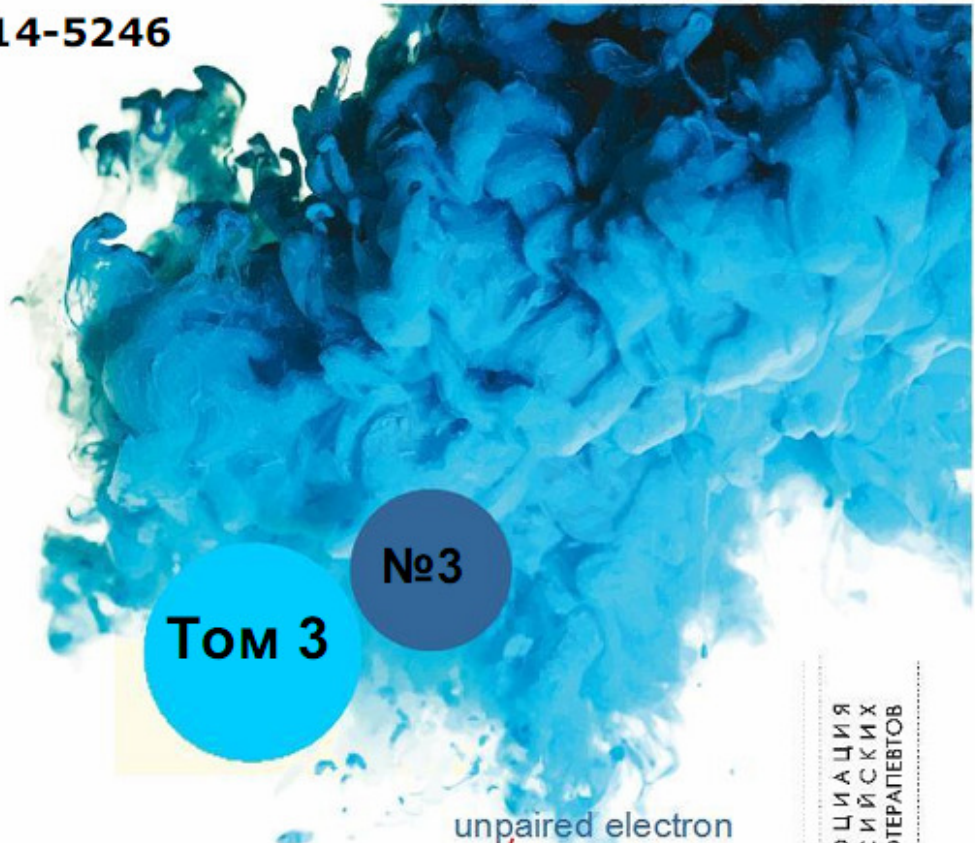
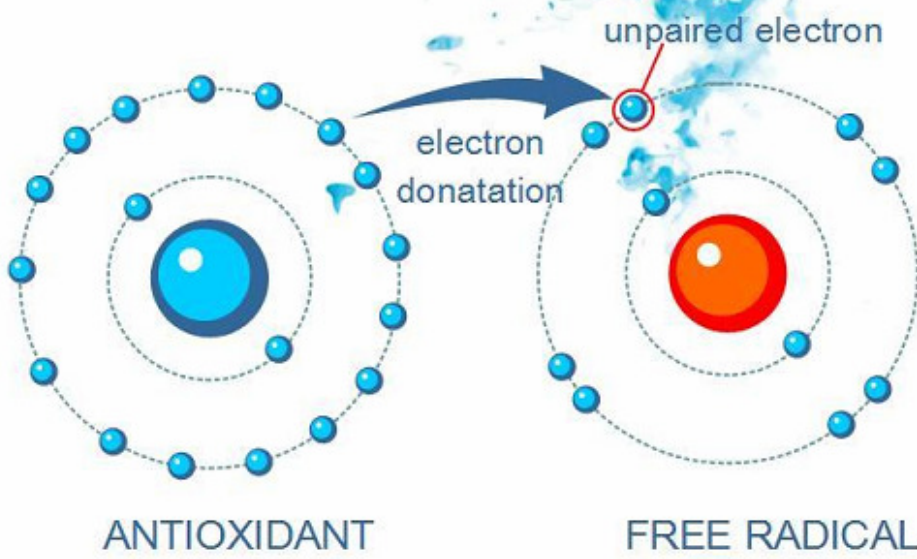


ISSN 2414-5246



Том 3

№3



АССОЦИАЦИЯ  
РОССИЙСКИХ  
ОЗОНОТЕРАПЕВТОВ



БИОРАДИКАЛЫ И  
АНТИОКСИДАНТЫ

2016

<b>О.И. Кваша, Н.Б. Чеснокова</b> Оксид азота и эноксипин при лечении ожоговой ишемии конъюнктивы (экспериментальные исследования)	204
<b>А.К. Мартусевич, А.Ф. Ванин</b> Экзогенный оксид азота как модулятор состояния биосистем и основа для создания инновационных медицинских технологий	206
<b>А.В. Разумовский, А.К. Мартусевич, А.В. Давыдюк, Л.К. Ковалева</b> Оценка адаптивного потенциала кристаллостаза крови крыс на действие физиологического донора оксида азота	208
<b>Н.Б. Мельникова, В.М.Коробко</b> Биомиметическое взаимодействие бис-нитроксида метанофуллера и цитохрома С	212
<b>В.М. Коробко, Н.Б. Мельникова</b> Исследование и разработка нитроксид-генерирующего противоожогового порошка	215
<b>И.Е. Окрут, К.Н. Конторикова, Д.А. Даугова</b> Влияние озонотерапии на концентрацию окиси азота при артериальной гипертензии	217
<b>И.Н. Симонова, Л.В. Веремчук, М.В. Антонюк, Е.Е. Минеева</b> Функционирование системы ПОЛ-АОЗ и уровень метаболитов NO при формировании бронхолегочной патологии в экологически неблагоприятном районе г. Владивостока	220
<b>Г.Г. Яфарова, В.В. Андрианов, Р.И. Зарипова, Т.Л. Зефирова, В.С. Июдин, Ф.Г. Ситдииков, С.В. Юртаева, Х.Л. Гайнутдинов</b> Эпр исследование изменения продукции оксида азота в тканях сердца и печени крыс при гипокнезии: эффекты блокаторов NO-синтаз	222

#### ТЕХНИЧЕСКИЕ, ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ И ИНЫЕ АСПЕКТЫ ОЗОНОТЕРАПИИ

<b>С.Н. Буранов, А.Б. Буянов, С.В. Воеводин, В.И. Карелин, В.Д. Селемир, А.С. Ширшин</b> Аппарат для ингаляционной NO-терапии	225
<b>С.Н. Буранов, А.Б. Буянов, В.И. Карелин, В.Д. Селемир, А.С. Ширшин</b> Озонаторные станции модульного типа «теозон»	227
<b>В.В.Розанов, И.В.Матвейчук, Ю.Ю.Литвинов, А.А.Уланова, И.В.Пангелеев</b> Анализ архитектоники костной ткани как объекта стерилизации с использованием озона	229
<b>А.В. Сумбаев, С.Ю. Семенищев, А.Н. Субботин, А.Н. Кулинский, О.П. Семенова</b> Устройство управления потоком кислорода	231



Г.Г. Яфарова<sup>1,2,3</sup>, В.В. Андрианов<sup>1,2</sup>, Р.И. Зарипова<sup>2</sup>, Т.Л. Зефилов<sup>2</sup>,  
В.С. Июдин<sup>1</sup>, Ф.Г. Ситдинов<sup>2</sup>, С.В. Юртаева<sup>1</sup>, Х.Л. Гайнутдинов<sup>1,2</sup>

## ЭПР ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА В ТКАНЯХ СЕРДЦА И ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПОКИНЕЗИИ: ЭФФЕКТЫ БЛОКАТОРОВ NO-СИНТАЗ

<sup>1</sup> Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН, Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> ГАУЗ «Республиканская клиническая больница МЗ РТ», Казань, Россия

Методом электронного парамагнитного резонанса анализировалась интенсивность продукции оксида азота (NO) в тканях сердца и печени крыс, содержащихся в условиях гипокинезии в течение 60 и 90 суток, а также контрольных крыс соответствующего возраста. Обнаружено, что количество NO, образующегося в этих тканях, увеличивается после 60- и 90-суточной гипокинезии в 2 раза. Применение неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME у гипокинезированных крыс приводило к снижению содержания NO в тканях сердца и печени на 67-70%. Селективный блокатор индуцибельной NO-синтазы амингуанидин также вызывал снижение содержания NO в тканях сердца и печени на 60-65%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение продукции NO при гипокинезии происходит за счет активации NO-синтаз.

**Ключевые слова:** оксид азота, сердце, гипокинезия, электронный парамагнитный резонанс

The intensity of the production of nitric oxide (NO) in the tissues of the heart and liver of rats contained in conditions of hypokinesia for 60 and 90 days and the control rats of the corresponding age were analysed by the method of electron paramagnetic resonance. It was discovered that the quantity of NO formed in these tissues increases after 60 - and 90 - day hypokinesia in 2 times. The use of non-selective blocker of NO-synthases by L-NAME at gipotenzivny rats resulted in a reduction of the NO content in heart tissues and liver to 67-70%. Selective blocker of inducible NO-synthase aminoguanidine also caused decrease of NO content in heart tissues and liver 60-65%. The results indicate that the increase of NO production during hypokinesia is due to the activation of NO-synthases.

**Key words:** nitric oxide, heart, hypokinesia, electron paramagnetic resonance

Система оксида азота (NO) является одной из наиболее изучаемых систем организма. NO постоянно продуцируют конститутивные изоформы NO-синтаз (NOS): эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS). В жизнедеятельности позвоночных особо значима роль NO при функционировании сердечно-сосудистой и нервной систем [1]. NO контролирует сосудистый тонус, артериальное давление, пролиферацию эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудистой стенки, участвует в возникновении атеросклероза и гипертензий, регулирует сократимость миокарда. Нарушения регуляции мозгового кровотока и снабжения сердца кровью и связанные с ними изменения продукции NO могут приводить к ишемии мозга и сердца с последующим развитием инсульта и инфаркта [1, 2]. Показано также, что система NO играет важную роль при адаптации организма к различным изменениям внешней среды и внешних условий [3]. Эти данные демонстрируют участие NO в регуляции физиологических функций в самых разных тканях.

В настоящее время чрезвычайно актуальна проблема гипокинезии (ГК) и/или гиподинамии. Гипокинезия (ограничение двигательной активности) является одной из важнейших медико-социальных проблем, вызванной образом жизни, профессиональной деятельностью, длительным постельным режимом и т.д. При ГК происходит уменьшение



нагрузки на мышечный аппарат, что приводит к изменениям функциональных и морфологических свойств тканей вплоть до патологических состояний в зависимости от продолжительности и степени ГК [4]. Снижение физической активности неизбежно ведет к детренированности скелетных мышц, уменьшению мышечной массы и снижению биосинтеза белков и энергетических процессов. Существенно уменьшаются потребление тканями кислорода и активность окислительных процессов. Исходя из этого, целью исследования явилось изучение возможного изменения продукции NO при ГК путем анализа содержания NO в различных тканях крыс, которые росли в условиях ограничения двигательной активности.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах. Животные были разделены на две группы: I группа - контрольные животные; II группа - животные, которые находились в условиях нарастающей ГК. Гипокинезию начинали с 21-дневного возраста: первые два дня время ГК составляло 1 час, а в дальнейшем увеличивалось на 2 часа через каждые 2 дня. К 25 дню ГК время пребывания животных в клетках-пеналах достигало 23 часов, и в дальнейшем оставалась постоянным до истечения 60 суток. В отдельных сериях экспериментов перед измерениями уровня продукции NO в тканях крыс для определения источников продукции NO при ГК (различных NOS) использовали неспецифический блокатор NOS - L-NAME в дозе 10 мг/кг. L-NAME вводили внутривентриально, предварительно за 60 мин до декапитирования. Для селективной блокады индуцибельной NO-синтазы использовался амингуанидин в концентрации 10 мг/кг, который также вводился внутривентриально, предварительно за 60 мин до декапитирования. Все препараты, используемые нами, разводились в физиологическом растворе.

Точное измерение как стационарной концентрации NO, так и скорости ее генерации в биологических системах является сложной задачей вследствие невысоких активностей NOS, малых времен полужизни NO. Существует большое количество методов измерения продукции NO в биологических системах. В последнее время одним из наиболее эффективных методов обнаружения и количественного определения оксида азота в биологических тканях стал метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [5]. Это произошло благодаря методике, разработанной Ваниным с сотрудниками, в которой они использовали метод спинового захвата. Метод обладает чувствительностью 0,04–0,4 нМ, позволяет проводить прямые измерения, является высокочувствительным за счет применения спиновых ловушек. В данной работе в качестве спиновой ловушки был применен комплекс  $Fe^{2+}$  с диэтилдитиокарбаматом -  $(ДЕТК)_2-Fe^{2+}-NO$ . Этот комплекс характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g-фактора  $g=2,035$  и триплетной сверхтонкой структурой [5]. Регистрация приготовленных образцов проводилась на спектрометре ЭПР EMX/plus X-диапазона фирмы "Брукер". Все измерения проводились при 140 К° при следующих условиях: частота модуляции 100 кГц, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ излучения 2 мВт, временная константа 81 мс, частота СВЧ излучения 9,445367 МГц.

При статистической обработке получали среднее значение измеряемой величины и стандартную ошибку среднего  $M \pm SEM$ . Достоверность различий оценивали по t- критерию Стьюдента и U- критерию Манна-Уитни.

Во всех измеренных спектрах ЭПР были обнаружены три типа парамагнитных комплексов иона железа с NO: спектр ЭПР комплекса на основе спиновой ловушки  $(ДЕТК)_2-Fe^{2+}-NO$ , и два типа комплексов гемового железа с NO: R- и T-конформеры Hb-NO. Измерения показывают, что продукция NO после ГК в течение 60 суток увеличивается в тканях сердца и печени в 2 раза. Содержание NO в сердце и печени крыс, которым предварительно был введен блокатор NO-синтаз L-NAME, после пребывания в условиях 90- суточной ГК снижалось на 68,3% и 82,6% соответственно. Применение этого блокатора подавляет эффект активации синтеза NO в условиях ограничения двигательной активности до уровня, значительно ниже значения у контрольных животных. Основываясь на выполненных экспериментах, нами было установлено, что увеличение образования NO при ГК происходит за счет интенсификации ферментативного пути синтеза NO, а доля NO, образованного по нитритредуктазному механизму, в условиях ГК не увеличивается. Применение селективного блокатора iNOS



а-аминогуанидина при ГК приводило к снижению содержания NO в тканях сердца крыс на 60%, а в тканях печени - на 71% (Все препараты фирмы "Sigma"). Это позволяет утверждать, что за активацию синтеза NO при ГК преимущественно ответственна iNOS.

Полученные результаты показывают, что ГК приводит к усилению продукции NO в тканях сердца и печени крыс. Поскольку наша модель состоит из двух компонент: непосредственно ГК и стресса от применяемых процедур, то это означает, что существуют NO-зависимые механизмы реакции организма к ГК и иммобилизационному стрессу. Количественное определение содержания NO позволяет оценить воздействие стрессовых условий на генерацию NO в растущем организме. Это важно, т.к. любой экспериментальный прием формирования ГК включает в себя стрессорный компонент, который невозможно выделить в чистом виде. Полученные данные расширяют представления о роли NO и NO-синтаз в деятельности внутренних органов крыс, растущих в стрессовых условиях в раннем постнатальном онтогенезе. При ГК не исключается иммобилизационный стресс и по сдвигам содержания NO возможно судить о стрессоустойчивости животных и человека.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о наличии тесных связей уровня NO в организме с режимом двигательной активности. Поскольку рассмотрение данных литературы показывает, что ГК 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 NO в ключевых для деятельности организма тканях.

#### Список литературы:

1. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах // Биохимия – 1998. – Т. 63. – С. 924-938.
2. Реутов В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В. и др. Оксид азота и цикл в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты // Успехи физиол. наук. – 2007. – Т. 38. - № 4. – С. 39-58.
3. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. Стресс-лимитирующая система оксида азота // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова – 2000. – Т. 86. – С. 1283-1292.
4. Козловская И.Б., Киренская А.В. Механизмы нарушений характеристик точностных движений при длительной гипокинезии // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2003. – Т. 89. - № 3. – С. 247-258.
5. Vanin A.F., Huisman A., Van Faassen E.E. Iron dithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection: pitfalls and successes // Methods in Enzymology – 2003 – V. 359. – P. 27-42.