

## Продукция оксида азота в тканях крыс 7- и 16-недельного возраста при ограничении подвижности

© Р.И. Зарипова,<sup>1</sup> Г.Г. Яфарова,<sup>1</sup> В.В. Андрианов,<sup>1,2</sup> Х.Л. Гайнутдинов,<sup>1,2</sup> М.И. Сунгатуллина,<sup>1</sup>  
Н.И. Зиятдинова,<sup>1</sup> Т.Л. Зефирова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский федеральный университет,  
420008 Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский физико-технический институт — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН,  
420034 Казань, Россия  
e-mail: ratno1992@mail.ru

Поступило в Редакцию 30 декабря 2021 г.

В окончательной редакции 30 декабря 2021 г.

Принято к публикации 1 марта 2022 г.

Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было проведено исследование интенсивности продукции оксида азота (NO) путем анализа количества NO-содержащих парамагнитных комплексов в тканях сердца, печени и спинного мозга крыс 7- и 16-недельного возраста, растущих в условиях ограничения подвижности. Продукция оксида азота оценивалась по интенсивности сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу диэтилдитиокарбамата (ДЭТК)<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>-NO. Полученные результаты показывают, что рост в условиях ограничения двигательной активности приводит к увеличению продукции NO во всех исследуемых органах, при этом наибольшее увеличение наблюдается у крыс 7-недельного возраста.

**Ключевые слова:** оксид азота, сердце, печень, спинной мозг, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.21883/JTF.2022.07.52657.336-21

### Введение

Двигательная активность — основное свойство животных и человека, неотъемлемая часть жизни и развития каждого организма. Нормальное функционирование организма тысячелетиями развивалось в сочетании с активной двигательной деятельностью. В условиях производственной и городской среды жизнь современного человека предлагает организму совершенно необычную форму жизнедеятельности его органов и систем, которая оказалась далека по уровню двигательной активности и безопасности от необходимых требований, заложенных эволюцией. Автоматизация и компьютеризация труда и быта, пассивный отдых, развитие транспорта и другие условия определяют малоподвижный образ жизни современного человека. В течение жизни нередко под влиянием каких-либо требований внешней среды уровень двигательной активности изменяется в сторону его повышения или понижения. Если человек изменяет образ жизни так, что его двигательная активность по необходимости становится низкой, то его организм должен приспосабливаться к новому состоянию. В этих случаях развивается специфическая адаптация, сводящаяся к структурным и обменным нарушениям функции многих органов и систем организма. Нарастающее ограничение двигательной активности становится серьезной угрозой для здоровья, в том числе увеличивая риск сердечно-сосудистых заболеваний.

Накоплен большой фактический материал по влиянию ограничения двигательной активности на организм человека и животных, однако большая часть этих

данных была получена в рамках решений конкретных задач космической медицины. Ограничение двигательной активности ведет к морфофункциональным сдвигам в основных жизнеобеспечивающих системах: нервной, сердечно-сосудистой, мышечной, эндокринной вплоть до патологических состояний в зависимости от продолжительности и степени ограничения двигательной активности [1–6]. Основным фактором, приводящим к этому процессу, является уменьшение афферентной импульсации, что вызывает снижение тонуса центральной нервной системы, изменение структуры и функции синапсов, трофики мышц [6].

Большой интерес привлекает участие в механизмах развития различных патологических состояний организма свободнорадикального соединения — оксид азота (NO). NO известен как один из важнейших сигнальных молекул, регулирующих физиологические функции организма и метаболизм клеток, он широко распространен в нервной и сердечно-сосудистой системах [7–14]. Избыточное формирование NO может заметно снижать тонус гладкомышечных клеток, ухудшать функцию эндотелия и прямо угнетать сократительную функцию миокарда, что наблюдается при септическом и геморрагическом шоке, остром инфаркте миокарда [14–16]. С одной стороны, NO оказывает токсическое действие, связанное с нарушением митохондриального окислительного фосфорилирования, образованием свободнорадикального соединения пероксинитрит-аниона, которое блокирует ряд нейрональных рецепторов, инактивирует фермент супероксиддисмутазы (СОД) и вызывает углубление свободнорадикального окисления, приводящего к гибели

ли клетки [16–19]. Помимо вазодилатирующих, нейротрансмиттерных и стресслимитирующих свойств, несомненно, участие NO в реакциях оксидантного стресса, глутамат-кальциевого каскада и воспаления [13]. NO выполняет свои физиологические функции, связываясь с ионами железа (Fe) в составе гема, либо через S-нитрозилирование белков, а также принимает участие в целом ряде биохимических реакций [13,20–23]. Механизм токсичности NO включает в себя ковалентную модификацию белков при взаимодействии с их тиоловыми группами, а также непосредственное повреждение ДНК. В то же время есть и противоположная точка зрения, согласно которой избыток NO служит компенсаторным фактором. NO, активируя растворимую гемсодержащую гуанилатциклазу, повышая синтез циклического гуанозинмонофосфата (сGMP), может и защищать нейроны при токсическом воздействии глутамата. Таким образом, проявляется двойственная природа NO, присущая многим природным модуляторам; протективные и поражающие свойства NO, видимо, определяются его внутриклеточной концентрацией [13,21–26]. Считается, что система NO является одним из универсальных факторов регуляции стрессорных и адаптивных ответов организма. Известно, что система NO играет важную роль при адаптации организма к различным изменениям внешней среды и внешних условий, ведущих к стрессу (Манухина, Малышев, 2000; Manukhina, 2006; Ситдииков, Зарипова, Гайнутдинов, 2017). На сегодня доказано, что без нормального клеточного метаболизма NO невозможно поддержание оптимального состояния здоровья человека и протекание процессов адаптации организма к различным факторам среды, в том числе к физическим нагрузкам [25–28].

Таким образом, одной из перспективных мишеней для терапевтических вмешательств при ограничении подвижности выступает система NO. Целью настоящей работы является сравнительный анализ содержания NO в тканях спинного мозга, сердца и печени крыс, растущих в условиях неограниченной и ограниченной подвижности. Ограниченной подвижности добивались помещением животных в специальные клетки-пеналы, начиная с 3 недельного возраста.

## 1. Методы и организация исследования

В литературе описаны различные способы частичной и полной иммобилизации животных. Широкое распространение получило моделирование ограничения двигательной активности при содержании животных в клетках малого объема. Учитывая характеристику повседневного ограничения двигательной активности, основным требованием отвечает модель нарастающего ограничения подвижности с постепенным увеличением времени иммобилизации крыс в клетках-пеналах. Передвигая перегородку, изменяется объем пенала в соответствии с раз-

мерами животного. Первые два дня время ограничения двигательной активности составляет 1 h, а в дальнейшем увеличивается на 2 h через каждые 2 дня. Полученная экспериментальная модель позволила создать одинаковую степень „жесткости“ ограничения подвижности для всех животных, что является необходимым условием для получения сопоставимых результатов. Данная модель характеризуется отсутствием дополнительных повреждающих факторов и простотой технического осуществления и дает возможность расценивать наблюдаемые изменения как результат адаптации организма к собственно снижению двигательной активности. Следует отметить, что использованный режим ограничения подвижности не является жестким и, несомненно, уменьшает стрессорную реакцию. Животных каждый день выпускали, и они имели возможность компенсировать вынужденную гипокинезию.

Исследования проведены на лабораторных беспородных крысах, которых разделили на 2 группы: I — контрольная группа, которая содержалась в стандартных условиях вивария; II — опытная группа, которая содержалась при ограничении подвижности. По возрасту животных разделили на 2 группы: крысы 7- и 16-недельного возраста. Крысята росли в условиях ограничения подвижности по достижению ими 3 недельного возраста, поэтому в первой группе продолжительность ограничения подвижности составило 30 суток, во второй 90 суток соответственно. В каждой возрастной группе  $n = 15$ . Одним из наиболее эффективных и прямых методов обнаружения и количественного определения NO в биологических образцах является метод ЭПР-спектроскопии с использованием спиновой ловушки. Метод спинового захвата основан на реакции радикала NO со спиновой ловушкой. Был применен комплекс  $Fe^{2+}$  с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса  $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$  [29,30]. Для образования в организме данного комплекса животным вводился вводный раствор ДЭТК-Na в дозе 500 mg/kg в 2.5 ml воды внутривентриально и раствор цитрата железа [сульфат железа (II)  $(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ , Sigma, USA] в дозе 37.5 mg/kg + цитрат натрия, 187.5 mg/kg внутримышечно (подробности метода описаны нами ранее) [31,32]. Ловушку оксида азота вводили за 30 min до вскрытия. Комплекс ДЭТК-Fe (II) взаимодействует с NO, в результате чего образуется стабильный радикал  $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$ . Данный комплекс является парамагнитным ( $S_{Fe} = 1/2$ , и  $I_N = 3/2$ ) и может быть зарегистрирован методом ЭПР [30]. Комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением  $g$ -фактора  $g = 2.035$  и триплетной сверхтонкой структурой. Количество NO оценивалось по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу  $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$ . Сигналы сравнивали по величине интегральной интенсивности, так как интегральная интенсивность сигнала ЭПР прямо пропорциональна концентрации парамагнитных комплексов [30]. Через 30 min после введения препаратов наркотизированную

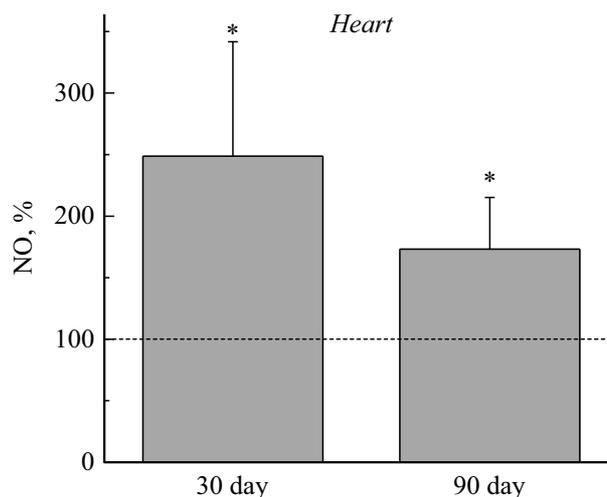
уретаном крысу фиксировали на операционном столе, вскрывали, извлеченные органы быстро просушивали и замораживали в жидком азоте в капиллярах для измерений. Для исследования забирали ткани сердца, печени и спинного мозга животных. Регистрация спектров ЭПР приготовленных образцов проводилась на спектрометре ЭПР X-диапазона ER-200E-SRC фирмы „Bruker“ EMX/plus с температурной приставкой ER 4112HV при 77 К. Во всех экспериментах сохранялись постоянными следующие параметры: СВЧ-мощность — 30 mW, модуляция — 5 Г, усиление — 4104, постоянная времени — 100 ms, время записи спектра — 50 s и число накоплений — 8. При накоплениях и регистрации спектров использовался компьютер спектрометра „Aspect 3000“ фирмы „Bruker“. Непосредственно перед измерением готовый образец, усеченный по форме кюветы для измерений, взвешивается. Масса образцов должна составлять около 100 mg. Амплитуда спектров ЭПР всегда нормируется на вес образца и на амплитуду сигнала ЭПР эталонного образца (подробности методики измерений сигналов ЭПР детально изложены ранее [31]).

При статистической обработке получали среднее значение измеряемой величины и стандартную ошибку среднего  $M \pm SEM$ . С применением *t*-критерия Стьюдента и *U*- критерия Манна–Уитни проверяли достоверность отличия средних значений уровней NO в разных тканях крыс разного возраста. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

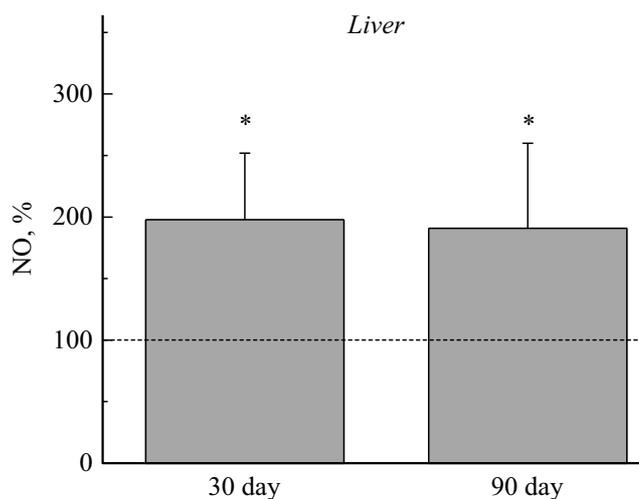
## 2. Результаты исследования и их обсуждение

Методом ЭПР были изучены ткани сердца, спинного мозга и печени крыс 7- и 16-недельного возраста, растущих в условиях ограничения подвижности, а также контрольных крыс соответствующего возраста. Во всех измеренных спектрах ЭПР регистрировали характерный триплетный сигнал от комплекса на основе спиновой ловушки  $(D\dot{E}TK)_2-Fe^{2+}-NO$ , интегральная интенсивность которого прямо пропорциональна содержанию NO в образце.

При сопоставлении спектров ЭПР тканей сердца крыс 7- и 16-недельного возраста, растущих в условиях ограничения подвижности, было обнаружено увеличение содержания NO в тканях сердца (рис. 1): после пребывания в условиях 30-суточной гипокинезии на 148.7%, после 90-суточной — на 73.2% по сравнению с показателями крыс контрольной группы ( $p < 0.05$ ). Рост в условиях 30- и 90-суточного ограничения подвижности вызвал повышение содержания NO в тканях печени крыс на 98 и 91% соответственно по сравнению с показателями контрольной группы ( $p < 0.05$ ), рис. 2. В тканях спинного мозга крысят, растущих в условиях ограничения подвижности в течение 30 суток, обнаруживается повышение интенсивности продукции NO на



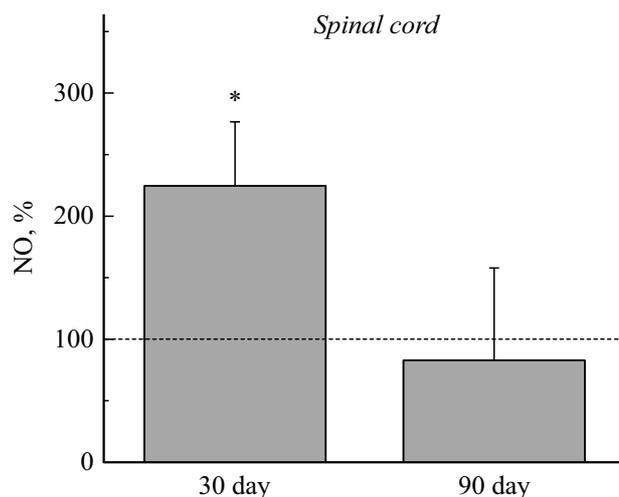
**Рис. 1.** Изменение продукции NO в тканях сердца крыс после 30- и 90-суточного ограничения подвижности относительно контроля. Ось ординат — изменение интегральной интенсивности сигнала от комплекса  $(D\dot{E}TK)_2-Fe^{2+}-NO$ , выраженная в процентах, по сравнению с показателями контрольной группы. Достоверность по сравнению с показателями контрольной группы:  $*p < 0.05$ .



**Рис. 2.** Изменение продукции NO в тканях печени крыс после 30- и 90-суточного ограничения подвижности относительно контроля. Ось ординат — изменение интегральной интенсивности сигнала от комплекса  $(D\dot{E}TK)_2-Fe^{2+}-NO$ , выраженная в процентах, по сравнению с показателями контрольной группы. Достоверность по сравнению с показателями контрольной группы:  $*p < 0.05$ .

125% относительно уровня этого показателя у контрольных крыс соответствующего возраста ( $p < 0.05$ ). А при ограничении подвижности в течение 90 суток продукция NO в тканях спинного мозга достоверно не отличается от уровня крыс контрольной группы (рис. 3).

Таким образом, рост в условиях ограничения подвижности приводит к усилению продукции NO во всех исследуемых образцах тканей, кроме тканей спинного



**Рис. 3.** Изменение продукции NO в тканях спинного мозга крыс после 30- и 90-суточного ограничения подвижности относительно контроля. Ось ординат — изменение интегральной интенсивности сигнала от комплекса  $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ , выраженная в процентах, по сравнению с показателями контрольной группы. Достоверность по сравнению с показателями контрольной группы: \*  $p < 0.05$ .

мозга крыс, растущих при 90-суточном ограничении подвижности. Реакция организма крыс на гипокинезию зависит от длительности ограничения двигательной активности. Наиболее выраженное увеличение содержания NO в тканях крыс обнаружено при 30-суточном ограничении подвижности. Вероятнее всего, это вызвано особенностями данного возраста: 7-ми недельный возраст — начало пубертата. Также на протяжении 1 месяца действия ограничения подвижности на органном уровне активируются локальные стресс-лимитирующие системы и система генерации оксида азота одна из них. Возможно, рост в условиях 30-суточного ограничения подвижности вызывает мобилизацию всех резервных механизмов адаптации. При ограничении подвижности в течение 90 суток также выявлено увеличение продукции оксида азота, однако оно менее выражено, чем при 30-суточной гипокинезии. Возможно, это связано с развитием к этому сроку адаптивного эффекта адекватной стресс-реакции. Активации NO-системы — один из тех механизмов, за счет которого организм предупреждает стрессорные повреждения.

## Заключение

Обнаруженное нами повышение интенсивности образования NO при ограничении подвижности позволяет сделать вывод о наличии тесных связей уровня NO в организме с режимом двигательной активности, особенно для растущего организма. Поскольку наша модель состоит из двух компонент: непосредственно гипокинезии и стресса от применяемых процедур. Таким

образом, существуют NO-зависимые механизмы реакции организма к иммобилизационному стрессу. Это важно, так как любой экспериментальный прием формирования ограничения двигательной активности включает в себя стрессорный компонент, который невозможно выделить в чистом виде. Интересным является тот факт, что повышение уровня NO в клетках, независимо от источника, эффективно предупреждает значительное нарастание его количества при стрессе и связанные с ним повреждения в тканях путем ингибирования индуцибельной формы фермента (iNOS) или через образование протекторных антиоксидантных или других белков [33], т.е. существует сложный механизм обратной связи. Полученные данные расширяют представления о роли оксида азота и NO-синтазы в деятельности внутренних органов крыс, растущих в стрессовых условиях в раннем постнатальном онтогенезе. В условиях ограничения подвижности, система NO может выступать стабилизирующей, предотвращающей разрушение скелетных мышц и других тканей, и запускать молекулярные механизмы адаптации организма. Поскольку известно, что гипокинезия вызывает значительные изменения в сердечно-сосудистой системе, во внутренних органах, в системе кровотока и снабжения организма кислородом, то можно предположить, что часть этих изменений вызвана стационарным увеличением продукции оксида азота в ключевых для деятельности организма тканях.

## Соблюдение этических стандартов

Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями локального биоэтического комитета Казанского федерального университета.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] А.Г. Кочетков, Т.И. Васягина. Морфология, **119** (3), 62–65 (2001).
- [2] Н.Г. Мальцева, Т.Г. Кузнецова. Проблемы здоровья и экологии, 113–118 (2008).
- [3] Т.Н. Руденко. Автореф. канд. дисс. (Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии, СПб., 2004)
- [4] А.Я. Тизул. *Болезни человека, обусловленные дефицитом двигательной активности, и здоровье* (Сов. спорт, М., 2001)
- [5] А.И. Усов, Т.И. Васягина, И.Г. Стельникова. Морфология, **127** (2), 47–51, (2005).
- [6] О.А. Хлущевская, Г.З. Химич. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук, **6**, 110–113, (2014).
- [7] В.В. Андрианов, Ф.Г. Ситдинов, Х.Л. Гайнутдинов, С.В. Юртаева, Г.Г. Яфарова, Л.Н. Муранова, А.А. Обыкновенный, Ф.К. Каримов, В.М. Чиглинцев, В.С. Ишдин. Онтогенез, **39** (6), 437–442 (2008).

- [8] Л.Л. Гудков, К.Б. Шумаев, Е.И. Каленикова, С.А. Губкина, А.Ф. Ванин, Э.К. Рууге. *Биофизика*, **52** (3), 503–509 (2007).
- [9] Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефилов. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **92** (7), 872–882 (2006).
- [10] B. Casadei, C.E. Sears. *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, **82** (1–3), 67–80 (2003). DOI: 10.1016/S0079-6107(03)00006-3/
- [11] T.A. Heinrich, R.S. da Silva, K.M. Miranda, C.H. Switzer, D.A. Wink, J.M. Fukuto. *Brit. J. Pharmacol.*, **169**, 1417–1429 (2013). DOI:10.1111/bph.12217
- [12] V.L. Lakomkin, A.F. Vanin, A.A. Timoshin, V.I. Kapelko, E.I. Chazov. *Nitric Oxide-Biol. Chem.*, **16** (4), 413–418 (2007). DOI: 10.1016/j.niox.2007.03.002
- [13] J.R. Steinert, T. Chernova, I.D. Forsythe. *Neuroscientist*, **16** (4), 435–452 (2010). DOI: 10.1177/1073858410366481
- [14] R.I. Zaripova, N.I. Ziyatdinova, T.L. Zefirov. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **161** (2), 215–217 (2016). DOI: 10.1007/s10517-016-3378-2
- [15] В.П. Реутов, В.Е. Охотин, А.В. Щуклин, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын, В.Н. Гуринов. *УФН*, **38** (4), 39–58 (2007).
- [16] V. Calabrese, C. Cornelius, E. Rizzarelli. *Antioxid. Redox Sign.*, **11**, 2717–2739 (2009).
- [17] A. Godecke, J. Schrader. *Circ. Res.*, **94** (6), 55–57 (2004).
- [18] S. Moncada, E.A. Higgs. *Br.J. Pharmacol.*, **147**, 193–201 (2006).
- [19] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet. *Physiol. Rev.*, **87** (1), 315–424 (2007).
- [20] A. Bishop, J.E. Anderson. *Toxicology*, **208**, 193–205 (2005).
- [21] А.Ф. Ванин. *Биохимия*, **63** (7), 924–938 (1998).
- [22] О.И. Писаренко, В.С. Шульженко, И.М. Студнева, Ю.А. Пелогейкина, А.Ф. Ванин. *Кардиология*, **12**, 43–49 (2009).
- [23] A.F. Vanin. *Nitric Oxide*, **54**, 15–29 (2016). DOI: 10.1016/j.niox.2016.01.006
- [24] D. Boehning, S.H. Snyder. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 105–131 (2003).
- [25] Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **86** (10), 1283–1292 (2000).
- [26] X.M. Марков. *УФН*, **32** (3), 49–65 (2001).
- [27] В.А. Малахов, А.Н. Завгородняя, В.С. Лычко, Т.Т. Джанелидзе, Ф.А. Волох. *Проблема оксида азота в неврологии* (СумГПУ им. А.С. Макаренко, Сумы, 2009), 242 с.
- [28] M.E. Tschakovsky, M.J. Joyner. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, **33** (1), 151–160 (2008).
- [29] V.V. Khrantsov, L.B. Volodarsky. *Biol. Magn. Res.*, **14**, 109–180 (1998).
- [30] В.Д. Микоян, Л.Н. Кубрина, А.Ф. Ванин. *Биофизика*, **39**, 915–918 (1994).
- [31] Kh.L. Gainutdinov, S.A. Gavrilova, V.S. Iyudin, A.V. Golubeva, M.P. Davydova, G.G. Jafarova, V.V. Andrianov, V.B. Koshelev. *Appl. Magn. Res.*, **40** (3), 267–278 (2011). DOI:10.1007/s00723-011-0207-7
- [32] Р.И. Зарипова, Г.Г. Яфарова, В.В. Андрианов, Х.Л. Гайнутдинов, Т.Л. Зефилов. *Биофизика*, **66** (3), 572–576, (2021). DOI: 10.31857/S0006302921030170 [R.I. Zaripova, G.G. Yafarova, V.V. Andrianov, K.L. Gainutdinov, T.L. Zefirov. *Biophysics*, **66** (3), 487–490, (2021). DOI: 10.1134/s0006350921030234]
- [33] N. Cantu-Medellin, E.E. Kelley. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **34** (1), 19–26 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2013.02.081