

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 577.3
©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Е.Н.Бургова¹, А.В.Мурашко², Л.Е.Мурашко², В.А.Серезенков¹, А.Ф.Ванин¹

¹Институт Химической Физики им.Семенова РАН, Москва, 119991, ул.
Косыгина,4; тел.:9397551, 9397196

² Российский Центр Акушерства, Гинекологии и Перинатологии РАМН, 117513;
факс: (095) 938-21-56 Москва, ул. Академика Опарина, 4;
эл.почта: mikoyan@center.chph.ras.ru;

Методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (-196°C) измеряли количество оксида азота, выделяемое в тканях органов беременных мышей (печени, почках, плаценте), используя специфическое связывание NO с Fe-дителиокарбаматными комплексами (Fe-ДЭТК) с образованием парамагнитных моонитрозильных комплексов железа (МНКЖ). В зависимости от сроков беременности (первый и третий триместр) количества NO были повышенными. Введение животным субстрата NO-синтаз (L-аргинина) практически не оказывало значительного воздействия на эндогенную продукцию NO. Однако количество эндогенного NO резко снижалось при моделировании острой почечной недостаточности. Концентрации NO, измеренные модифицированным Fe-ДЭТК методом, оказались идентичными во всех исследованных органах мышей при острой почечной недостаточности.

Ключевые слова: ЭПР-спектроскопия, оксид азота, Cu-Zn-супероксид дисмутаза, беременность.

ВВЕДЕНИЕ. Оксид азота (NO) как сигнальная молекула имеет отношение к нормальному протеканию беременности [1], о чем свидетельствует усиленная экспрессия в тканях миометрия и плаценты NO- продуцирующих ферментов (NO-синтаз) [2] и повышение уровня продуктов окисления оксида азота - нитритов и нитратов, определяемых в моче беременных. Однако чрезвычайно слабое вазодилатирующее действие ткани изолированной плаценты как донора NO на изолированные сосуды свидетельствует о низком уровне оксида азота или его соединений. Это согласуется с оценками количества NO, определяемого в ткани плаценты различными аналитическими методами.

Несоответствие между содержанием NO-синтаз и количеством NO в плаценте может быть обусловлено необратимым связыванием последнего с различными акцепторами (например, миоглобином) или его быстрым окислением в пероксинитрит в реакции с анионом супероксида.

ОКСИД АЗОТА ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

В последнее время было показано, что негативное влияние анионов супероксида на количество NO, определяемое по его включению в парамагнитные моонитрозильные комплексы железа (МНКЖ) с дитиокарбаматами, можно в значительной степени преодолеть, вводя в клетки и ткани в качестве перехватчиков супероксида аналогичные экзогенные МНКЖ. Сопоставление интенсивности суммарных сигналов ЭПР этих комплексов в тканях, регистрируемых в биосистеме при активации, и подавлении в них ферментативного синтеза NO из L- аргинина (АВС метод [3]) позволяет оценить количество NO, произведенное в такой системе. Этот метод использован в настоящей работе для оценки количества оксида азота, синтезированного в плаценте беременных мышей. Поскольку расслабление кровеносных сосудов является важной регуляторной функцией NO (а именно с повышением кровяного давления и нарушением функции почек связаны наиболее распространенные патологии беременности человека) изучение продукции оксида азота в органах и тканях при репродуктивных процессах имеет важное значение.

МЕТОДИКА. Эксперименты проводили на белых беспородных мышках (самках) весом 18-22 г. Мышей содержали на стандартном рационе. Каждая группа включала в себя 10 животных. Для изучения продукции NO по истечении первого триместра беременности (группы 7-12), забой (стандартная декапитация под действием этиминала-натрия, введенного за 10 минут, 1 мг/на животное) производился на восьмые сутки post coitum (p.c.). Продукцию NO в третьем триместре беременности изучали по истечении 20 суток p.c. Эмбрионы (в среднем 6 на самку) не имели гистологических и морфологических отклонений от нормы. Животным из группы 14 ежедневно в течение 7 суток (с начала третьего триместра) вводили внутримышечно по 10 мг в 0,2 мл физиологического раствора L-аргинина ("Sigma", США); группе животных № 13 вводили внутримышечно физиологический раствор. Острую почечную недостаточность (ОПН) у животных (для групп 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12) моделировали путем однократного внутривенного введения 76% раствора верографина (высокоосмолярного ионогенного рентгеноконтрастного средства) в дозе 0,2 мл на животное [4]. Третьей, шестой, девятой и двенадцатой группам животных непосредственно перед инъекцией верографина внутривенно (в хвостовую вену) вводили верапамил (блокатор кальциевых каналов) в дозе 0,03 мг на животное. Контрольным (1, 4, 7, 10) группам животных вводили внутривенно физиологический раствор. Мышам из групп 17 и 20 вводили внутривенно раствор динитрозильного комплекса железа 1:2 с глутатионом, приготовленный по методике [5] из расчета 30 мкг Fe на животное за 1 час до забоя. Мышам из групп 15, 16, 18, 19 вводили в те же сроки физиологический раствор. Группам животных №№ 1,2,3,7,8,9,18,19,20 за 1 час 20 минут до забоя вводили внутривенно ингибитор NO-синтазы нитро-ω-L-аргинин ("Sigma") (3 мг на животное в 0,5 мл физиологического раствора). Животным всех групп за 0,5 часа до забоя вводили внутривенно ловушку оксида азота - раствор натриевой соли диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) в дозе 10 мг / 0,2 мл на животное. Все инъекции производились в разные места, чтобы не допустить смешивания остаточных количеств инъекционных растворов. После декапитации (этиминаловый наркоз) ткани органов животных помещали в ледяной физиологический раствор, промывали, формовали, замораживали и регистрировали при - 196°C (жидкий азот) на радиоспектрометрах ЭПР "Радиопан" и "Брукер"Е-106 трехсантиметрового диапазона, на микроволновой частоте 9,330 Гц, микроволновой мощности 5 мВт и амплитуде модуляции 0,5 мГл. Количественное определение парамагнитных центров, производилось путем двойного интегрирования этих сигналов. В качестве стандарта использовали раствор стабильного нитроксильного радикала (2,2,6,6-тетраметил-пиперидол-1-оксил). У животных в первом триместре беременности мы не регистрировали ЭПР-спектры ткани плаценты, поскольку не нашли возможности точно морфологически и гистологически разделить ткани плаценты и эмбриона за

короткий период времени (время с момента изъятия из организма до формирования и замораживания образцов не должно превышать 3-5 минут).

Полученные данные приведены в таблицах 1 - 4.

Таблица 1. Концентрации NO в тканях в третьем триместре беременности в условиях нормы и избытка L-аргинина (в нмоль/кг влажной ткани).

Группы	Контрольная	Опытная
Органы/№ групп	13	14
Печень	315±42	330±27
Почки	12,9±8.1	25,5±12
Плацента	1,41±0.75	30,9±16.3

Таблица 2. Концентрации активной формы Cu-Zn супероксид дисмутазы в плаценте в третьем триместре беременности (в усл.ед.).

Группы	Контрольная	Опытная
Органы/№ групп	13	14
Периферия плаценты	22,75±5.84	20,36±8,73
Центр плаценты	15,65±6.53	11,06±4,95

Таблица 3. Концентрации NO в тканях в норме и первом триместре беременности (в нмоль/кг влажной ткани).

Небеременные мыши

Без ингибитора (NO₂-ω - аргинина)

Группы	Контрольная	С ОПН	С ОПН и верапамилом
Органы/№ групп	4	5	6
Печень	279 ± 30	180 ± 39	351 ± 129
Почки	17.1 ± 5.1	9.0 ± 3.0	21.9 ± 9.0

С ингибитором (NO₂-ω - аргинином)

Группы	Контрольная	С ОПН	С ОПН и верапамилом
Органы/№ групп	1	2	3
Печень	0	0	60 ± 33
Почки	0	0	1.05 ± 0.12

Беременные мыши

Без ингибитора (NO₂-ω - аргинина)

Группы	Контрольная	С ОПН	С ОПН и верапамилом
Органы/№ групп	10	11	12
Печень	321 ± 27	201 ± 48	414 ± 81
Почки	16.6 ± 8.7	10.5 ± 4.5	30.6 ± 11.7

С ингибитором (NO₂-ω - аргинином)

Группы	Контрольная	С ОПН	С ОПН и верапамилом
Органы/№ групп	7	8	9
Печень	15 ± 2.19	9 ± 1.56	96 ± 27
Почки	5.7 ± 0.63	31 ± 2.25	12.9 ± 0.12

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ведерников и соавторы [2] обнаружили сравнительно небольшое количество выделяющегося NO в сосудах плаценты при высокой активности в них NO-синтаз. Это явление в третьем триместре беременности регистрировали многие исследователи [6,7] и объясняли этот факт имеющимся у самок в этот период дефицитом L-аргинина, единственного субстрата NO-синтаз. Кроме этого, американские исследователи продемонстрировали, что в случае непоступления в среду или дефицита

ОКСИД АЗОТА ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

L-аргинина эти ферменты начинают продуцировать вместо NO супероксид-анион ($\cdot O_2^-$) [8,9]. Сочетание этих малых молекул дает исключительно легко повреждающий различные ткани и ЭПР-недетектируемый ион пероксинитрита. Из литературных данных известно, что при наличии у беременных сопутствующих патологий (нефропатий различного генеза, гестозов, преэклампсий), количество выделяемых с мочой нитратов и нитритов увеличивалось, а нитратов и нитритов в крови - падало [10]. Возможно, это явление связано с образованием пероксинитрита. Поэтому для нас представляли интерес проблема "дефицита аргинина" в последнем триместре беременности и возможность влияния супероксид-анион-радикала на содержание NO в тканях. Как показал эксперимент, при увеличении количества поступающего в организм беременной самки L-аргинина, концентрация зафиксированной в тканях окиси азота увеличивается, но лавинообразного увеличения, сопровождающегося тотальным понижением кровяного давления и связыванием NO гемовым железом (комплексы нитрозо-гемоглобина, нитрозо-миоглобина и другие), мы не наблюдали. Также у самок, входивших в группу 14, мы не отмечали никаких повреждений плаценты и эмбрионов. Следует отметить, что систематическое введение L-аргинина животным существенно повышало количество NO, обнаруживаемого в почках и плаценте, не влияя на этот уровень в печени. Это повышение могло быть обусловлено как усилением ферментативного синтеза NO, так и ослаблением в этих условиях генерации оксида азота NO- синтазами. Кроме этого, повышение могло быть обусловлено изменением концентрации пероксинитрита, но этот вопрос мы будем рассматривать ниже.

Таблица 4. Концентрации NO в тканях в третьем триместре беременности (в нмоль/кг влажной ткани).

Без ингибитора (NO_2^- - ω - аргинина)

Группы	Контрольная	Опытная с ОПН	Опытная с ОПН и ДНКЖ
Органы/№ групп	15	16	17
Печень	450±90	120±43	300±63
Почки	59±37	31±5	200±49
Плацента	18±5	0	190±48

С ингибитором (NO_2^- - ω - аргинином)

Группы	Контрольная	Опытная с ОПН	Опытная с ОПН и ДНКЖ
Органы/№ групп	18	19	20
Печень	90±7	50±8	180±0.7
Почки	13±0,6	10±5	41±3.9
Плацента	0	3±0,1	60±8.3

Поскольку NO является природным медиатором расслабления сосудов, его недостаток приводит к их спастическому сокращению и повышению кровяного давления. В отличие от других органов (печени, кишечника, желудка) при острых воспалительных процессах в почках количество NO, регистрируемое в ткани органа, не увеличивается, а уменьшается [4,11-13]. Учитывая, что измеренное в почках количество NO примерно в десять раз меньше, чем в ткани печени, понижение этой концентрации значительно усложняет задачу по ее измерению. Определение концентрации оксида азота в ткани плаценты человека, проведенное нами ранее [14], показало, что содержание оксида азота в плаценте еще меньше, чем в почках, и патологии беременности (связанные с ухудшением работы почек) влекут за собой уменьшение регистрируемого в ней количества NO по сравнению с контрольной группой.

Вводя в организм животных Na-ДЭТК (в избытке), мы связываем не только имеющееся там железо и NO, но и медь из активной формы Cu-Zn-супероксид дисмутазы. Соответствующие исследования [15] показали, что связывание ионов

меди, содержащихся в ткани, в дитиокарбаматный комплекс с последующей регистрацией характерных ЭПР- спектров может служить точным аналитическим методом определения их уровня не менее точным, чем атомно-адсорбционный метод.

Нам было интересно узнать, повлечет ли за собой введение избытка L-аргинина в третьем триместре беременности изменение супероксиддисмутазного статуса мать-плод или система утилизации супероксид-анион-радикала, выработанная за два триместра беременности и имеющая значительную инерционность, не изменится при уменьшении продукции супероксида? Эксперимент показал, что при "полной загрузке" L-аргинином NO-синтазных систем (группа 15) количество активной формы Cu-Zn-супероксид дисмутазы изменяется незначительно, причем различия в концентрациях активной формы в центре и на периферии плаценты сохраняются.

Как видно из результатов эксперимента, уже в первом триместре беременности продукция NO во всех органах увеличивается. Это согласуется с данными английских и американских исследователей [16], зафиксировавших повышение активности NO-синтазы при беременности. Интересен факт превышения концентраций NO во всех органах в группах с ОПН и верапамилом над контрольными. Это свидетельствует о том, что зафиксированный уровень NO обусловлен действием кальций-зависимой NO-синтазы.

Следует отметить, что концентрация оксида азота в печени превышает концентрацию в почках как в норме, так и при моделировании ОПН. Введение блокатора кальциевых каналов верапамила не нарушает этой зависимости. Моделирование ОПН у животных влияет не только на количество выделяющегося NO у них в почках, затрагивается также и продукция NO в печени. У всех животных с моделью острой почечной недостаточности количество NO, регистрируемое в печени, снижено по сравнению с контролем, что может свидетельствовать либо о снижении продукции оксида азота NO-синтазами, либо об увеличении продукции супероксид-аниона, который переводит NO в ЭПР-недетектируемую форму.

Для того, чтобы преодолеть отрицательное действие анионов супероксида, на аддукты эндогенно продуцируемого оксида азота с Fe-ДЭТК комплексами в работе [2] было предложено вводить животным экзогенные мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ) с дитиокарбаматами. Но невозможно ввести в клетки и ткани МНКЖ с ДЭТК из-за их нерастворимости в воде, поэтому было предложено вводить в биообъекты водорастворимые динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами и последующим введением в эти объекты ДЭТК. Последний вытесняет тиолсодержащие лиганды с образованием МНКЖ-ДЭТК экзогенного происхождения. Эти комплексы (в концентрации, обозначаемой А), способны защищать эндогенно возникающие МНКЖ-ДЭТК (в концентрации, обозначаемой В) от разрушительного действия O_2^- . В результате количество МНКЖ-ДЭТК, регистрируемых методом ЭПР, будет равно $A+B-C$, где С обозначает концентрацию МНКЖ-ДЭТК, подвергшихся разрушительному действию анионов супероксида. В параллельном опыте в биообъекты вводится ингибитор NO-синтаз, подавляющий образование эндогенных МНКЖ-ДЭТК. В соответствии с этим подходом, в экспериментах без введения в биообъекты экзогенных МНКЖ-ДЭТК ("эндогенный вариант") методом ЭПР оценивалась величина $B - C$.

Результаты опытов с введением экзогенного МНКЖ-ДЭТК приведены в таблице 4 (группы 16,17, 19, 20). В соответствии с этими данными величина В в плаценте, почках и печени составляет 140; 160 и 120 нМ, тогда как величины А 130; 160 и 120 нМ. Что касается величины С, которая характеризует количество разрушенных МНКЖ-ДЭТК и, тем самым, количество анионов супероксида, вызвавших это разрушение, то она составляет соответственно 130, 130 и 0 нМ. Для сравнения, количество МНКЖ-ДЭТК, измеренное "эндогенным вариантом" метода составило соответственно для плаценты, почек и печени 0; 30 и 120 нМ.

ОКСИД АЗОТА ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Таким образом, предложенный в работе [3] метод оценки образования NO в тканях позволил резко повысить уровень определяемого количества NO (по концентрации В МНКЖ-ДЭТК) в ткани плаценты и почек. Вместе с тем никакого "выигрыша" не получается для печени. Очевидно, последнее обусловлено низким стационарным содержанием анионов супероксида, разрушающих МНКЖ-ДЭТК. Что касается плаценты и почек, повышенная генерация этих анионов, связанная, очевидно, с ОПН, приводит к разрушению значительной части МНКЖ-ДЭТК, что наиболее четко проявляется при использовании "эндогенного варианта" метода.

Анионы супероксида реагируют не только с МНКЖ-ДЭТК, но и при их большой стационарной концентрации могут, в первую очередь, дезактивировать не связанные с ДНКЖ молекулы NO с превращением последних в пероксинитрит. Тем самым может резко ослабляться физиологическое действие NO как вазодилатора, что приводит к сдвигу тонуса сосудов в сторону их констрикции и в конечном счете, к явлениям почечной гипертензии и гестозам беременности.

Вывод о низком уровне анионов супероксида в ткани печени позволяет нам рассматривать данные о количестве NO, полученном для этой ткани при использовании "эндогенного варианта" метода, как соответствующие реальной концентрации этого агента, накапливаемого в МНКЖ-ДЭТК.

Авторы приносят благодарность старшему научному сотруднику ИХФ РАН В.Д.Микояну за помощь в работе и ценные советы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 99-04-48455.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuo R.C., Baxter G.T., Thompson S.H., Stricker S.A., Patton C., Bonaventura J., Epel D. (2000), *Nature*, **406**, 633-636.
2. Vedernikov Yu., Saade G.R., Garfield R.E. (1999) *Semin. Perinat.*, **23**, 34-44.
3. Vanin A.F., Huisman A., Stroes E.S.G., de Ruiter-Heustek F.C., et al. (2001) *Free Rad. Biol. Med.*, **30**, 813-824.
4. Дзгоева Ф.У., Кутырина И.М., Иванов А.А., Бургова Е.Н., Ванин А.Ф. (1997) *Бюлл. экпер. биол. и мед.*, **124**, № 10, 396-399.
5. Malyshev I.Yu., Malugin A.V., Golubeva L.Yu. et al (1996) *FEBS Letters* **391**, 21-23.
6. Kostic M.M., Babic G.M., Djokovic Lj.M., Maletic S., Jakovljevic V.L.J. (1997) *Jap. J. Pharmacol.*, **75**, Suppl 1, 116.
7. Williams D.J., Vallance P.J.T., Spencer J.A.D., Neild G.H. and Imms F.J. (1995) *Endothelium*, **3** (Suppl.), Abstract No 330.
8. Pou S., Keaton L., Surichamorn W., Rosen G.M. (1999) *J. Bio. Chem.*, **274**, 9573-9580.
9. Xia Y., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H., Zweier J.L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6770-6774.
10. Francoual J., Audibert F., Claise C., Chalas J., Trioche P., Frydman R., Lindenbaum A. (1999), *Hyperten. Pregn.*, **18**, 229-237.
11. Raij L., Baylis C. C. (1995) *Kidney Int.*, **48**, 20-32.
12. Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Ванин А.Ф. (1994) *Биофизика*, **39**, 919-922.
13. Маеда Х., Акаике Т. (1998), *Биохимия*, **63**, 1007-1019.
14. Мурашко Л.Е., Керченко А.А., Бургова Е.Н., Ванин А.Ф. (1999), в сб. "Свободные радикалы и болезни человека", Смоленск, с.90-91.

15. *Antholine W., Mailler C., Reichling B., and Swartz H. M.* (1976) *Phys. Med. Biol.* **21**, 840-852.
16. *Weiner C.P., Lizasoain I., Baylis S.A., Knowles R.G., Charles I.G., Moncada S.* (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5212-5216.

Поступила 26.10.01.

**PECULIARITIES OF NITRIC OXIDE PRODUCTION AFTER PREGNANCY
AND EXPERIMENTAL ACUTE RENAL FAILURE.**

E. N. Burgova¹, A.V. Murashko², L. E. Murashko², V.A. Serezhenkov¹, A.F. Vanin¹

¹Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Kosygin str., 4 Moscow, 119991 Russia; fax (095) 938-21-56, e-mail mikoyan@center.chph.ras.ru

²Russian Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology RAMS, Moscow, 117513, Oparin str.

Nitric oxide production in organs of pregnant mice (liver, kidney, placenta) was measured using specific NO traps, Fe-dithiocarbamate complexes (Fe-DETC) forming with NO paramagnetic mononitrosyl iron complexes with DETC (MNIC-DETC), detected by EPR method (-196°C).

The amount of NO formed increased in dependence of the pregnancy period (from the first to the third trimesters). Addition of NO-synthase substrate, L-arginine, insignificantly influenced endogenous NO production. However, endogenous NO amount sharply decreased at experimental acute renal failure.

Key words: EPR- spectroscopy, nitric oxide, Cu-Zn superoxide dismutase, pregnancy.