флавинадениндинуклеотид, флавиномононуклеотид, гем, тетрагидробиоптерин и кальций/кальмодулин), являясь таким образом одним из наиболее регулируемых в природе ферментов [10]. Оксид азота катализирует образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который и обуславливает большинство физиологических эффектов NO. Однако на сегодня известны и другие физиологические эффекты NO, независимые от активации гуанилатциклазы или даже NO-синтаз, включая посттрансляционную модификацию белков, липидов и других биомолекул. Другими возможными мишенями для NO являются растворимый аденозиндифосфат (АДФ)-рибозилирующий фермент и факторы транскрипции, через которые NO может непосредственно влиять на транскрипцию генов и трансляцию иРНК [7, 10].

Установлено, что активация системы оксида азота при введении эндогенного донора оксида азота зависит от дозы вводимого соединения и пола животного. При введении L-аргинина в дозе 20 мг/кг в организме самцов белых крыс наблюдается повышение содержания метаболитов оксида азота в плазме крови в 1,35 раза относительно интактной группы ($p < 0,001$), аналогичная тенденция была отмечена у самок. При нагрузке L-аргинином (100 мг/кг) содержание нитрат- и нитрит-анионов в плазме крови самок увеличивается в 1,49 раза ($p < 0,03$), у самцов – в 1,64 раза ($p < 0,05$) относительно интактной группы; на нагрузку в дозе 200 мг/кг организм самок реагирует достоверным увеличением концентрации стабильных метаболитов оксида азота в 3,16 раза ($p < 0,01$). Из этого следует вывод о более высокой лабильности системы NO у самок по сравнению с самцами (повышение в 1,99 раза ($p < 0,001$)).

У самок при введении L-аргинина в дозе 500 мг/кг прослеживается тенденция к увеличению данного показателя относительно интактной группы, у самцов – к снижению (в 1,18 и 1,20 раза соответственно).

На нагрузку L-аргинином в дозе 1000 мг/кг организм самок реагирует снижением NO_x в плазме крови в 1,33 раза ($p < 0,001$), у самцов, напротив, наблюдается увеличение в 1,77 раза ($p < 0,001$) относительно интактной группы.

Таким образом, малые дозы эндогенного донора L-аргинина (20 мг/кг) способствуют повышению образования оксида азота в организме, что проявляется повы-

пением метаболитов оксида азота нитрат- и нитрит-анионов в плазме крови, а высокие дозы (1000 мг/кг) оказывают обратный эффект. Для выявленных эффектов характерна половая специфичность. Снижение концентрации нитратов и нитритов может происходить из-за увеличения асимметричного или симметричного диметиларгинина, являющихся эндогенными ингибиторами ферментов NO-синтаз. Имеется связь между концентрацией АДМА в плазме крови и уровнем общей продукции NO. Следовательно, образование NO снижается или за счет конкурентной блокады NO-синтазы асимметричным диметиларгинином, или за счет ограничения транспорта L-аргинина как субстрата NO-синтазы в клетку симметричным диметиларгинином [3].

Нагрузка организма крыс 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразаном (хлофузаном) сопровождалась дозозависимым изменением функциональной активности системы оксида азота.

При введении хлофузана в дозе 1 мг/кг содержание нитрат и нитрит-анионов в плаз-

ме крови повышается у самок в 1,59 раза ($56,57 \pm 3,77$ мкмоль/л ($p < 0,01$)), у самцов – в 2,03 раза ($65,26 \pm 3,41$ мкмоль/л ($p < 0,001$)) относительно интактной группы. Увеличение дозы хлофузана до 2 мг/кг сопровождалось повышением концентрации метаболитов оксида азота в плазме крови самок в 1,98 раза ($70,57 \pm 4,36$ мкмоль/л против $35,57 \pm 2,58$ мкмоль/л, $p < 0,001$), что не наблюдается у самцов по сравнению с интактной группой.

Таким образом экзогенный донор оксида азота хлофузан способствует повышению концентрации нитратов и нитритов в плазме крови, а, следовательно, и образованию оксида азота в организме, без участия ферментов NO-синтаз. На сегодняшний день известно, что фуроксаны генерируют NO при реакции с внутриклеточными тиолами [11, 12] или другими нуклеофилами. Первым этапом деградации фуроксанов является атака тиолят-анионом по положениям 3 и (или) 4, приводящая к дезароматизации цикла, что обеспечивает возможность его раскрытия с последующим высвобождением оксида азота [4].

Таблица 1

Содержание метаболитов NO в плазме крови крыс после введения доноров оксида азота ($n = 5$)

Доза, мг/кг		Содержание метаболитов NO в плазме крови, мкмоль/л	
		самок	самцов
L-аргинин	20	$43,78 \pm 5,64$	$43,54 \pm 2,91^2$
	100	$53,19 \pm 4,36^2$	$52,95 \pm 6,95^2$
	200	$112,33 \pm 3,70^{1,2}$	$64,29 \pm 5,91^{1,2}$
	500	$42,09 \pm 2,07$	$26,88 \pm 2,53^1$
	1000	$25,19 \pm 0,51^{1,2}$	$57,29 \pm 3,31^{1,2}$
хлофузан	1	$56,57 \pm 3,77^{1,2}$	$65,26 \pm 3,41^{1,2}$
	2	$70,57 \pm 4,36^{1,2}$	$32,43 \pm 3,31$
контроль	$39,92 \pm 6,82$	$46,68 \pm 2,58^2$	
интактные	$35,57 \pm 2,58$	$32,19 \pm 2,53$	

Примечания:

¹ – достоверно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$);

² – достоверно по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$).

Таблица 2

Содержание метаболитов NO в плазме крови крыс после введения облученного физиологического раствора ($n = 5$)

Группа животных		Содержание метаболитов NO в плазме крови, мкмоль/л		
		до введения	через час	через 24 часа
Самки	необлученный раствор	$36,3 \pm 0,78$	$80,7 \pm 2,63^*$	$82,4 \pm 1,36^*$
	облученный раствор	$37,0 \pm 0,53$	$60,2 \pm 1,77^*$	$81,2 \pm 4,40^*$
Самцы	необлученный раствор	$30,6 \pm 1,10$	$65,9 \pm 1,16^*$	$69,8 \pm 2,36^*$
	облученный раствор	$31,9 \pm 0,84$	$79,7 \pm 2,78^*$	$45,5 \pm 1,04^*$

Примечание. * – достоверно по сравнению с интактной группой ($p < 0,001$).

Хлофузан является хлорзамещенным бензофуороксаном, содержит только одну фуороксановую группу и не содержит нитрогруппы в молекуле. Однако активация нитроксидергической системы происходит и зависит от дозы исследуемого соединения и пола крыс. Высокие дозы хлофузана не вызывали повышения нитрат- и нитрит-анионов в плазме крови у крыс самцов – аналогично высоким дозам L-аргинина. Это говорит о том, что активность нитроксидергической системы саморегулируется и фактором регуляции служит NO. Повышение концентрации оксида азота снижает активность NO-синтаз предположительно за счет синтеза конкурентного ингибитора – АДМА. Этот факт дает возможность использовать доноры оксида азота в зависимости от пола животных при коррекции системы оксида азота в различных патологических процессах.

В большом количестве исследований биологических эффектов ЭМИ КВЧ обнаружено, что водосодержащие среды обладают своего рода памятью («water memory»), когда молекулы подобных сред «запоминают» факт воздействия на них этого электромагнитного излучения т.е. аккумулируют энергию излучения, и затем могут переизлучать ее в течение длительного времени [2]. Предположительно это связано с возбуждением долгоживущих метастабильных состояний в водородных связях, участвующих в формировании кластерных и клатратных образований, способствующих активации системы оксида азота.

При введении облученного физиологического раствора у белых крыс наблюдается увеличение содержания нитрат- и нитрит-анионов в крови через час в 1,63 и 2,49 раза у самок и самцов соответственно ($p < 0,001$).

Отмеченный эффект сохранялся и через 24 часа после введения физиологического раствора. Повышение концентрации метаболитов NO составило у самок – в 2,19 раза, у самцов – в 1,42 раза по сравнению с крысами интактной группы ($p < 0,001$).

Введение индифферентного вещества, не облученного физиологического раствора, также сопровождается увеличением содержания нитрат- и нитрит-анионов в крови. Механизм действия данного явления требует дальнейших исследований.

Заклучение

1. Установлена половая специфичность эффектов доноров оксида азота.

2. Стимуляция образования NO за счет L-аргинина, 4-хлор-6,7-фуороксанобен-

зофуорозана и ЭМИ КВЧ более выражена у самок, по сравнению с таковой у самцов.

3. Физиологический эффект ЭМИ КВЧ на систему оксида азота более длительный по сравнению с донорами NO.

Список литературы

1. Бочкарева А.Г. Влияние болевого стресса и КВЧ-поля на морфофункциональное состояние селезенки крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саранск, 2002. – С. 15.

2. Гапочка Л.Д., Гапочка М.Г., Королев А.Ф., Рошин А.В., Сухоруков А.П. и др. Механизмы функционирования водных биосенсоров электромагнитного излучения // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2000. – № 3. – С. 48–55.

3. Гишинский М.А., Брусенцев Е.Ю. Эндогенная регуляция биодоступности оксида азота. Клинические корреляты и подходы к анализу // Бюллетень Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук: научно-теоретический журнал. – 2007. – № 3. – С. 109–115.

4. Граник В.Г. Кислород- и серосодержащие гетероциклические соединения – доноры оксида азота и ингибиторы NO-синтаз // Химия и биологическая активность синтетических и природных соединений «Кислород- и серосодержащие гетероциклы», Т 1 / под ред. д-ра хим. наук В.Г. Карцева. – М.: IBS PRESS. – 2003. – С. 30–43.

5. Каримова Р.Г., Гарипов Т.В. Полезный приспособительный эффект нитроксидергической системы // Известия Самарской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1. – С. 42–46.

6. Каримова Р.Г., Тохирова Р.З., Гарипов Т.В., Морозов Г.А. Бактериостатическая активность электромагнитного излучения крайне высоких частот // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – № 215. – С. 169–173.

7. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул // Успехи физиологических наук – 1996 – Т. 27, – № 4, – С. 30–44.

8. Солодков А.П., Веремей И.С. Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях // Витебский государственный медицинский университет. – 2001.

9. Чуян Е.Н., Раваева М.Ю., Трибрат Н.С. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на функциональную активность микрососудистого эндотелия // Таврический медико-биологический вестник. – 2012 – Т. 15, № 1 (57). – С. 348–350.

10. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development // Frontiers in Bioscience. – 2009. – Vol. 14. – P. 1–18.

11. Feelisch M., Schonafinger K., Noack E. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. *Biochem Pharmacol.* – 1992. – Vol. 44. – P. 1149–1157.

12. Medana C., Ermondi G., Fruttero R., Di Stilo A., Ferretti C., Gasco A. Furoxans as Nitric Oxide Donors. 4Phenyl3-furoxancarbonitrile: Thiol-Mediated Nitric Oxide Release and Biological Evaluation // *Journal of Medicinal Chemistry* – 1994. – Vol. 37. – P. 4412–4416.

References

1. Bockkareva A.G. Vlijanie boleвого stressa i KVCh-polja na morfofunkcional'noe sostojanie selezenki kryc: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Saransk, 2002. pp. 15.

2. Gapochka L.D., Gapochka M.G., Korolev A.F., Roshhin A.V., Suhorukov A.P. i dr. Mehanizmy funkcionirovaniya vodnyh biosensovov jelektromagnitnogo izlucheniya // Biomeditsinskaja radiojelektronika. 2000. no. 3. pp. 48–55.
3. Gilinskij M.A., Brusencev E.Ju. Jendogennaja reguljacija biodostupnosti oksida azota. Klinicheskie korreljaty i podhody k analizu // Bjulleten' Sibirskogo otdelenija Rossijskoj Akademii medicinskih nauk: nauchno-teoreticheskij zhurnal. 2007. no. 3. pp. 109–115.
4. Granik V.G. Kislород- i serusoderzhashhie geterociklicheskie soedinenija donory oksida azota i inhibitory NO-sintaz // Himija i biologicheskaja aktivnost' sinteticheskij i prirodnyh soedinenij «Kislород- i serusoderzhashhie geterocikly», T 1 / pod red. d-ra him. nauk V.G. Karceva. M.: IBS PRESS. 2003. pp. 30–43.
5. Karimova R.G., Garipov T.V. Poleznyj pri-sposobitel'nyj jeffekt nitroksidergicheskoy sistemy // Izvestija Samarskoj sel'skohozjajstvennoj akademii. 2011. no. 1. pp. 42–46.
6. Karimova R.G., Tohirova R.Z., Garipov T.V., Morozov G.A. Bakteriostaticeskaja aktivnost' jelektromagnitnogo izlucheniya krajne vysokih chastot // Uchenye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny im. N.Je. Bau-mana. 2013. no. 215. pp. 169–173.
7. Markov H.M. Okis' azota i okis' ugleroda novyj klass signal'nyh molekul // Uspehi fiziologicheskijh nauk 1996 T. 27, no. 4, pp. 30–44.
8. Solodkov A.P. Veremej I.S. Fotometricheskij metod opredelenija nitratov i nitritov v biologicheskijh zhidkostjah // Vitebskij gosudarstvennyj medicinskij universitet. 2001.
9. Chujan E.N., Ravaeva M.Ju., Tribat N.S. Vlijanie jelektromagnitnogo izlucheniya millimetrovogo diapazona na funkcional'nuju aktivnost' mikrososudistogo jendotelija // Tavricheskij mediko-biologicheskij vestnik. 2012 T. 15, no. 1 (57). pp. 348–350.
10. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. Frontiers in Bioscience. 2009. Vol. 14. pp. 1–18.
11. Feelisch M, Schonafinger K, Noack E. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. Biochem Pharmacol. 1992; Vol 44. pp. 1149–1157.
12. Medana C., Ermondi G., Fruttero R., Di Stilo A., Ferretti C., Gasco A. Furoxans as Nitric Oxide Donors. 4Phenyl3-furoxancarbonitrile: Thiol-Mediated Nitric Oxide Release and Biological Evaluation. Journal of Medicinal Chemistry 1994, Vol. 37, pp. 4412–4416.

Рецензенты:

Гильмутдинов Р.Я., д.б.н., профессор кафедры физиологии и патофизиологии, ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» г. Казань;

Шакиров Ш.К., д.с.-х.н., профессор, руководитель НТЦ животноводства ГНУ Татарский Россельхозакадемии, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 28.01.2015