

И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Н.В. Садикова

Волгоградский государственный медицинский университет, Российская Федерация

Изменение ино- и хронотропных резервов сердца стрессированных животных в условиях блокады различных NO-синтаз

Цель исследования: изучить влияние длительного иммобилизационно-болевого стресса на ино- и хронотропные резервы сердца при ингибировании различных NO-синтаз. **Материалы и методы:** исследование проводилось на 30 белых беспородных крысах-самках. В качестве блокаторов NO-системы использовали аминогуанидин (50 мг/кг); 7-нитроиндазол (50 мг/кг) и N-нитро-L-аргинин-метилловый эфир (L-NAME) (10 мг/кг). Стресс моделировали подвешиванием крыс за дорсальную кожную складку на 24 ч. Изучение функциональных резервов сердца осуществляли с использованием пробы на адренореактивность и пробы изометрической нагрузки. **Результаты:** установлено, что иммобилизационно-болевого стресс приводит к снижению ино- и хронотропных резервов сердца, что выражается в уменьшении прироста $dp/dt+$, $dp/dt-$, левожелудочкового давления и частоты сердечных сокращений по сравнению с контрольной группой интактных животных при проведении нагрузочных проб. Селективная блокада nNOS 7-нитроиндазолом вызывает еще большее снижение ино- и хронотропных резервов сердца у стрессированных животных в условиях нагрузочных проб. Наиболее выраженное угнетение инотропной функции сердца стрессированных животных наблюдается при неселективном ингибировании NO-синтаз L-NAME. Введение животным аминогуанидина — блокатора индуцибельной NOS до и после стрессирования вызывает увеличение инотропных резервов сердца, что выражается в повышении прироста скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД и ЧСС при проведении нагрузочных проб. **Выводы:** NO-эргическая система играет существенную роль в ограничении негативного влияния стресса на сократимость.

Ключевые слова: блокаторы NO-синтаз, иммобилизационно-болевого стресс, ино- и хронотропные резервы сердца. (Вестник РАМН. 2014; 1–2: 46–50)

46

Введение

Длительное и интенсивное стрессорное воздействие вызывает депрессию сократительной функции и снижение ино- и хронотропных резервов сердца [1–4]. Существующие в организме стресслимитирующие системы ограничивают стресс-реакцию, значительная роль в этом принадлежит NO-эргической системе [5, 6]. Об этом свидетельствуют литературные данные, которые показывают, что гипоталамус и гипофиз, составляющие центральный отдел стресс-системы, иннервируются NO-эргическими

нейронами, и NO модулирует высвобождение в них кортикотропин-рилизинг-гормона и вазопрессина [7]. На периферии NO-нейроны, контактируя с хромаффинными клетками надпочечников, синтезирующими катехоламины, и угнетая их выделение, ограничивают активацию симпатoadренальной системы [8]. Монооксид азота повышает активность антиоксидантных ферментов и экспрессию кодирующих их генов в условиях окислительного стресса, что может способствовать уменьшению стрессорной активации свободно-радикального окисления и повреждения клеток [9].

I.N. Tyurenkov, V.N. Perfilova, N.V. Sadikova

Volgograd State Medical University, Russian Federation

Change of Cardiac Ino- and Chronotropic Functions in Stressed Animals with Blockade of Different NO-Synthases

Aim: to investigate the effect of long-term immobilization-painful stress on ino- and chronotropic functions of the heart with inhibition of various NO-synthases. **Materials and methods:** 30 female albino rats were taken. Blockers of NO-system were: aminoguanidine (50 mg/kg), 7-Nitroindazole (50 mg/kg) and NG-nitro-L-arginine methyl ester (10 mg/kg). Stress was modeled by suspending the animals for cervical dorsal skin fold for 24 hours. The functional reserves of the heart were studied using adrenoactivity and isometric load tests. **Results:** experiments showed that immobilization-painful stress leads to a decrease of cardiac ino- and chronotropic functions which is observed in the reduction of increment $dp/dt+$, $dp/dt-$, LVP and HR during load tests in comparison to control group of intact animals. Selective blockade of nNOS with 7-Nitroindazole causes even greater decrease an increment indices of myocardial contractility and LVP in stressed animals during load tests. The most pronounced inhibition of inotropic function of the stressed animal's heart observed in the non-selective inhibition of NO-synthases by L-NAME. Administration of aminoguanidine to animals (inducible NOS blocker) before and after stress causes an increase of inotropic reserve of the heart, resulting in increased increment of myocardial contractility and relaxation findings, left ventricular pressure and heart rate during load tests. **Conclusions:** NO-ergic system plays a significant role in limiting of the negative stress effects on the contractile function of the heart.

Key words: blockers of NO-synthases, immobilization-painful stress, cardiac ino- and chronotropic functions.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 1–2: 46–50)

В кардиомиоцитах оксид азота синтезируется при участии трех NO-синтаз (NOS): конститутивных — нейрональной и эндотелиальной (nNOS и eNOS), и индуцибельной (iNOS) [10–12]. Конститутивные NOS вырабатывают базальный и стимулируемый уровень монооксида азота, который оказывает положительный инотропный эффект; под его влиянием укорачивается период сокращения и расслабления миокарда, увеличивается его растяжимость в диастоле [13]. Индуцибельная NOS экспрессируется при различных патологических процессах в кардиомиоцитах и лейкоцитах. Лейкоцитарная iNOS продуцирует избыточное количество NO, что приводит к образованию пероксинитрита и повреждению клеток сердца. Монооксид азота, вырабатываемый iNOS кардиомиоцитов, оказывает защитное действие, положительно влияет на сократимость и инотропные резервы сердца при ишемии и реперфузии [14–17].

Таким образом, кардиопротективные и кардиодепрессивные эффекты монооксида азота зависят от его концентрации, места продукции и функционального состояния организма [17, 18].

Цель исследования: изучить влияние длительного иммобилизационно-болевого стресса на ино- и хронотропные резервы сердца при ингибировании различных NO-синтаз.

Материалы и методы

Участники исследования

Эксперименты проводили на 30 беспородных крысах-самках массой 250–280 г. Были сформированы следующие группы животных: группа позитивного контроля — интактные животные ($n = 6$); группа негативного контроля — стрессированные животные, которым вводили физиологический раствор (0,1 мл/100 г массы тела животного; $n = 6$), 3 опытные группы — стрессированные животные, получавшие селективный ингибитор индуцибельной NOS амингуанидин в дозе 50 мг/кг ($n = 6$), стрессированные животные, которым вводили селективный блокатор нейрональной NOS 7-нитроиндазол в дозе 50 мг/кг ($n = 6$) и стрессированные животные, получавшие неселективный ингибитор NOS N-нитро-L-аргинин-метиловый эфир (L-NAME) в дозе 10 мг/кг ($n = 22$). Иммобилизационно-болевого стресс моделировали подвешиванием крыс за дорсальную шейную кожную складку на 24 ч. Ингибиторы вводили внутрибрюшинно за 10 мин до и через 10 мин после стрессирования. Изучение функциональных резервов сердца стрессированных животных в условиях блокады NOS осуществляли с использованием пробы на адренореактивность (внутривенное введение адреналина в разведении 10^{-7} г/л в объеме 0,1 мл/100 г массы тела животного) и изометрической нагрузки (окклюзия восходящей части дуги аорты на 30 с) [19].

Методы исследования

Исследование сократимости миокарда проводили через 20 мин после стрессирования. Для этого животных наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг внутрибрюшинно), и после перевода на искусственную вентиляцию легких в четвертом межреберье осуществляли торакотомию, а затем — перикардотомию. Через верхушку сердца в полость левого желудочка вводили катетер и посредством компьютерного гемодинамического анализатора на базе программы BEAT (Россия) регистрировали пока-

затели кардиогемодинамики: максимальную скорость сокращения ($dp/dt+$) (мм рт.ст./с), максимальную скорость расслабления ($dp/dt-$) (мм рт.ст./с), левожелудочковое давление (ЛЖД) (мм рт.ст.), частоту сердечных сокращений (ЧСС) (уд./мин).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов исследования проводили в пакете прикладных программ STATISTICA v. 10 (Statsoft Inc., США) с предварительной проверкой выборок на нормальность распределения. Согласно характеру полученных данных применяли t -критерий Стьюдента. Данные представлены в виде $M \pm SE$, где M — выборочное среднее, SE — стандартная ошибка среднего. Различия средних величин считали значимыми при уровне $p \leq 0,05$.

Результаты

Установлено, что при стимуляции адренорецепторов сердца у интактной группы животных прирост показателей сократимости миокарда ($dp/dt+$ и $dp/dt-$), ЛЖД и ЧСС увеличился по сравнению с исходными значениями на 66,8; 77,7; 68,0 и 94,9%, соответственно. У животных, подвергшихся длительному эмоционально-болевого стрессированию, при введении адреналина прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда ($dp/dt+$ и $dp/dt-$), ЛЖД и ЧСС составил 27,7; 45,4; 36,1 и 41,6%, соответственно, что было достоверно ниже по сравнению с интактной группой на 58,5; 41,6; 46,9 и 56,2%, соответственно (рис. 1, А–Г).

При проведении пробы на адренореактивность в группе животных, получавших ингибитор индуцибельной NOS амингуанидин в дозе 50 мг/кг, прирост скорости сокращения миокарда и ЛЖД составил 32,6 и 53,5%, что было на 17,7 и 48,2% выше показателей животных группы негативного контроля; прирост скорости расслабления миокарда существенно не отличался от такового группы сравнения, а ЧСС составила 17,5% и оказалась ниже на 57,9% (см. рис. 1, А–Г).

Введение селективного блокатора нейрональной NOS 7-нитроиндазола в дозе 50 мг/кг до и после стрессирования животных при проведении пробы на адренореактивность вызвало несущественный прирост $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЛЖД и ЧСС: 21,3, 18,8, 24,6 и 24,1%, соответственно, что было ниже такового контрольной группы стрессированных животных на 23,1, 58,6, 31,8 и 42,1%, соответственно (см. рис. 1, а–г).

Неселективный блокатор NOS L-NAME в дозе 10 мг/кг вызывал еще более выраженное снижение показателей сократимости миокарда в ответ на нагрузку адреналином: прирост $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЛЖД и ЧСС составил 13,5; 17,4; 26,6 и 13,3%, соответственно, что было на 51,3; 61,7; 26,3 и 68,0% ниже прироста контрольной группы стрессированных животных (см. рис. 1, а–г).

При проведении изометрической нагрузки у стрессированных животных прирост показателей сократимости миокарда ($dp/dt+$ и $dp/dt-$), ЛЖД и ЧСС на 5-й секунде пережатия восходящей части аорты составил 44,9; 41,8; 69,2 и 17,5%, соответственно, что было на 26,0; 24,1; 37,3 и 60,9% меньше показателей интактной группы. Через 25 с работы сердца в изометрическом режиме у стрессированных животных прирост $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЛЖД и ЧСС составил 34,4; 30,3; 57,6 и 7,5%, что было ниже значений группы позитивного контроля на 31,9; 29,7; 41,0; 83,4%, соответственно (см. рис. 1, а–г).

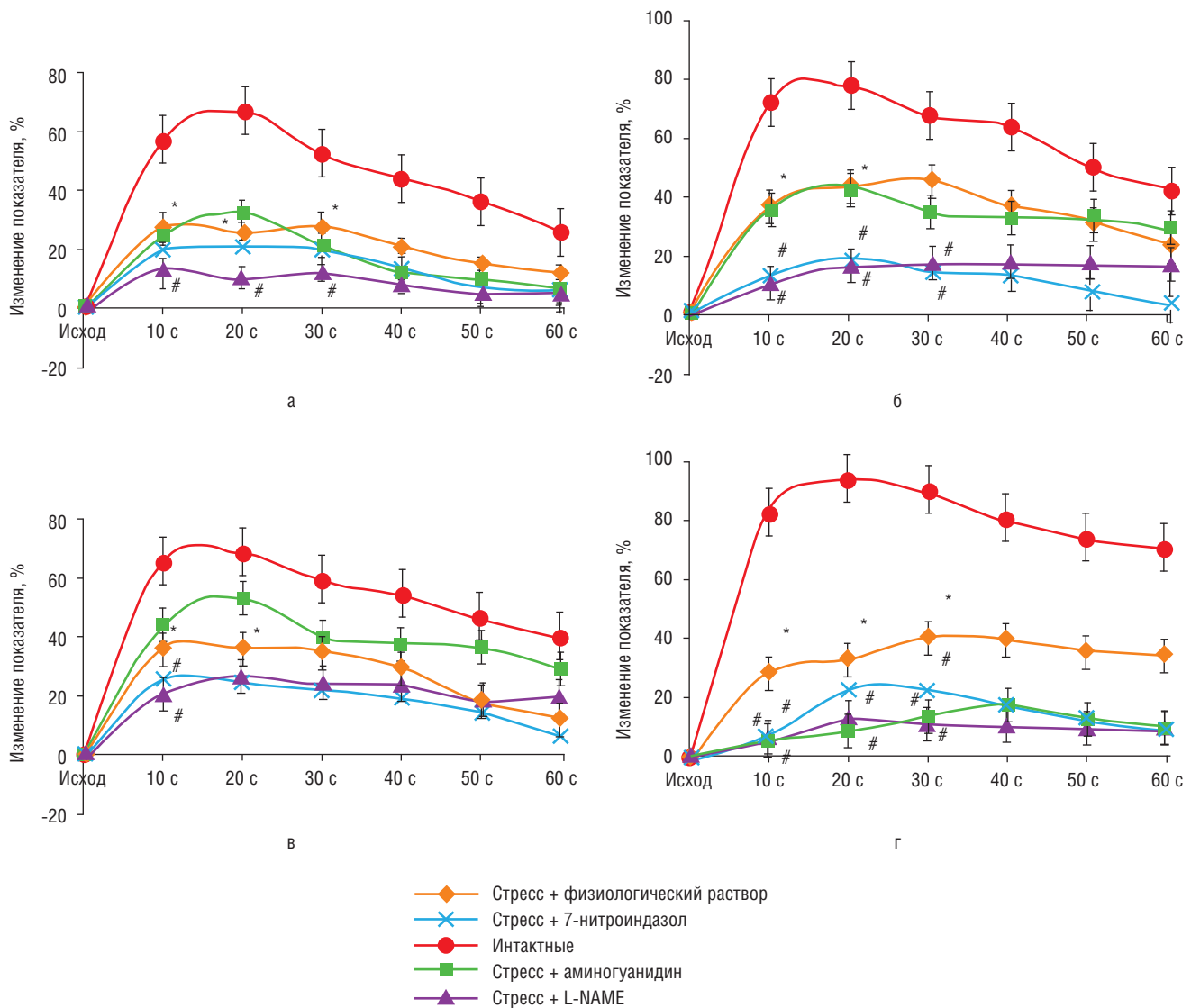


Рис. 1. Изменение скорости сокращения (а), скорости расслабления (б), левожелудочкового давления (в) и частоты сердечных сокращений (г) у стрессированных животных в условиях блокады NO-синтаз по сравнению с группой негативного контроля при проведении пробы на адренореактивность.

Примечание (здесь и на рис. 2). * — данные достоверны относительно интактной группы по *t*-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; # — данные достоверны относительно группы негативного контроля по *t*-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

В группе животных, получавших аминогуанидин, на 5-й секунде пережатия аорты прирост ЛЖД составил 93,2%, что было выше показателя контрольной группы стрессированных животных на 47,9%; прирост скорости сокращения миокарда и ЧСС существенно не различался и составил 46,9 и 16,7%; прирост скорости расслабления миокарда составил 32,2%, что было ниже на 21,4% по сравнению с группой негативного контроля. Через 25 с окклюзии аорты прирост $dp/dt+$ практически не отличался от такового контрольной группы; $dp/dt-$ составил 20,5%, что было ниже показателя контрольной группы на 30,7%; ЛЖД и ЧСС составили 78,1 и 30,6%, что было на 50,8 и 22,4% выше, чем в соответствующей группе контроля (рис. 2, а–г).

У стрессированных животных, получавших 7-нитроиндазол, в условиях изометрической нагрузки на 5-й секунде окклюзии аорты прирост скорости сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД составил 36,9; 29,7 и 61,7%, что было ниже значений контрольной группы

стрессированных животных на 17,8; 28,9 и 11%, соответственно; прирост ЧСС составил 19,3%, что было на 10% выше такового группы сравнения. На 25-й секунде работы сердца в изометрическом режиме прирост скорости сокращения и расслабления миокарда и ЛЖД составил 12,3; 18,1 и 42,8%, соответственно, что было ниже показателей группы негативного контроля на 61,9; 49,4 и 29,5%; прирост ЧСС составил 9,7%, что было на 29,2% выше такового контрольной группы животных (см. рис. 2, а–г).

В группе животных, получавших L-NAME, прирост $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЛЖД и ЧСС на 5-й секунде пережатия аорты составил 20,2; 16,5; 26,0 и 6,9%, соответственно, что было ниже на 54,8; 55,9; 63,6 и 57,9% показателей контрольной группы стрессированных животных. На 25-й секунде окклюзии аорты прирост показателей составил 0,7; -6,2; 18,8 и 0,2%, соответственно, что было ниже таковых группы негативного контроля на 98,6; 114,7; 68,9 и 91% и свидетельствовало о значительном снижении ино-

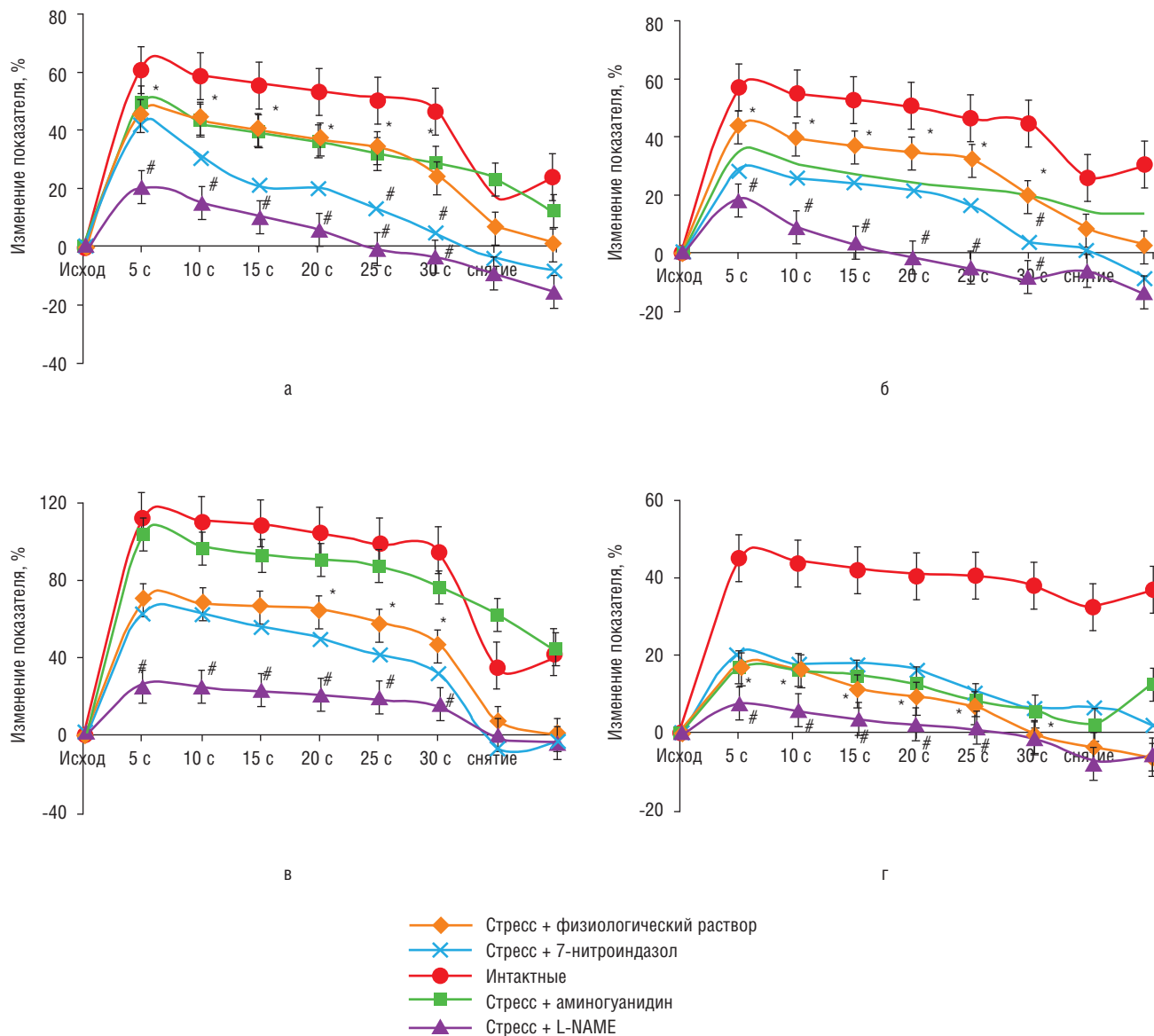


Рис. 2. Изменение скорости сокращения (а), скорости расслабления (б), левожелудочкового давления (в) и частоты сердечных сокращений (г) у стрессированных животных в условиях блокады NO-синтазы по сравнению с группой негативного контроля при максимальной изометрической нагрузке.

и хронотропной функции сердца, обусловленном дефицитом монооксида азота (см. рис. 2, а–г).

Обсуждение

Ранее нами уже было показано, что двадцатичетырехчасовое стрессорное воздействие приводит к снижению ино- и хронотропных резервов сердца у животных, о чем свидетельствует уменьшение прироста скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД и ЧСС по сравнению с интактными животными при проведении пробы на адренореактивность и при максимальной изометрической нагрузке. Ингибирование NOS неселективным блокатором *L*-NAME значительно снижает стрессоустойчивость животных, о чем говорит высокий процент их гибели во время стрессирования, после наркоза, при вскрытии грудной клетки и после проведения нагрузочных проб. Кроме того, введение *L*-NAME вызывает вы-

раженное падение прироста $dp/dt+$, $dp/dt-$, ЛЖД и ЧСС по сравнению с контрольной группой стрессированных животных [4]. По всей вероятности, это связано с существенным снижением активности конститутивных и индуцибельной NOS, глубоким дефицитом монооксида азота, усугублением на этом фоне повреждающего действия стресса на сердце, сопровождающегося значительными функциональными нарушениями.

В данной работе мы поставили цель определить степень участия отдельных (нейрональной и индуцибельной) NOS в стрессорном повреждении сердца. Блокада нейрональной NOS селективным ингибитором 7-нитроиндазолом у стрессированных животных вызывает еще более выраженное снижение инотропных резервов сердца, отмечается меньший прирост показателей сократимости миокарда и ЛЖД относительно контрольной группы стрессированных животных. Очевидно, это связано с тем, что в условиях физиологической нормы нейрональная NOS кардиомиоцитов, локализованная в саркоплазматиче-

ческом ретикулуме, синтезирует NO, который стимулирует циклическое перемещение ионов кальция, регулирует процессы сопряжения возбуждения и сокращения, увеличивает сократимость миокарда [13, 20]. Блокада nNOS и дефицит монооксида азота приводят к нарушению сбалансированности процессов сокращения и расслабления, снижению инотропных резервов сердца.

У стрессированных животных, получавших селективный ингибитор индуцибельной NOS аминогуанидин, пророст показателей сократимости миокарда и ЛЖД при проведении нагрузочных проб в большинстве случаев превосходил таковой у стрессированных животных контрольной группы. По-видимому, это связано с тем, что при стрессорном воздействии активность iNOS возрастает; образующиеся при этом высокие концентрации NO оказывают негативное инотропное влияние. Селективное ингибирование iNOS предупреждает гиперпродукцию монооксида азота, при этом конститутивные NOS обеспечивают его базальные уровни, которые оказывают противоположное стрессорное действие, улучшают сократимость миокарда.

Заключение

Стрессирование животных на фоне селективной блокады nNOS приводит к большему снижению ино- и хронотропных резервов сердца при проведении пробы на адренореактивность и при максимальной изометрической нагрузке по сравнению с контрольной группой стрессированных животных.

Избирательное ингибирование индуцибельной NOS значительно уменьшает стрессорное повреждение миокарда, что выражается в более высоких показателях у них скорости сокращения и расслабления миокарда и левожелудочкового давления при проведении нагрузочных проб по сравнению с контрольной группой стрессированных животных.

Неселективная блокада всех NO-синтаз при введении L-NAME вызывает значительное снижение стрессоустойчивости животных, выраженное падение ино- и хронотропных резервов сердца по сравнению с группой негативного контроля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалев Г.В., Гурбанов К.Г., Тюренков И.Н., Найденов С.Н. Влияние транквилизаторов на функциональное состояние миокарда при его стрессорном повреждении. *Фармакология и токсикология*. 1983; 46 (3): 41–44.
2. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М. 1984. 269 с.
3. Перфилова В. Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК. *Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Волгоград*. 2009.
4. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Арсенова Н.В. Влияние иммобилизационно-болевого стресса на ино- и хронотропные функции сердца животных в условиях подавления синтеза оксида азота. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2012; 98 (9): 1131–1139.
5. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресслимитирующая система оксида азота. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2000; 10: 1283–1292.
6. Gealekman O., Abassi Z., Rubinstein I., Winaver J., Binah O. Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure. *Circulation*. 2002; 105 (2): 236–243.
7. Мацко М.А. Соотношение некоторых медиаторов стрессреализующих и стресслимитирующих систем в остром периоде ишемического инсульта. *Патол. физиол. и эксп. тер.* 2004; 4: 14–16.
8. Herbert J., Goodyer I.M., Grossman A.B., Hastings M.H., de Cloet E.R., Lightman S.L., Lupien S.J., Roozendaal B., Seck J.R. Do corticosteroids damage the brain? *J. Neuroendocrinol.* 2006; 18: 393–411.
9. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота. *Биохимия*. 1998; 63 (7): 992–1006.
10. Balligand J.L., Cannon P.J. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 1997; 17: 1846–1858.
11. Buchwalow I.B., Schulze W., Karczewski P., Kostic M.M., Wallukat G., Morwinski R., Krause E.G., Muller J., Paul M., Slezak J., Luft F.C., Haller H. Inducible nitric oxide synthase in the myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 2001; 217 (1–2): 73–82.
12. Krenek P., Kmecova J., Kucerova D., Bajuszova Z., Musil P., Gazova A., Ochodnický P., Klimas J., Kyselovic J. Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function. *Eur. J. Heart. Fail.* 2009; 11 (2): 140–146.
13. Парахонский А.П. Роль нейрональной NO-синтазы в патологии сердца. *Фундаментальные исследования*. 2010; 9: 208–209.
14. Парахонский А.П. Кардиопротекторные эффекты индуцируемой NO-синтазы. *Совр. наукоемк. технол.* 2010; 9: 207–208.
15. Cuevas P., Carceller F., Martinez-Coso V., Cuevas B., Fernandez-Ayerdi A., Reimers D., Asin-Cardiel E., Gimenez-Gallego G. Cardio-protection from ischemia by fibroblast growth factor: role of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Med Res.* 1999; 4 (12): 517–524.
16. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001; 33 (11): 1897–1918.
17. Jones S.P., Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2006; 40 (1): 16–23.
18. Muller-Strahl G., Kottenberg K., Zimmer H.G., Noack E., Kojda G. Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J. Physiol.* 2000; 522: 311–320.
19. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Рук-во по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М. 2012. 944 с.
20. Alvarez S., Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37 (9): 1472–1478.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Тюренков Иван Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, заведующий кафедрой фармакологии и биофармации ФУВ ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» МЗ РФ

Адрес: 400001, Волгоград, ул. Пугачевская, д. 3, тел.: (8442) 97-81-80, e-mail: fibfuv@mail.ru

Перфилова Валентина Николаевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» МЗ РФ

Адрес: 400001, Волгоград, ул. Пугачевская, д. 3, тел.: (8442) 97-81-80, e-mail: vnperfilova@mail.ru

Садикова Наталья Владимировна, заочный аспирант кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» МЗ РФ

Адрес: 400001, Волгоград, ул. Пугачевская, д. 3, тел.: (8442) 97-81-80, e-mail: arsyonova.n@mail.ru