

РОЛЬ ФАКТОРОВ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В ФОРМИРОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Касимова Г.З.

Андижанский государственный медицинский институт.

✓ Резюме,

Цель исследования - исследовать характер активности ферментов eNOS и iNOS, экспрессии NO и ONO2- в сыворотке крови кроликов в динамике формирования метаболического синдрома.

Материал и методы исследования. Эксперименты проведены на 40 кроликах-самцах, массой тела 2 - 3,5 кг. Для создания модели метаболического синдрома в поилку животных добавляли 5%-ный раствор сахарозы, а в корм ежедневно подмешивали кристаллический холестерин в дозе 250 мг/кг массы тела. Животным подкожно вводили инсулин в дозе 0,1 ед./100 г, через день. Продолжительность эксперимента 2 месяца.

В эксперименте при развитии метаболического синдрома в крови установлен дисбаланс в NO-системе: увеличение содержания в сыворотке крови NO, iNOS и ONO2- на фоне угнетения активности эндотелиальной NOS (eNOS). Восполнение запасов L-аргинина предотвращает дальнейшее формирование у экспериментальных животных MC, нормализует уровень глюкозы, ХС общ., С-пептида, а также показатели дисфункции эндотелия - уровень NO, eNOS, iNOS и ONO2-.

Ключевые слова: метаболический синдром, нитроергическая система, дисфункция эндотелия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛ ҲАЙВОНЛАРДА МЕТАБОЛИК СИНДРОМ ШАКЛЛАНИШИДА АЗОТ ОКСИДИ ТИЗИМИ ОМИЛЛАРИНИНГ ЎРНИ

Касимова Г.З.

Андижон давлат тиббиёт институти.

✓ Резюме,

Тадқиқот мақсади: eNOS ва iNOS ферментларининг фаоллигини, қуёнларнинг қон зардобиди NO ва ONO2 ни метаболик синдромнинг шаклланиш динамикасида намоён бўлишини ўрганиш эди.

Материаллар ва тадқиқот усуллари. Тажрибалар оғирлиги 2 - 3,5 кг бўлган 40 эркак қуёнларда ўтказилди. Метаболик синдромнинг моделини яратиш учун ҳайвон овқатиға 5% сахароза эритмаси қўшилди ва ҳар куни тана вазниға 250 мг / кг дозада кристалли холестерин қўшилди. Ҳар куни ҳайвонларға тери остиға инсулин билан 0,1 бирлик / 100 г дозасида АОК қилинган. Тажрибанинг давомийлиги 2 ой.

Тажирибада қонда метаболик синдром ривожланиши билан NO тизимидаги номутаносиблик аниқланди: қон зардобиди NO, iNOS ва ONO2 таркибининг эндотелиал NOS (eNOS) ингибацияси фонида кўпайиши. L-аргинин заҳираларини тўлдириш экспериментал ҳайвонларда MS нинг шаклланишиға тўсқинлик қилади, глюкоза, ХС умумий., С-пептид даражасини нормаллаштиради, шунингдек NO, eNOS, iNOS ва ONO2. кўрсаткичлари ҳамда эндотелиал дисфункция кўрсаткичлари ўзгариши билан кечиши тасдиқланди.

Калит сўзлар: метаболик синдром, нитроергик тизим, эндотелиал дисфункция.

ROLE OF FACTORS OF SYSTEM OF OXIDE OF NITROGEN IN DYNAMICS OF FORMATION AT EXPERIMENTAL ANIMALS OF THE METABOLIC SYNDROME

Kasimova G.Z.

Andijan State Medical Institute.

✓ Resume,

Research objective - to investigate a nature of activity of ferments eNOS and iNOS, expressions NO and ONO2- in serum of blood of rabbits in dynamics of formation of a metabolic syndrome.

Stuff and research methods. Experiments are made on 40 rabbits-males, mass of a body from 2 - 3,5 kg. For building of model of a metabolic syndrome in a drinking bowl of animals added 5 % solution of Saccharose, and in a forage daily mixed crystal cholesterol in a dose of mass of a body of 250 mg/kg. An animal hypodermically introduced insulin in a dose 0,1 units/100 g, every other day. Duration of experiment 2 months.

In experiment at development of a metabolic syndrome in blood the disbalance in NO-system, associating by an expression in serum of blood NO, iNOS and ONO2-, against activity oppression of endothelial NOS (eNOS) is positioned. Completion of supplies of L-arginina prevents the further formation at experimental animals MS, reduces to level of control of the maintenance in serum of blood of glucose, ChScom, S-peptide, and also dysfunction indexes of endothelium - level NO, eNOS, iNOS and ONO2-.

Key words: a metabolic syndrome, nitroergic system, dysfunction of endothelium

Актуальность

Молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе повреждения эндотелия при развитии метаболического синдрома (МС) до конца не раскрыты [1,2]. Особое место в этой проблеме занимает воп-

рос о роли взаимосвязи оксида азота (NO) с компонентами, участвующими в его синтезе и распаде [3]. Важными регуляторами концентрации NO в эндотелии сосудов и потоке крови являются составляющие NO-системы (NOS) - эндотелиальная NOS (eNOS) и индуцибельная (iNOS) [4], а также градиент кон-

центрации собственной NO и его связь с другими соединениями, в частности, с анион - супероксидом (O₂⁻) [5,6]. Возможно, что от содержания этих компонентов во многом зависит не только уровень NO в крови, но и чувствительность рецепторных структур эндотелия сосудов, адекватность их реакций на действие различных по природе патогенных факторов, присутствующих в системном и межтканевом кровотоке. Можно также предположить, что от уровня отдельных компонентов NO-системы зависит метаболический эффект NO, его негативное влияние на процессы белкового, углеводного и жирового обмена. Однако активность компонентов NO-системы при развитии MC недостаточно изучена. Поэтому мы решили исследовать характер активности ферментов eNOS и iNOS, экспрессии NO и ONO₂- в сыворотке крови кроликов при формировании метаболического синдрома.

Цель исследования: исследовать характер активности ферментов eNOS и iNOS, экспрессии NO и ONO₂- в сыворотке крови кроликов при формировании метаболического синдрома.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 40 кроликах-самцах, массой тела 2 - 3,5 (средняя масса 2,55±0,814) кг. Метаболический синдром вызвали, ежедневно добавляя в поилку животных 5%-ный раствор сахарозы, а в корм - кристаллический холестерин в дозе 250 мг/кг массы тела. Животным подкожно вводили инсулин в дозе 0,1 ед./100 г, через день. Продолжительность эксперимента 2 месяца. Были определены 3 группы животных. Каждой из них за 10 суток до планируемого конца эксперимента ежедневно внутривенно вводили водный раствор: 1-ой - L-аргинин 50 мг/кг (Тивортин Юрия Фарм, Украина), 2-ой - неселективный ингибитор eNOS L-NAME (Mw-nitro-L-Arginin Methyl Ester; Sigma, USA) 5 мг/кг, 3-ей - селективный ингибитор индуцибельной NOS (iNOS) -S-MT (S-Methylisothiourea; Sigma, USA) 1 мг/кг. Назначение модуляторов L-аргининового NO-синтазного окисления - L-аргинина, eNOS, iNOS позволяет определить вклад отдельных составляющих NO системы в изменении уровня NO и его соединения ONO₂- при развитии MC [7, 8]. Контролем служили данные полученные от интактных (контроль 1) и животных, получавших - плацебо (вместо инсулина, холестерина и 5%-ной сахарозы животным подкожно вводили стерильную дважды дистиллированную воду, а в поилки добавляли водопроводную воду (контроль 2)).

В сыворотке крови (1,5 мл из краевой вены уха кроликов) изучали содержание NO по его основным стабильным метаболитам - NO₂- и NO₃- - по методу П.П.Голикова и соавт. [10], активность eNOS - по В.В.Сумбаевой, И.М.Ясинской [8], активность iNOS и концентрацию пероксинитрита (ONO₂-) - по М.Ю.-Равасовой, Е.Н.Чуян [11].

Содержание общего холестерина (ХСобщ) определяли с помощью набора химреактивов фирмы "Берлингер Маннгейм" (Германия) на спектрофотометре СФ-46 (Россия) при λ-500 нм. Инсулинорезистентность оценивали по содержанию С-пептида, который синтезируется β-клетками поджелудочной железы и секретируется в кровь в количестве, эквивалентном инсулину. Содержание глюкозы и С-пептида определяли на биохимическом анализаторе Daytona фирмы "Randox"

(Великобритания) с использованием специальных наборов и программы. Исследование проводили через 20, 40 и 60 суток от начала эксперимента.

Опыты проводили в соответствии с международными нормами, принятыми при работе с экспериментальными животными. Результаты исследования обрабатывали с помощью прикладных программ Statistica 6, Biostat. Данные представлены в виде средних арифметических значений (М) и стандартных отклонений (m). Для сравнения выборок применяли t-критерий Стьюдента или парный критерий Вилкинсона. Уровень значимости считали достоверными при P<0,05. Взаимосвязь нескольких переменных выявляли с помощью корреляционного анализа методом подсчета коэффициента корреляции Спирмена.

Результат и обсуждение

Исследование показало, что у животных с увеличением сроков патофизиологической модели MC в сыворотке крови линейно возрастает содержание глюкозы, ХСобщ и С-пептида (табл.) - важных показателей, характеризующих степень нарушения углеводного и жирового обменов, снижение чувствительности тканей к инсулину - инсулинорезистентность (ИР). О снижении ИР у животных с MC свидетельствует высокий уровень аналога инсулина С-пептида - в 1,2; 1,3 и 1,2 раза, соответственно через 20, 40 и 60 суток и глюкозы - в 2; 2,2 и 3,5 раза. Оказалось, что динамичное повышение в сыворотке крови NO ассоциируется с угнетением фермента eNOS, индукцией скорости реакции фермента iNOS и экспрессией концентрации ONO₂-. Можно полагать, что экспрессия NO, усиливающаяся с увеличением сроков опыта, обусловлена индукцией iNOS и увеличением концентрации ONO₂-, так как активность eNOS была существенно снижена. Следует отметить, что гиперэкспрессия NO вследствие индукции iNOS может быть связана с увеличением содержания ONO₂-. Его уровень возрастает в условиях гипоксии и образования супероксид-аниона O₂⁻, который окисляет NO [4, 6]. О развитии гипоксии в наших опытах свидетельствует увеличение содержания ХСобщ. при недостатке в крови молекулярного кислорода: в 1,7-2,5 раза.

Следовательно, в развитии MC у экспериментальных животных, видимо, важным фактором является инициация NO, обусловленная индукцией iNOS, экспрессией ONO₂- и угнетением активности eNOS.

Модулятор L-аргинина и ингибиторы мы вводили животным чтобы определить роль каждой составляющих NO -систему в развитии MC. Результаты исследования показали, что после введения L-аргинина (1-я группа) практически нормализовалось содержание глюкозы, ХСобщ. и С-пептида. Одновременно в сыворотке крови животных с MC достигли значений контроля уровень NO, активность eNOS и iNOS, содержание ONO₂-. К концу эксперимента, т.е. уже при выраженно развивающемся MC они были в пределах контроля. На этом основании можно сделать вывод о том, что, видимо, важным фактором развития MC у животных является недостаток L-аргинина, так как наряду с нормализацией показателей NO-системы, наблюдалось улучшение параметров, характеризующих состояние MC. Возможно, что восполнение запасов L-аргинина активизирует eNOS и вследствие этого эффективно утилизирует базальный уровень NO, угнетает активность iNOS и, соответственно, ONO₂-.

Наше предположение подтверждается результатами, полученными во 2- и 3-ей группах. Во 2-ой группе блокирование в NO-системе eNOS ингибитором L-NAME характеризовалось еще большим, динамичным повышением показателей, характеризующих состояние MC у животных - гиперэкспрессией NO, ONO2- и iNOS (к концу эксперимента - в 10, 17 и 8 раз) на фоне 8-разового угнетения eNOS. Неселективный ингибитор также оказал никакого влияния на содержание глюкозы, XСобщ. и С-пептида.

При введении S-MT - селективного ингибитора iNOS отчетливо улучшались все исследуемые показатели, но не до уровня контроля, т.е. они не нормализовались. Чтобы выяснить, за счет каких факторов в сыворотке крови животных повышается уровень глюкозы, XСобщ. и С-пептида мы после окончания эксперимента (через 2 мес.) определили корреляционную связь между этими показателями и параметрами NO-системы. Было установлено, что в этот период показатели, характеризующие состояние MC, а также активность NO-системы максимально нарушены по сравнению с контролем. Высокие показатели NO, iNOS и ONO2- прямо коррелировали с высоким содержанием глюкозы, XСобщ. и С-пептида ($r=0,84-0,88$, $P<0,001$), а сниженная активность eNOS, наоборот, имела сильную обратную корреляционную связь с глюкозой, XСобщ. и С-пептидом ($r = -0,83; 0,81$ и $0,87$, $P<0,001$).

Корреляционная зависимость между состоянием MC и напряженностью NO-системы еще больше увеличилась у животных, которым вводили препарат L-NAME $r = 0,88-0,96$ и $r = 0,95 - 0,96$ ($P<0,001$), соответственно срокам исследования. Назначение L-аргинина и S-MT животным с MC выявило обратную связь между показателями NO, iNOS и ONO2- ($r = -0,77-0,76$, $P<0,001$) и прямую - eNOS ($r = 0,80-0,79$, $P<0,001$) и показателей глюкозы, XСобщ. и С-пептидом.

Таким образом, мы определили важную причину развития MC - недостаток в организме животных L-аргинина. Активность eNOS, iNOS, содержание NO, ONO2- после препарата S-MT не только нормализовалась, но и продолжалась ухудшаться. Наибольшее нарушение этих показателей выявлено при блокировании eNOS - L-NAME. Аналог же L-аргинина на протяжении всего исследования стабильно восстанавливал все изучаемые показатели до нормы. На важность L-аргинина в механизмах регуляции обмена глюкозы, XСобщ. и активности С-пептида указывает изменение полярности корреляционной связи между показателями NO-системы и системой развития MC - вместо ожидаемой положительной связи, которая наблюдалась у животных с MC и при назначении селективного блокатора eNOS - L-NAME, обратное значение. Можно полагать, что снижение активности eNOS вызвано двумя факторами - уменьшением в организме животных L-аргинина и высокой экспрессией iNOS. С другой стороны, снижение L-аргинина ведет к угнетению eNOS. Адекватной реакцией эндотелия, видимо, является запуск резервного механизма, в том числе активизация iNOS, вследствие чего накапливаются сверхвысокие концентрации NO и ONO2-. С последними, как показывают исследования последних лет [5, 11] связывают развитие воспалительных реакций в эндотелии сосудов, усиление их чувствительности к биологически активным соединениям, повреждение органов и систем, ответственных за гемостаз в организме.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в динамике формирования MC важным фактором выступает недостаточность L-аргинина, которая обуславливает угнетение активности eNOS, экспрессию NO, iNOS и ONO2- с которыми связано повышение в крови глюкозы, XСобщ. и активация процесса ИР.

Выводы

1. Формирование метаболического синдрома у экспериментальных животных вызывает дисбаланс в NO-системе: увеличение в сыворотке крови содержания NO, iNOS и ONO2- на фоне угнетения активности эндотелиальной NOS (eNOS).

2. Выявлена корреляционная зависимость показателей, характеризующих развитие метаболического синдрома (гипергликемия, инсулинорезистентность, гиперхолестеринемия): сильная прямая ($r>0,8$) - от показателей дисфункции эндотелия (NO, iNOS и ONO2-) и сильная обратная ($r>-0,8$) - от сниженной активности eNOS.

3. В механизмах нарушения NO-системы важное место занимает недостаточность L-аргинина.

4. Восполнение запасов L-аргинина останавливает дальнейшее формирование метаболического синдрома у экспериментальных животных, нормализует в сыворотке крови содержание глюкозы, XСобщ., С-пептида, а также исходно нарушенные показатели эндотелия - уровень NO, eNOS, iNOS и ONO2-.

СПИСОК ЛИТЕРАТУР:

1. Джериева И.С., Волкова Н.И., Рапопорт С.И. Мелатонин и метаболический синдром: существует ли связь? //Тер.арх. 2012; 10: 109-112.
2. Митрофанов И.М., Селятицкая В.Г., Николаев Ю.А., Лутов Ю.В. Распространение метаболического синдрома в организованной популяции //Клин.мед. 2012; 11: 47-50.
3. Тепляков А.Т., Болотская Л.А., Вдовина Т.В., Степачева Т.А., Кузнецова А.В. Особенности клинико-иммунологических нарушений у больных ишемической болезнью сердца, сочетающейся с метаболическим синдромом, и модулирующее влияние небивалола для их коррекции //Тер.арх. 2008; 12: 44-52.
4. Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови. М.: "Медицина". 2011; 200.
5. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства //Тер.арх. 2005; 1: 82-87.
6. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Пат.физиол. 2011; 1: 3-19.
7. Тюренков И.Н., Воронков А.В. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте //Экспер. и клин. фармакол. 2008; 71(1): 49-51.
8. Белкина Л.М., Смирнова Е.А., Терехина О.Л., Круглов С.В., Бойчук Е.С. Роль оксида азота в патогенезе аллоксанового диабета //Бюлл.экспер.биол. и мед. 2012; 154(11): 555-558.
9. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях // Пат. физ. и эксп. тер. 2000; 2: 6-9.
10. Сумбаев В.В., Ясинская И.М. Влияние ДДТ на активность синтеза оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс //Совр. пробл. токсикол. 2000; 3: 3-7.
11. Раваева М.Ю., Чуян Е.Н. Изменение активности синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения //Серия "Биология, химия". 2011; 24(63): 4. 200-210.

Поступила 09.08. 2019