

УДК 577.35 + 612.17 + 53.083

## ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ВАГОТОМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ОКСИДА АЗОТА В СЕРДЦЕ КРЫС

<sup>1</sup>Хабибрахманов И.И., <sup>2</sup>Андрианов В.В., <sup>1,2</sup>Гайнутдинов Х.Л., <sup>1</sup>Зефирова Т.Л.<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО «Казанский федеральный университет», Казань, e-mail: insaf1201@mail.ru;<sup>2</sup>ФГБУН «Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН», Казань

Экспериментально методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) путем анализа количества NO-содержащих парамагнитных комплексов анализировалась интенсивность продукции оксида азота в тканях желудочков и предсердий сердца крыс после острой ваготомии, а также контрольных крыс. Количество оксида азота оценивалось по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего спинового ловушке – комплексу (ДЭТК)<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>-NO, который характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g-фактора  $g = 2,035$  и триплетной сверхтонкой структурой. Обнаружено, что после острой ваготомии количество оксида азота, образующегося в левом предсердии, увеличивается в 2 раза относительно интактных животных. В то же время в тканях левого и правого желудочков и правого предсердия после острой ваготомии изменений продукции оксида азота не выявлено. Не обнаружено достоверных изменений продукции оксида азота в тканях печени и селезенки после острой ваготомии.

**Ключевые слова:** оксид азота, сердце, ваготомия, крысы, электронный парамагнитный резонанс

## EFFECT OF ACUTE VAGOTOMY ON THE CONTENT OF NITRIC OXIDE IN HEART OF RATS

<sup>1</sup>Khabibrakhmanov I.I., <sup>2</sup>Andrianov V.V., <sup>1,2</sup>Gaynutdinov K.L., <sup>1</sup>Zefirova T.L.<sup>1</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, e-mail: insaf1201@mail.ru;<sup>2</sup>Zavoisky Physical-Technical Institute of Russian Academy of Sciences, Kazan

Experimentally by electron paramagnetic resonance (EPR) using measuring of the number of NO – containing paramagnetic complexes were analyzed the intensity of nitric oxide production in the tissues of the ventricles and atria of the heart in rats after acute vagotomy and in control rats. The amount of nitric oxide was estimated as the intensity of the characteristic EPR signal of spin trap – complex (DETC)<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>-NO, which is characterized by easily recognizable EPR spectrum with a value of g-factor  $g = 2,035$  and triplet hyperfine structure. It was discovered that after acute vagotomy the amount of nitric oxide produced in the left atrium increases by 2 times compared to intact animals. At the same time in the tissues of the left and right ventricle and the right atrium after acute vagotomy the changes in the nitric oxide production was not detected. It was not detected the significant changes of nitric oxide production in the tissues of the liver and spleen after acute vagotomy.

**Keywords:** nitric oxide, heart, rat, vagotomy, electron paramagnetic resonance

Парасимпатическая регуляция сердца и большинства внутренних органов осуществляется через блуждающие нервы. В составе правого и левого вагуса проходят преганглионарные парасимпатические волокна, чувствительные и двигательные постганглионарные симпатические волокна. Ряд авторов употребляют термины парасимпатическая и вагусная регуляция сердца как синонимы, хотя, на наш взгляд, это неверно. Принято считать, что вагус ингибирует (тормозит) работу сердца. На самом деле парасимпатические преганглионары, проходящие в составе вагуса, образуют возбуждающие синапсы с постганглионарными парасимпатическими нейронами, находящимися в интракардиальных ганглиях, а те уже в свою очередь образуют тормозные синапсы с кардиомиоцитами [11].

Классическими являются эксперименты с перерезкой вагуса, которые вызывают учащение работы сердца и эксперименты со стимуляцией вагуса, приводящие к уреже-

нию работы сердца. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что ваготомия приводит к кратковременному учащению, после чего наблюдается брадикардия. Перерезка вагуса приводит к серьезным изменениям сердечного ритма, блокада аксонального транспорта в волокнах нерва также оказывает влияние на работу сердца.

Механизм ингибирования сердечной деятельности при взаимодействии ацетилхолина с мускариновыми холинорецепторами изучен достаточно хорошо, однако недавно было показано, что в сердце М-ХР могут активировать NO-синтазу, увеличивая уровень оксида азота. NO активирует гуанилатциклазу. Увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ стимулирует фосфодиэстеразу, понижающую концентрацию цАМФ [7, 9].

В то же время активация М-ХР может также вызывать и увеличение цАМФ. Это происходит при активации аденилатциклазы при связывании М-ХР с G<sub>s</sub>-белком [14, 15].

Исходя из всего вышеизложенного, представляется весьма актуальным изучение содержания NO в тканях различных участков сердца после нарушения целостности блуждающего нерва.

Оксид азота (NO) рассматривается в настоящее время как новая сигнальная молекула, играющая роль универсального регулятора многих физиологических процессов в организме [4, 13]. В жизнедеятельности животных особо значима роль NO в функционировании сердечно-сосудистой [1, 6] и нервной систем [6, 8]. NO контролирует сосудистый тонус, артериальное давление, регулирует сократимость миокарда [4]. 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 [10]. Установлено, что NO ухудшает протекание инфаркта миокарда, и это ухудшение заключается в снижении частоты сердечных сокращений, снижении артериального давления, ударного и минутного объемов крови [3]. Существует также противоположная точка зрения, согласно которой избыток NO служит компенсаторным фактором, способствует поддержанию тканевой перфузии и оказывает антиаритмическое действие при реперфузии [2]. Выявлено значительное снижение сердечного выброса, ударного объема крови и печеночной микроциркуляции после введения препаратов, блокирующих активность NO-синтазы [10].

Таким образом, описанные данные литературы свидетельствуют о двух диаметрально противоположных влияниях NO: стимулирующее, положительное, а также токсическое, повреждающее действие, способное приводить к гибели клеток [5]. Поэтому можно предположить, что эффект зависит от количества образующегося NO. Но не ясно, какие количества NO считать небольшими, а какие увеличенными. Вместе с тем отсутствуют данные об уровне продукции NO в предсердиях и желудочках, в рабочем и атипическом миокарде сердца в условиях нормы. При любом подходе к роли NO необходимо иметь в виду, что NO – активный участник процессов метаболизма и резкое изменение его генерации может привести к нарушению функциональной активности многих биосистем.

Исходя из этого, **целью исследования** явилось изучение роли NO в последствиях, возникающих при острой ваготомии, путем анализа NO-содержащих парамагнитных комплексов в различных отделах сердца крыс, подвергнутых острой ваготомии, а также сравнить эти данные с аналогичными, полученными у интактных животных.

## Материал и методы исследования

Исследования проведены на белых лабораторных беспородных крысах стадного разведения, которых разделили на 2 группы: I – контрольная группа, которая содержалась в стандартных условиях вивария (К); II – опытная группа, у которой производилась операция острой ваготомии.

Содержание NO в органах крыс определялось методом ЭПР спектроскопии с использованием спиновой метки; метода, разработанного в институте химической физики РАН профессором А.Ф. Ваниным и сотрудниками [12]. Как и ранее [1], был применен комплекс  $\text{Fe}^{2+}$  с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК). Компоненты спиновой ловушки вводятся животному отдельно: ДЭТК-Na вводили внутривентриально в дозе 500 мг/кг в 2,5 мл воды, а смесь растворов: сульфата железа ( $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , Sigma, США) в дозе 37,5 мг/кг и цитрата натрия (хч) в дозе 187,5 мг/кг, приготовленную непосредственно перед введением, вводили подкожно в три точки – правое и левое бедро и в холку. В смеси сульфата железа и цитрата натрия образуется цитрат железа. ДЭТК-Na и цитрат железа распределяются по организму и при взаимодействии образуют нерастворимый в воде комплекс ДЭТК- $\text{Fe}^{2+}$ , который способен взаимодействовать с NO с образованием стабильного радикала  $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ , который может быть зарегистрирован методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Через 40 мин после введения препаратов крыс декапитировали. Операции проводили с соблюдением биоэтических норм. В качестве наркоза использовали 25% раствор уретана из расчета 800 мг/кг массы животного, который вводился внутривентриально. Извлеченные ткани быстро просушивали и замораживали в жидком азоте в специальных капиллярах для измерений. Масса образцов составляла 100 мг. Регистрация спектров ЭПР приготовленных образцов проводилась на спектрометре ЭПР X-диапазона ER 200E SRC фирмы «Bruker» при температуре 77 К°. Амплитуда модуляции, усиление и мощность СВЧ во всех экспериментах подбирались с условием отсутствия перемодуляции и насыщения сигнала ЭПР и сохранялись одинаковыми на протяжении всех измерений. Количество NO оценивалось по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу  $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ . Регистрация и обработка спектров производилась сотрудником КФТИ КНЦ РАН Июдиным В.С.

При статистической обработке получали среднее значение измеряемой величины и стандартную ошибку среднего  $M \pm \text{SEM}$ . Достоверность отличия получаемых значений средних величин проверяли с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна – Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

Методом ЭПР были изучены ткани желудочков и предсердий сердца контрольных крыс и крыс после острой ваготомии. Во всех измеренных спектрах ЭПР регистрировали характерный триплетный сигнал (рис. 1) от комплекса  $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ , интегральная интенсивность которого прямо пропорциональна содержанию NO в образце. Измерения величины интегральной

интенсивности спектров ЭПР комплекса  $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$  показывают, что после острой ваготомии количество NO, образующегося в левом предсердии, увеличи-

вается в 2 раза (рис. 2), однако в тканях левого и правого желудочков и правого предсердия изменений продукции NO не выявлено (рис. 2, 3).

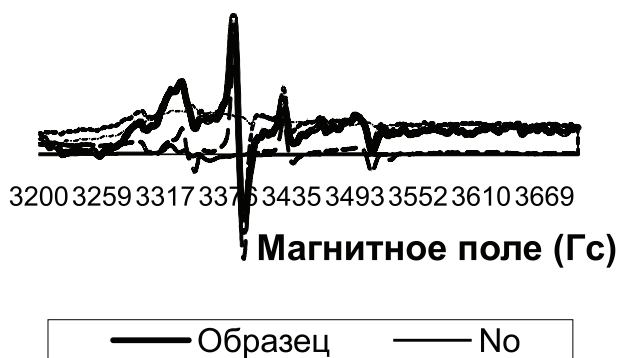


Рис. 1. Спектры ЭПР тканей левого желудочка сердца крыс после острой ваготомии. Ось абсцисс – величина магнитного поля

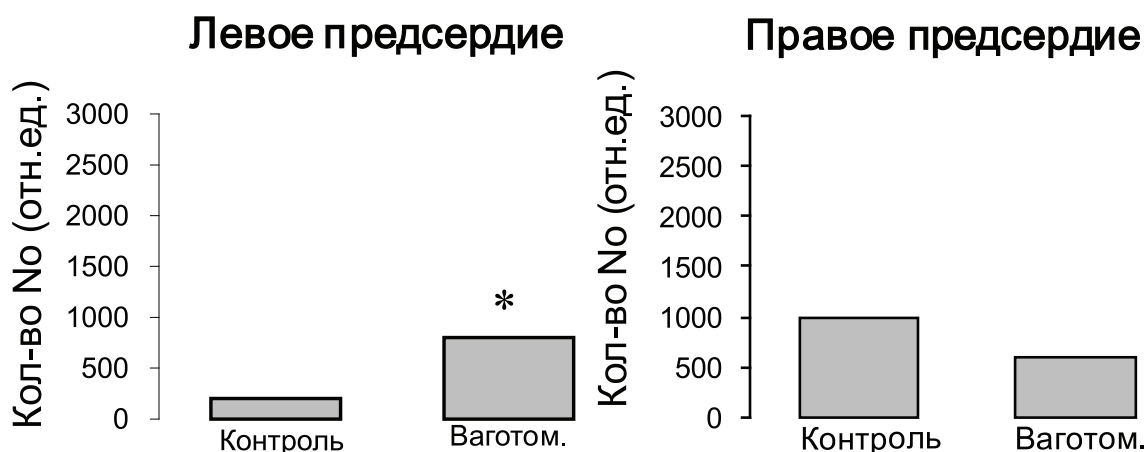


Рис. 2. Изменение количества NO-содержащего парамагнитного комплекса  $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$  в тканях левого и правого предсердий интактных крыс и крыс после острой ваготомии. Ось ординат – интегральная интенсивность спектра ЭПР, отн.ед. Примечание: \* – достоверность по сравнению с показателями контрольной группы:  $p < 0,05$

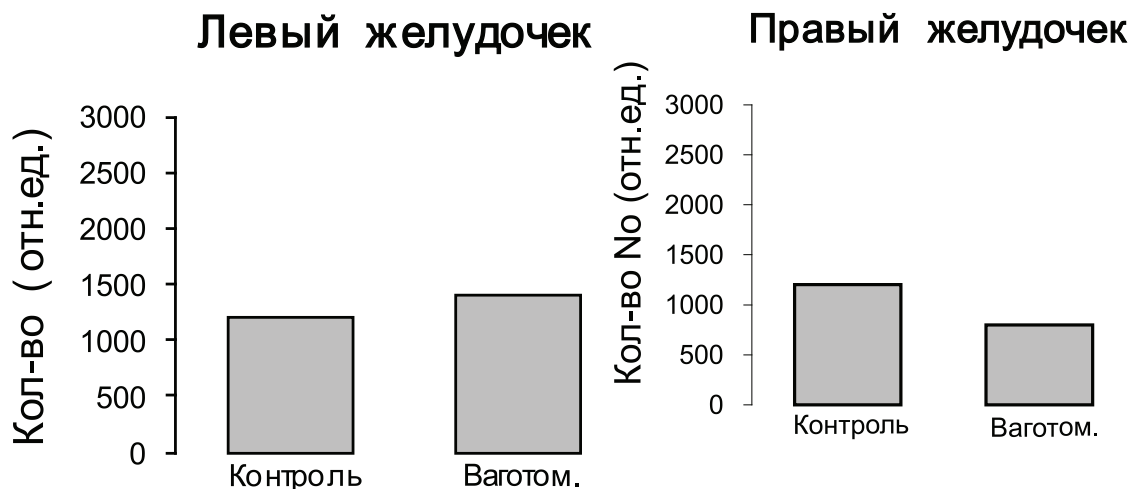


Рис. 3. Изменение количества NO-содержащего парамагнитного комплекса  $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$  в тканях левого и правого желудочков интактных крыс и крыс после острой ваготомии. Ось ординат – интегральная интенсивность спектра ЭПР, отн.ед.

Известно, что преганглионарные парасимпатические волокна, проходящие в составе блуждающих нервов, заканчиваются в тканях предсердий. В миокарде желудочков холинергические волокна представлены в меньшей степени. Поэтому изменение содержания NO в миокарде левого предсердия, выявленное в наших экспериментах с острой ваготомией, представляется весьма обоснованным. В то же время необходимо отметить, что перерезка левого блуждающего нерва, которая производилась нами в ранее произведенных экспериментах, также вызывала существенные изменения функционального состояния сердца крыс. Состояние и интенсивность каскадов внутриклеточных биохимических реакций при избирательной, острой и хронической ваготомии остаются до конца не изученными. Исходя из этого изменение содержания NO в тканях сердца после ваготомии и блокады аксонального транспорта требует дальнейших исследований.

### Выводы

1. Методом ЭПР спектроскопии на основе измерений величины интегральной интенсивности спектров комплекса (ДЭТК)<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>-NO показано, что после острой ваготомии у крыс количество NO, образующегося в левом предсердии, увеличивается в 2 раза относительно интактных животных.

2. При острой ваготомии у крыс не выявлено изменений продукции NO в тканях левого и правого желудочков.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-04-97082-р).*

### Список литературы

1. Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Иудин В.С., Юртаева С.В., Яфарова Г.Г., Файзуллина Р.И., Ситдилов Ф.Г. Исследование методом ЭПР спектроскопии интенсивности продукции оксида азота в организме крыс при гипокинезии // Биофизика. – 2013. – Т. 58. – № 2. – С. 276–280.
2. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. Стресс-лимитирующая система оксида азота // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86. – № 10. – С. 1283–1292.
3. Рахматуллина Ф.Ф., Насырова А.Г., Зефирова А.Л. Течение экспериментального инфаркта миокарда в условиях угнетения и усиления синтеза NO // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2005. – Т. 134. – № 4. – С. 371–375.
4. Реутов В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С., Гурин В.Н. Оксид азота и цикл в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты // Успехи физиол. наук. – 2007. – Т. 38. – № 4. – С. 39–58.
5. Calabrese V., Cornelius C., Rizzarelli E., Owen J.B., Dinkova-Kostova A.T., Butterfield D.A. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule // Antioxidants and Redox Signaling. – 2009. – Vol. 11. – № 11. – P. 2717–2739.
6. Casadei B., Sears E.C. Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 82. – № 1–3. – P. 67–80.
7. Cawley S.M., Kolodziej S., Ichinose F., Brouckaert P., Buys E.S., Bloch K.D. sGCα1 mediates the negative inotropic effects of NO in cardiac myocytes independent of changes in calcium handling // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2011. – Vol. 301. – № 1. – P. 157–163.
8. Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S., Golubeva A.V., Davydova M.P., Jafarova G.G., Andrianov V.V., Koshelev V.B. EPR study of the intensity of the nitric oxide production in rat brain after ischemic stroke // Applied Magnetic Resonance. – 2011. – Vol. – 40. – № 3. – P. 267–278.

9. Hofmann F.B.M., Feil R., Kleppisch T. Mouse models of NO/natriuretic peptide/cGMP kinase signaling // Handbook of Experimental Pharmacology. – 2004. – Vol. 159. – P. 95–130.
10. Hwang T.L., Yeh C.C. Hemodynamic and hepatic microcirculatory changes in endotoxemic rats treated with different NOS inhibitors // Hepatogastroenterology. – 2003. – Vol. 50. – № 49. – P. 188–191.
11. Kukanova B., Mravec B. Complex intracardiac nervous system // Bratisl Lek Listy. – 2006. – Vol. 107. – № 3. – P. 45–51.
12. Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Serezhnikov V.A., Stukan R.A., Vanin A.F. Complexes of Fe<sup>2+</sup> with diethyldithiocarbamate or N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate as traps of nitric oxide in animal tissues // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – Vol. 1336. – № 2. – P. 225–234.
13. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87. – № 1. – P. 315–424.
14. Shen J.X., Cooper D.M. AKAP79, PKC, PKA and PDE4 participate in a Gq-linked muscarinic receptor and adenylyl cyclase 2 cAMP signalling complex // Biochem J. – 2013. – Vol. 455. – № 1. – P. 47–56.
15. Shen J.X., Wachten S., Halls M.L., Everett K.L., Cooper D.M. Muscarinic receptors stimulate AC2 by novel phosphorylation sites, whereas Gβγ subunits exert opposing effects depending on the G-protein source // Biochem. J. – 2012. – Vol. 447. – № 3. – P. 393–405.

### References

1. Gainutdinov H.L., Andrianov V.V., Iyudin V.S., Jurtaeva S.V., Jafarova G.G., Fajzullina R.I., Sitdikov F.G. *Biofizika*, 2013, vol. 58, no. 2, pp. 276–280.
2. Manuhina E.B., Malyshev I.Ju. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova*, 2000, vol. 86, no. 10, pp. 1283–1292.
3. Rahmatullina F.F., Nasyrova A.G., Zefirov A.L. *Bjull. eksper. biol. med.*, 2005, vol. 134, no. 4, pp. 371–375.
4. Reutov V.P., Ohotin V.E., Shuklin A.V., Sorokina E.G., Kosicyn N.S., Gurin V.N. *Uspehi fiziol. nauk*, 2007, vol. 38, no. 4, pp. 39–58.
5. Calabrese V., Cornelius C., Rizzarelli E., Owen J.B., Dinkova-Kostova A.T., Butterfield D.A. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2009, vol. 11, no. 11, pp. 2717–2739.
6. Casadei B., Sears E.C. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2003, vol. 82, no. 1–3, pp. 67–80.
7. Cawley S.M., Kolodziej S., Ichinose F., Brouckaert P., Buys E.S., Bloch K.D. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2011, vol. 301, no. 1, pp. 157–163.
8. Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S., Golubeva A.V., Davydova M.P., Jafarova G.G., Andrianov V.V., Koshelev V.B. *Applied Magnetic Resonance*, 2011, vol. 40, no. 3, pp. 267–278.
9. Hofmann F., Biel M., Feil R., Kleppisch T. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2004, vol. 159, pp. 95–130.
10. Hwang T.L., Yeh C.C. *Hepatogastroenterology*, 2003, vol. 50, no. 49, pp. 188–191.
11. Kukanova B., Mravec B. *Bratisl Lek Listy*, 2006, vol. 107, no. 3, pp. 45–51.
12. Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Serezhnikov V.A., Stukan R.A., Vanin A.F. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, vol. 1336, no. 2, pp. 225–234.
13. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. *Physiol. Rev.*, 2007, vol. 87, no. 1, pp. 315–424.
14. Shen J.X., Cooper D.M. *Biochem J.*, 2013, vol. 455, no. 1, pp. 47–56.
15. Shen J.X., Wachten S., Halls M.L., Everett K.L., Cooper D.M. *Biochem. J.*, 2012, vol. 447, no. 3, pp. 393–405.

### Рецензенты:

Шайхелисламова М.В., д.б.н., профессор кафедры анатомии, физиологии и охраны здоровья человека, ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань;

Биктемирова Р.Г., д.м.н., профессор кафедры анатомии, физиологии и охраны здоровья человека, ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань.

Работа поступила в редакцию 23.10.2014.