

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ИЗОФОРМЫ NO-СИНТАЗЫ В СТРЕССПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТА ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИН СУКЦИНАТА

Балашов В.П.², Смирнов Л.Д.¹, Балыкова Л.А.², Герасимова Н.Г.², Маркелова И.А.², Кругляков П.П.², Таланова Е.В.²

Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН¹, Москва; Мордовский государственный университет имени Н.П.Огарева², Саранск

Резюме

Проведен анализ экспрессии NO-синтазы на белых мышах, подвергнутых хроническому иммобилизационному стрессу и получавших сукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГПС) при внутрибрюшинном введении. Проводили иммуногистохимическое исследование миокарда левого желудочка по традиционной методике с использованием первичных антител к индуцибельной изоформе NO-синтазы. Экспрессия индуцибельной изоформы в кардиомиоцитах при применении ЭМГПС значительно снижается по сравнению с животными, подвергнутыми хроническому иммобилизационному стрессу без введения ЭМГПС.

Ключевые слова: антиоксидант- этилметилгидроксипиридин сукцинат, NO-синтаза, хронический стресс.

Сегодня в литературе широко обсуждается участие NO-синтазной системы в реализации стрессорного и ишемического повреждения различных органов и систем организма [1, 2, 3, 4]. В связи с этим ферменты семейства NO-синтаз рассматриваются как вероятная мишень при изыскании новых кардиотропных средств и объяснения механизмов действия уже известных лекарственных препаратов. В этом плане особое внимание привлекает отечественный препарат, относящийся к группе водорастворимых азотистых гетероциклов — сукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГПС), выпускаемый под коммерческими названиями «мексидол» и «мексикор». Препарат эффективен при остром инфаркте миокарда, стабильной стенокардии напряжения, гипертоническом кризе и ряде других состояний [5,6]. Механизм его действия, в перечисленных клинических ситуациях, опосредован не только наличием энергообеспечивающих и противоишемических свойств [7], но и предположительной способностью модулировать эффекты NO-синтазной системы [8]. Однако это предположение на сегодня не подтверждено прямыми исследованиями. В связи с этим, учитывая общность патогенеза стрессорного и ишемического повреждения миокарда [9], целью нашей работы явилось изучение участия индуцибельной изоформы NO-синтазы в реализации кардиопротекторного эффекта ЭМГПС при экспериментальном хроническом стрессе.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 30 белых мышах (20-24 г). Животные были разделены на три группы: 1- интактные мыши (контроль); 2 — животные, подвер-

гнутые хроническому иммобилизационному стрессу (25%, 30 суток, 6 раз в неделю); 3 — животные, подвергнутые хроническому иммобилизационному стрессу и получающие ЭМГПС (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, 30 суток, 6 раз в неделю).

Количественный учет NO проводили по методу Голикова А.П. с соавт. с применением реактива Грисса [6]. Для анализа экспрессии NO-синтазы животных гильотинировали под легким эфирным наркозом. Проводили иммуногистохимическое исследование миокарда левого желудочка по традиционной методике (авидин-биотиновый метод) с использованием первичных антител к индуцибельной изоформе NO-синтазы (iNOS, Santa Cruz, в концентрации 1:400). В качестве контроля использовали инкубацию без первичных антител.

Результаты и обсуждение

Количественный анализ содержания оксида азота в миокарде мышей (табл 1.) свидетельствует о заметном дисбалансе этого важного мессенджера в условиях стрессорного повреждения. ЭМГПС, как показывают полученные нами результаты, эффективно нормализует количество NO в ткани сердца подопытных животных. Иммуногистохимическое исследование миокарда подопытных животных подтверждает важную роль индуцибельной изоформы NO-синтазной системы в развитии наблюдаемых колебаний NO.

У животных контрольной группы, находящихся в условиях стандартного двигательного режима, выявляется слабая иммунопозитивная реакция к индуцибельной изоформе NO-синтазы. Однако топография

Таблица 1
Влияние стресса и ЭМГПС на содержание
оксида азота в миокарде мышей

Условия опыта	NO, нмоль/г
Стандартная двигательная активность (контроль)	20,06±2,76
Имобилизационный стресс	13,23±0,76*
Имобилизационный стресс + ЭМГПС, 20 мг/кг	24,27±3,15**

Примечание: * – отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$; ** – отличия от имобилизационного стресса достоверны при $p < 0,05$.

реакции с антителами неоднородная. Энзим выявляется в рабочем миокарде, тогда как в эндотелии сосудов экспрессии данной изоформы не отмечается (рис.1).

В ответ на длительное стрессорное воздействие обнаруживается заметное усиление экспрессии индуцибельной изоформы в различных участках миокарда (рис. 2). Однако остается открытым вопрос о разнонаправленности тенденций влияния длительного стресса на содержание NO в миокарде и интенсивности экспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы. На наш взгляд, данное обстоятельство свидетельствует о стресс-опосредованной разобщенности молекулярно-генетических процессов, лежащих в основе экспрессии изучаемой изоформы энзима и биохимических механизмов поддержания активности фермента. Вследствие этого стресс провоцирует выработку большого количества индуцибельной изоформы NO-синтазы, но к концу периода наблюдения фермент оказывается малоактивным, поскольку может быть частично инактивирован токсическими продуктами распада мембран и развивающимся метаболическим ацидозом.

Правильность этого предположения косвенно подтверждается способностью ЭМГПС корректировать стресс-опосредованный дисбаланс активности NO-синтазной системы.

ЭМГПС, обладающий антиоксидантными, энергообеспечивающими, антиацидотическими свойствами [7], способствует некоторому снижению экспрессии индуцибельной изоформы в кардиомиоцитах (рис. 3) по сравнению с животными, подвергнутыми хроническому имобилизационному стрессу без применения препарата. Однако, как свидетельствуют данные табл. 1, NO-синтетическая активность этого пула фермента оказывается достаточно высокой.

Таким образом, при длительном стрессорном воздействии в эксперименте возникает характерный дисбаланс NO-синтазной системы. Стресс вызывает усиление экспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы, но синтезируемый фермент, по-видимому, является дефектным, вследствие чего обладает более низкой активностью, что сопровождается снижением суммарного количества NO в миокарде. Полученные нами результаты можно признать важными для харак-



Рис. 1. Экспрессия iNOS в миокарде мышей контрольной группы x 260. Авидин-биотиновый метод.

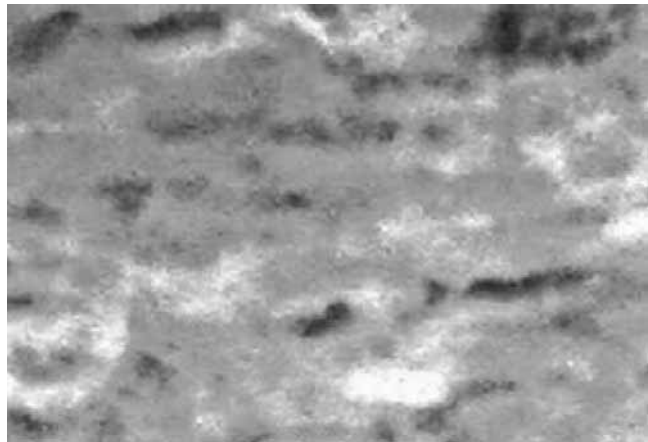


Рис. 2. Экспрессия iNOS в миокарде мышей при хроническом стрессе x 260. Авидин-биотиновый метод.

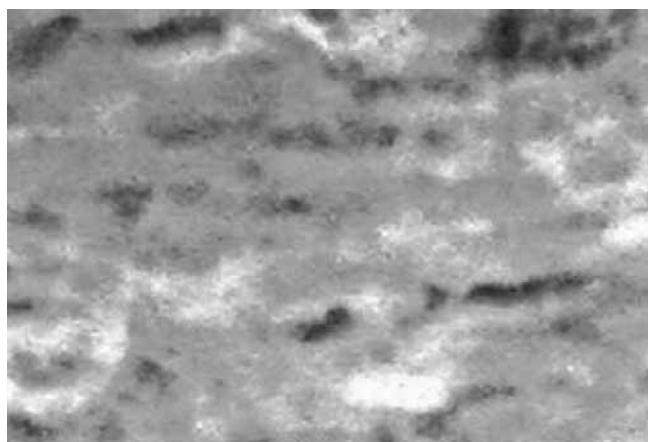


Рис. 3. Экспрессия iNOS в кардиомиоцитах сердца мышей при хроническом стрессе и применении ЭМГПС x 260. Авидин-биотиновый метод.

теристики механизмов стрессорного и, по-видимому, ишемического повреждения миокарда. Это предположение согласуется с данными других авторов о протекторной роли NO при экспериментальном инфаркте миокарда [8].

Заключение

При применении ЭМГПС содержание NO в миокарде заметно нормализуется, что может объясняться повышением синтетической активности индуцибель-

ной изоформы NO-синтазы. Кроме того, нельзя не учитывать теоретическую возможность усиления, под действием ЭМГПС, экспрессии эндотелиальной изоформы NO-синтазы, которая также может вносить определенный вклад в реализацию фармакологического эффекта сукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты: 05-04-49461-а).

Литература

1. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. М: Медпрактика-М, 2004; 61-75.
2. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001; 14-18.
3. Малышев И.Ю., Манукина Е.Б.// Биохимия 1998, 63, №7; 992-1006.
4. Реутов В.П. //Успехи биол. химии 1995, 35; 189-228.
5. Михин В.П., Михайлова Т.Ю., Харченко А.В. и др. Клинические исследования лекарственных средств в России 2003, №2; 23-26.
6. Голиков А.П., Михин В.П., Полумисков В.Ю. и др.// Терапевтический архив 2004, 76, №4; 70-74.
7. Сернов Л.Н., Смирнов Л.Д., Шапошникова Г.И. и др. Клинические исследования лекарственных средств в России. 2004, №1; 24-28.
8. Голиков А.П., Бойцов С.А., Михин В.П. и др.// Лечащий врач 2003, №4; 70-74.
9. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М.: Медицина, 1984, с. 272.
10. Kasem Nithipatekom, Phillip F. Pratt.// Eur. J. Clin. Biochem. 1996, №34, 133- 137.
11. Котляров А.А., Смирнов Л.Д., Куркина Н.В. и др.// Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002, №5, 31-34.
12. Липина Т.В.// Природа 2005, №8, 81-82.

Abstract

The authors analyzed NO-synthase expression in white mice exposed to chronic immobilization stress and receiving intraperitoneal 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate (EMHPS). Immune-histochemical analysis of left ventricular myocardium was performed by standard method, with primary inducible NO-synthase isoform antibody use. Inducible isoform expression in cardiomyocytes exposed to EMHPS was significantly lower than in chronic immobilization stress without EMHPS administration.

Keywords: Antioxidant ethyl-methyl-hydroxypyridine succinate, NO-synthase, chronic stress.

Поступила 10/11-2006