

Роль оксида азота в патогенезе ишемии миокарда и сахарного диабета типа 1 у крыс разных генетических линий

Белкина Л.М., Смирнова Е.А., Терехина О.Л.,
Пшенникова М.Г., Круглов С.В., Бойчук Е.С., Салтыкова В.А.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН,
Москва, 125315, Балтийская 8; e-mail: belkinal@yandex.ru

Изучение генетических особенностей механизмов, определяющих на системном и клеточном уровне устойчивость (или уязвимость) к действию патогенных факторов — актуальная проблема патофизиологии. В связи с этим представляется перспективным изучать механизмы устойчивости к повреждающим факторам у животных с разными паттернами нейрогуморальной регуляции. В данной работе сопоставляли устойчивость к острому инфаркту миокарда (ОИМ) и к сахарному диабету типа 1 (СД1), вызванному аллоксаном, у крыс линии Август, обладающих повышенной активностью системы NO, и у крыс популяции Вистар. У крыс Август интенсивность аритмий, вызванных 10-минутной ишемией и последующей реперфузией, и смертность от острого инфаркта миокарда (ОИМ) были значительно меньше, чем у крыс Вистар. Предварительное введение блокатора NO-синтазы — N^ω-нитро-L-аргинина (L-NNA) увеличивало смертность от ОИМ у крыс Август с 20% до 50%, а у крыс Вистар с 40% до 71%. Аллоксан (130 мг/кг, п/к, однократно) вызывал гипергликемию, составлявшую у крыс Август и Вистар $27,1 \pm 3,7$ и $22 \pm 1,1$ ммоль/л ($p < 0,03$), а смертность в течение 15 дней после введения аллоксана у первых была в 2 раза, выше, чем у вторых (48% vs 26%). L-NNA полностью предотвращал смертность у крыс Август-диабетиков, а у крыс Вистар уменьшал до 13%, уровень глюкозы при этом снижался до нормы в обеих группах. Диабет увеличивал экспрессию iNOS в печени у крыс Август с 1,43 до 4,23 в ОДЕ ($p < 0,01$), а у Вистар с 0,82 до 3,0 в ОДЕ ($p < 0,01$). L-NNA снижал содержание iNOS до исходного уровня в обеих группах. Эти данные свидетельствуют о том, что повышенная смертность при аллоксановом диабете у крыс Август, по сравнению с Вистар, связана с повышенной активностью NO-системы, что говорит в пользу важной роли NO в патогенезе СД1. Таким образом, врожденная повышенная активность системы NO оказывает при ишемических повреждениях защитное действие, в то время как в условиях диабетической гипергликемии, наоборот, потенцирует развитие патологии.

Ключевые слова: оксид азота, iNOS, ишемия миокарда, аллоксановый диабет, смертность, крысы Вистар и Август

Введение

Изучение генетических особенностей механизмов, определяющих на системном и клеточном уровне устойчивость (или уязвимость) к действию патогенных факторов — актуальная проблема патофизиологии. В этой связи представляется перспективным изучать механизмы устойчивости к повреждающим факторам у животных с разными паттернами нейрогуморальной регуляции. Известно, что многие патологические процессы, такие, как ишемия миокарда и сахарный диабет сопровождаются активацией системы оксида азота (NO), которая может оказывать как защитное, так и повреждающее действие. Ряд данных свидетельствует о кардиопротекторных эффектах NO при ишемических повреждениях миокарда. Эти эффекты в значительной степени связаны с ограничением активности симпатической нервной системы [24, 26] и с активацией эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [29]. Так, у кроликов ингибирование образования NO, высвобождаемого конститутивной eNOS при инфаркте миокарда, усугубляет систолическую и диастолическую дисфункцию миокарда и увеличивает смертность.

Роль NO в патогенезе сахарного диабета изучена далеко недостаточно. Данные полученные при экспериментальном диабете типа 1, вызванном стрептозотоцином или аллоксаном, свидетельствует как об активации [8, 13, 17], так и об угнетении активности этой системы [7, 30].

Экспериментальная активация NO-системы ограничивает нарушения метаболизма, вызванные диабетом [17], что указывает на определенный дефицит NO в условиях данной патологии. Так, на аллоксановой модели диабета у крыс показано, что введение L-аргинина в значительной степени уменьшает уровень гипергликемии и дислипидемии [20], окислительного стресса [9] и ограничивает повреждение β -клеток поджелудочной железы [27].

С другой стороны, установлено, что NO, в избытке образующийся вследствие активации iNOS, при ишемии оказывает повреждающее действие на клетки миокарда в острую и хроническую стадии инфаркта, нарушая сократимость миокарда, вызывая гибель клеток путем некроза и апоптоза [10]. Показано, что при сахарном диабете NO принимает прямое участие в апоптозе β -клеток поджелудочной железы [18]. Кроме того, одним из механизмов повреждающего действия избыточного NO является его способность образовывать с супероксид анионами пероксинитриты [11], обладающие высокой окислительной активностью. Таким образом, роль NO в патогенезе диабета неоднозначна. Для изучения роли NO в развитии или в торможении патологических процессов интересно сопоставить животных разных генетических линий, отличающихся разной активностью NO-системы.

Цель данной работы состояла в изучении устойчивости к острому инфаркту миокарда (ОИМ) и к сахарному диа-

бету типа 1 (СД1), вызванному аллоксаном, у крыс линии Август, обладающих повышенной активностью системы NO, и у крыс популяции Вистар.

Материалы и методы исследования

Исследование состояло из двух основных серий.

В первой серии у крыс Август и Вистар сопоставляли интенсивность аритмий при ишемии и реперфузии миокарда и влияние блокады синтеза NO на смертность от ОИМ, создававшегося по методу Селье. Опыты проводили на крысах-самцах Вистар и Август, масса которых в сериях с ишемией и реперфузией составляла соответственно 408 ± 18 и 274 ± 4 г, а в опытах с 2-суточным ИМ — 290 ± 6 и 200 ± 16 г. Уязвимость к аритмиям изучали под нембуталовым наркозом (50 мг/кг, в/бр) в условиях острого опыта при вскрытой грудной клетке и искусственной вентиляции легких атмосферным воздухом (аппарат ВИТА-1, СССР). Кратковременную локальную ишемию миокарда вызывали путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на 10 мин, а реперфузию (5 мин) путем распускания лигатуры. Интенсивность аритмий оценивали по ЭКГ в I отведении, регистрировавшейся с помощью «Полиграфа RM-6000» (фирмы Nihon Kohden, Япония). Подсчитывали частоту и длительность экстрасистолии (ЭС), желудочковой тахикардии (ЖТ) и желудочковой фибрилляции (ЖФ). Смертность животных оценивали в течение первых 24 часов после создания инфаркта миокарда. Блокаду синтеза NO вызывали с помощью неизбирательного ингибитора NO-синтаз — N ω -нитро-L-аргинина (L-NNA; фирмы Sigma, США) в дозе 20 мг/кг (в/бр) в течение 3 дней: за 2 дня до создания ОИМ по 1 разу в день и на 3-й день — за 1,5 ч до операции. Контрольным животным вводили физиологический раствор в таком же объеме, как L-NNA.

Через 2 сут. после перевязки коронарной артерии активность NO-системы оценивали по суммарному содержанию в плазме крови стабильных метаболитов NO — нитратов и нитритов [5], отражающих содержание NO в организме [6].

На втором этапе у крыс Вистар и Август сопоставляли влияние NO на развитие острого аллоксанового диабета. Опыты проводились на крысах-самцах Вистар и Август, исходная масса которых составляла соответственно $292 \pm 7,5$ и $218 \pm 2,1$ г. Диабет вызывали однократным введением аллоксана (alloxan monohydrate, фирмы Sigma, Швейцария) в дозе 130 мг/кг, подкожно, натощак. Блокаду синтеза NO также вызывали с помощью L-NNA, но не только предварительно, как в первой серии, но и после введения аллоксана в течение последующих 6 дней. Контрольным животным вводили физиологический раствор. В сериях на крысах Вистар и Август было по 4 группы животных: контроль, контроль + L-NNA, диабет и L-NNA + диабет. Поскольку введение L-NNA контрольным животным не оказывало существенного влияния на изучавшиеся показатели, то в статье эти группы не представлены. Животных наблюдали в течение 15 дней. Для оценки тяжести диабета оценивали уровень гипергликемии с помощью глюкометра (Accu-Chek^R-Activ фирмы Roche, Германия) в капельке крови, взятой из кончика хвоста крыс, уровень кетоновых тел в моче, смертность, степень полидипсии и динамику массы животных. Степень кетоацидоза оценивали с помощью диагностических тест-полосок «Урикет-1» (Биосенсор АН, РФ).

Активность NO-системы оценивали по уровню индуцибельной NOS (iNOS) в печени методом Вестерн-блот

анализа с использованием первых кроличьих поликлональных антител к iNOS, и вторых антител Goat anti-rabbit IgG, pAb HRP conjugate, (Enzo Life Sciences International, Inc., NY, USA). Визуализацию антигенной мишени осуществляли по хемилюминесценции с использованием реактивов «ECL» («Amersham») и рентгенографической пленки («Kodac»). Количественную обработку полученных иммуноблотов проводили путем сканирования и анализа оптической плотности блотов с помощью компьютерной программы Photoshop.

Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Опыты проводили с соблюдением международных норм по гуманному обращению с экспериментальными животными.

Результаты

Аритмии и ОИМ. При оценке аритмий частота сердечных сокращений у крыс Август и Вистар до вскрытия грудной клетки составляла соответственно 423 ± 8 и 408 ± 8 уд./мин, а после вскрытия — 368 ± 18 и 396 ± 22 уд./мин. При сравнительном анализе аритмогенности ишемии и реперфузии миокарда у сравниваемых крыс разница между группами по экстрасистолии и желудочковой тахикардии была не очень значительной, а наиболее яркие различия были обнаружены в интенсивности желудочковой фибрилляции. На рис. 1. видно, что у крыс Август во время ишемии и реперфузии желудочковая фибрилляция возникает в 2–2,5 раза реже, а ее длительность во время ишемии и реперфузии меньше соответственно в 5 и в 24 раза, чем у крыс Вистар. Эти данные свидетельству-

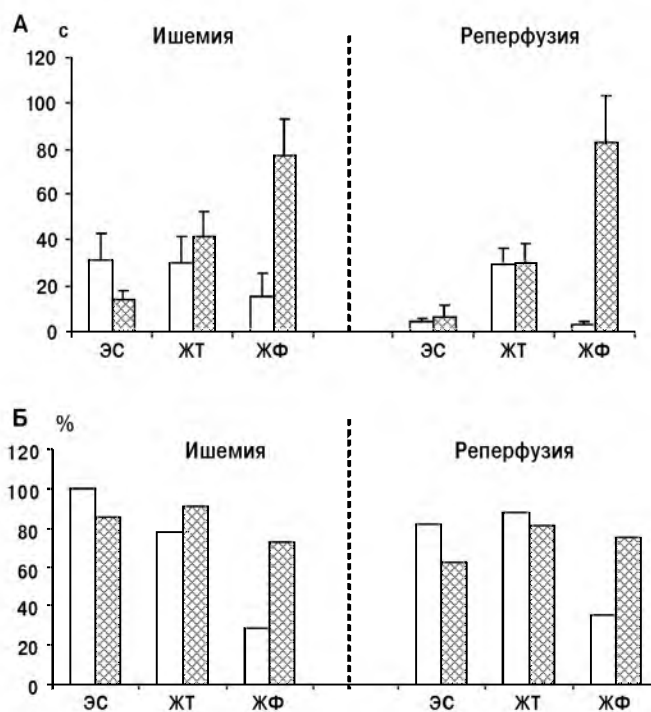


Рис. 1. Интенсивность сердечных аритмий во время ишемии и реперфузии миокарда у крыс Август (n=18) и Вистар (n=22):

А — длительность аритмий, с; Б — частота встречаемости аритмий в процентах от общего количества крыс. ЭС — экстрасистолия; ЖТ — желудочковая тахикардия; ЖФ — желудочковая фибрилляция. Белые столбики — крысы Август, а заштрихованные — крысы Вистар.

* p<0,05; # p<0,001 — достоверность различий между крысами Вистар и Август по t-критерию Стьюдента

Влияние предварительного введения L-NNA на смертность крыс Август и Вистар при остром инфаркте миокарда

Линия крыс	Серии опытов	Количество животных с ОИМ	Количество животных, погибших от ОИМ	Количество погибших животных, %
Август	Контроль	15	3	20
	L-NNA	14	6	43
Вистар	Контроль	14	7	50
	L-NNA	14	10	71

ют о большей устойчивости крыс линии Август, по сравнению с крысами Вистар, к аритмогенному действию как острой ишемии, так и реперфузии.

Из табл. 1. видно, что смертность от ОИМ в первые 24 ч у крыс Август была в 2,5 раза ниже, чем у крыс Вистар, что хорошо согласуется с более высокой устойчивостью крыс Август к аритмогенному действию ишемии миокарда. Предварительное введение L-NNA увеличивало смертность от острого ИМ в обеих сравниваемых группах животных, причем у крыс Август, получавших L-NNA, смертность от ОИМ увеличивалась в 2 раза, по сравнению с контролем, в то время как у Вистар увеличивалась на 40%, т.е. значительно в меньшей степени, чем у крыс Август.

При определении активности NO-системы выяснилось, что у контрольных крыс Август содержание нитратов и нитритов, в крови в 2 раза было выше, чем у крыс Вистар (рис. 2). Несмотря на это, при ОИМ у крыс Август активация NO-системы была выражена значительно в большей степени, чем у крыс Вистар, а именно, уровень нитратов и нитритов увеличивался соответственно на 113 и 60%.

Таким образом, данные о более высокой смертности под действием блокатора синтеза NO у крыс Август, по сравнению с крысами Вистар, свидетельствуют о том, что более высокая устойчивость у крыс Август к ОИМ в значительной степени связана с повышенной активностью NO-системы.

Аллоксановый диабет. На рис. 3 видно, что через 5 дней после введения аллоксана в обеих группах наблюдалась выраженная гипергликемия, свидетельствующая о развитии острого и тяжелого диабета. При этом у крыс Август наблюдалась более выраженная гипергликемия, чем у крыс Вистар: у первых содержание глюкозы в крови увеличивалось в 4,7 раза, а у вторых в 3,8 раза. Описанная ги-

пергликемия сопровождалась гибелью животных, причем смертность в течение 15 дней после введения аллоксана у крыс Август-диабетиков была почти в 2 раза больше, чем у крыс Вистар. Особенно значительная разница между сравниваемыми крысами в летальности наблюдалась в первые 4–5 дней после введения аллоксана, всего же за 15 дней из 25 крыс Август погибло 12 (48%), а из 15 крыс Вистар — 4 (36%). К 15 дням после введения аллоксана степень гипергликемии, резко снижалась в обеих группах, причем у крыс Вистар уровень глюкозы был близок к контрольному, в то время как у крыс Август оставался на уровне, соответствующем диабетической гипергликемии и превышал контрольные значения в 3 раза. Уменьшение гипергликемии в обеих группах через 15 дней после введения аллоксана, по-видимому, связано с тем, что инсулиновая недостаточность, возникающая в первые дни после аллоксанового удара, в следующий период нивелируется за счет повышенной активности выживших жизнеспособных β -клеток поджелудочной железы. Однако сохранение патологически высокого уровня глюкозы в этот период у крыс Август, в отличие от крыс Вистар, свидетельствует о более тяжелой форме диабета у первых. О более тяжелой форме диабета у крыс Август, по сравнению с крысами Вистар, свидетельствует также и более высокий уровень кетоновых тел в моче, который у первых был выше, чем у вторых, почти в 10 раз ($4,7 \pm 0,9$ ммоль/л vs $0,5 \pm 0,24$ ммоль/л, $p < 0,01$).

Введение ингибитора NO-синтаз значительно ограничивало развитие диабета в обеих группах, причем у крыс Август этот эффект оказался более выраженным. Как видно на том же рис. 3, ингибитор предотвращал развитие гипергликемии в обеих группах через 5 дней после введения аллоксана. Это явление сопровождалось снижением смертности, причем у крыс Август блокатор полностью предотвращал гибель животных, а у крыс Вистар смертность уменьшалась до 13%. Эти факты говорят о том, что смертность животных была связана с патологической гипергликемией, а не с побочным токсическим действием аллоксана. Важно также отметить, что степень кетоацидоза под действием блокатора синтеза NO уменьшалась у крыс Август до $1,2 \pm 0,2$ ммоль/л ($p < 0,05$). Как видно из табл. 2, в которой представлены данные о влиянии аллоксанового диабета на состояние крыс, описанная гипергликемия сопровождалась характерными для тяжелого диабета полидипсией и потерей массы тела. Через 5 дней после введения аллоксана потеря в массе тела у крыс Вистар и Август была примерно, одинаковой 14% и 10%. Гипергликемическая полидипсия была также выражена, примерно, одинаково: потребление воды увеличивалось в сравниваемых группах в 9–10 раз по сравнению с контролем. Через 15 дней животные похудели еще больше: крысы Вистар на 31%, а крысы Август на 25% по сравнению с

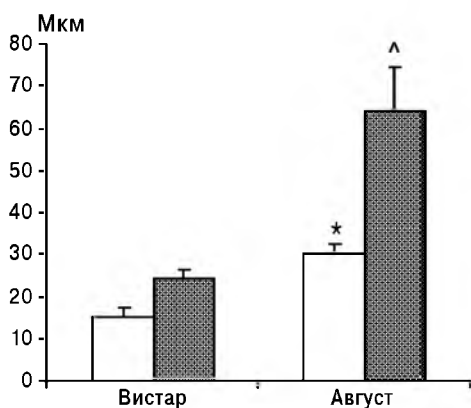


Рис. 2. Содержание нитратов и нитритов в крови у крыс Вистар и Август в контроле (светлые столбики) и с 2-суточным ИМ (затрихованные столбики). По оси ординат — Мкм. * $p < 0,001$; ^ $p < 0,001$ — достоверность различий между крысами Вистар и Август по t-критерию Стьюдента

Таблица 2

Влияние L-NNA на состояние крыс Вистар и Август (M±m) с аллоксановым диабетом

Показатели	Вистар			Август		
	Контроль (10)	Диабет (10)	L-NNA + диабет (8)	Контроль (10)	Диабет (8)	L-NNA + диабет (9)
Масса тела (г)	370±7,1	213±13 ⁺⁺⁺	261±18 ^{△△}	230±3,1	167±6,7 ⁺⁺⁺	188±4,0 [△]
Потребление воды (мл/100 г массы тела за сутки)	7,0±0,4	65±1,2 ^{!!!}	49±0,8 ^{△△△}	6,3±0,2	48±1,1 ^{!!!}	8,5±0,7 ^{△△△}
Смертность (%)	0	26	13	0	48	0

Примечание. Цифры в скобках — количество крыс в группах; ⁺ p<0,05; ⁺⁺ p<0,01; ⁺⁺⁺ p<0,001 — между крысами с диабетом и контрольными; [△] p<0,05; ^{△△} p<0,01; ^{△△△} p<0,001 — между группами диабет и L-NNA + диабет

Таблица 3

Влияние L-NNA на уровень iNOS в печени у крыс Август и Вистар с 2-недельным аллоксановым диабетом

Вид крыс	Контроль	Диабет	Диабет + L-NNA
Август (n=5)	1,43±0,14	4,23±0,14 [^]	1,05±0,6 ⁻
Вистар (n=5)	0,82±0,08 [*]	3,0±0,24 ^{^#}	1,22±0,07 [!]

Примечание. Уровень iNOS выражен в ОДЕ (относительные денситометрические единицы плотности); цифры в скобках — количество крыс в группах; ^{*} p<0,01 — достоверно между контролями; [^] p<0,001 — достоверно между диабетом и контролем; [#] p<0,01 — достоверно между крысами Август и Вистар с диабетом; ⁻ p<0,001 — достоверно между группами диабет и диабет + L-NNA

исходной массой. При введении L-NNA полидипсия у крыс Август устранялась почти полностью, а у крыс Вистар достоверно уменьшалась на 25%. В обеих группах блокатор существенно ограничивал потерю массы тела: так, отставание в массе тела от контроля у крыс Август-диабетиков и у инъецированных L-NNA составляло соответственно 28 и 19% (p<0,05), а у крыс Вистар 43 и 30% (p<0,05). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что блокада синтеза NO обладает антидиабетическим действием, ограничивая нарушения метаболизма, вызванные аллоксановым диабетом.

При определении уровня iNOS в печени у крыс с 2-недельным СД1 (табл. 3) выяснилось, что у контрольных крыс Август исходный уровень фермента выше, чем у крыс Вистар, на 74%. Диабет вызывал у тех и других крыс резкую активацию экспрессии iNOS, уровень которой у крыс Август увеличивался почти в 3 раза по сравнению с исходным, а у крыс Вистар — в 3,6 раза. Однако за счет исходной разницы по абсолютной величине у крыс Август-диабетиков уровень iNOS оказался выше на 41%, чем у крыс Вистар. Этот факт говорит о том, что у крыс Август активность iNOS выше, чем у крыс Вистар как в норме, так и при диабете. Введение L-NNA значительно снижало уровень iNOS у диабетиков обеих групп, но у крыс Август до уровня ниже исходного на 40%, а у крыс Вистар оставался более высоким по отношению к исходному также на 40%. Это означает, что L-NNA предотвратил активацию NO-системы, вызванную диабетом.

Обсуждение

Таким образом, при ОИМ повышенная активность NO-системы у крыс Август оказала положительное действие, в то время как для СД1 такая активность оказалась фактором повреждения.

Полученные нами результаты с введением L-NNA и определением уровня NO согласуются с данными о кардиопротекторном действии NO при ишемических повреждениях миокарда и свидетельствуют о том, что повы-

шенная устойчивость крыс Август к таким повреждениям, по сравнению с крысами Вистар, действительно в значительной степени связана с более высокой активностью NO-системы. Есть основание полагать, что одним из механизмов антиаритмического действия NO при ишемии является его способность ограничивать стресс-реакцию [23], а именно ограничение адренергической активации. При сопоставлении уязвимости к сердечным аритмиям данных групп животных следует также учесть и другие факторы, препятствующие развитию тяжелых аритмий. Таким фактором может быть у крыс Август свойственная этим животным пониженная адренореактивность миокарда [2], которая может ограничивать развитие аритмий, вызываемых катехоламинами. При реперфузии ишемизированного миокарда основными механизмами повреждения кардиомиоцитов и развития аритмий является резкая активация продукции кислородных радикалов, аритмогенное действие которых связано с повреждением клеточных мембран и нарушением ионного транспорта [16]. При этом в миокарде резко возрастает содержание не то-

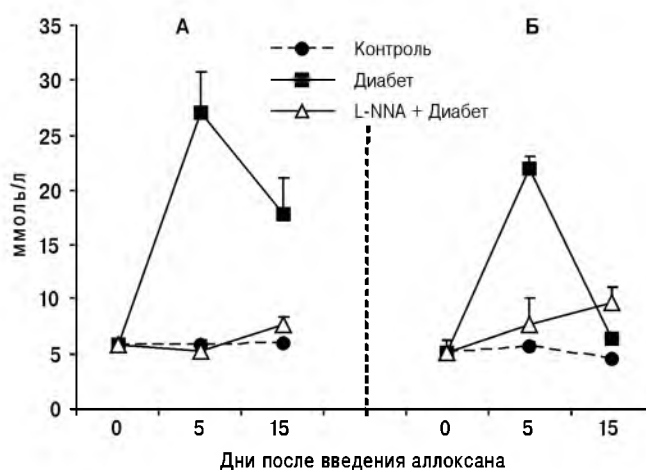


Рис. 3. Влияние L-NNA на уровень глюкозы в крови у крыс Август (А) и Вистар (Б) с аллоксановым диабетом. По оси ординат — уровень глюкозы, ммоль/л

лько реактивных кислородных радикалов, но и NO, [15] а также токсических продуктов взаимодействия NO с супероксид анионами — пероксинитритов [15], обладающих высокой окислительной активностью. В таких условиях повышенный уровень NO может оказывать не только защитное, но и повреждающее действие [15, 21]. Анализируя возможные механизмы, ограничивающие развитие фибрилляции при реперфузии у крыс Август, можно предположить, что высокий уровень NO у этих животных может способствовать погашению свободнорадикальных процессов путем взаимодействия NO с кислородными радикалами [21]. Такая возможность подтверждается данными об антиаритмическом действии доноров NO при реперфузии миокарда [3, 12]. Возможно также, что этот эффект связан со способностью NO активировать генную экспрессию антиоксидантных ферментов [22]. Вполне вероятно также, что небольшая интенсивность фибрилляции при реперфузии у крыс Август, по сравнению с крысами Вистар, связана со свойственной этим крысам повышенной активностью антиоксидантных систем [1], играющих важную роль в защите миокарда от реперфузионных повреждений [19]. Все эти генетически детерминированные особенности крыс Август, по-видимому, и обеспечивают их более высокую устойчивость к развитию летальных аритмий, по сравнению с крысами Вистар.

В случае СД1, как показывают результаты, блокада NO-синтаз оказывает противоположное, защитное, действие. Механизмы антидиабетического действия блокатора синтеза NO могут быть объяснены несколькими причинами. Известно, что аллоксан, являясь токсичным аналогом глюкозы, проникает в клетки с помощью переносчика глюкозы GLUT2 и вызывает в них активацию свободнорадикальных процессов с образованием супероксид анионов и гидроксильных радикалов, которые и вызывают гибель β -клеток поджелудочной железы [13, 14]. Очевидно, что окислительный стресс, вызванный в β -клетках аллоксаном, сопровождается также гипергликемической активацией этих процессов в организме [28]. Соответственно антиоксиданты ограничивают нарушения метаболизма при аллоксановом диабете, в том числе и повреждение бета-клеток [4, 13]. Устранение гипергликемии и снижение смертности под действием L-NNA у крыс с диабетом дает основание предположить, что данный блокатор предупреждает гибель инсулинсодержащих клеток, вызванную аллоксаном. Наиболее вероятно, что этот эффект L-NNA связан с тем, что блокатор путем ингибирования NO-синтаз препятствует избыточному образованию NO и соответственно токсичных продуктов активных форм кислорода, что, и обуславливает защиту β -клеток и организма от аллоксанового повреждения. Установлено, что одним из механизмов активации NO-синтаз при диабете опосредуется ядерным фактором транскрипции NF- κ B (nuclear transcription factor κ B) [25]. Так, на мышках было показано, что уровень NF- κ B в поджелудочной железе возрастает уже через 30 мин после инъекции аллоксана [13]. Кислородные радикалы, в избытке образующиеся при гипергликемии, активируют этот фактор [13], который, как показано, может напрямую активировать iNOS [25], что и приводит к гиперпродукции NO.

Таким образом, повышенная активность системы NO увеличивает уязвимость к диабетогенным факторам, а именно, к аллоксану. Представленные результаты, каза-

лось бы, противоречат ряду сообщений о защитном действии предшественника NO — L-аргинина при аллоксановом диабете, а также данным о том, что ингибирование синтеза NO с помощью L-NNA не уменьшает, а увеличивает гипергликемию при диабете, вызванном у крыс стрептозотоцином [17]. Анализ этих сообщений и наших данных приводит к выводу, что искусственное модулирование уровня NO в организме может привести к качественно противоположным результатам: активация NO-системы может привести и к торможению и к потенциации развития диабета, так как направленность эффектов в значительной степени зависит от индивидуального исходного уровня активности этой системы. Соответственно при дефиците NO в организме L-аргинин оказывает антидиабетическое действие, в то время как гипергликемическая активация NO-системы при ее исходно повышенной активности может увеличить тяжесть диабета. Поэтому ограничение гиперпродукции NO с помощью L-NNA у крыс Август, у которых активность NO-системы как в покое, так и при диабете выше, чем у крыс Вистар, в значительной степени и предупреждает развитие диабета. В целом же полученные результаты свидетельствуют о том, что NO играет важную роль в патогенезе аллоксанового диабета

Заключение

Таким образом, врожденная повышенная активность системы NO оказывает при ишемических повреждениях защитное действие, в то время как в условиях диабетической гипергликемии, наоборот, потенцирует развитие этой патологии.

Список литературы

1. Белкина Л.М., Лакомкин В.Л., Жукова А.Г., Кириллина Т.Н., Сазонтова Т.Г., Капелько В.И. Устойчивость сердца к окислительному стрессу у крыс разных генетических линий // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2004. — Т. 138 (9). — С. 250—253.
2. Белкина Л.М., Салтыкова В.А., Пшеничкова М.Г. Генетически обусловленные различия в устойчивости к инфаркту миокарда у крыс Вистар и линии Август // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2001. — Т. 131 (6). — С. 624—628.
3. Костюк В.А., Полохович Г.С. Влияние СОД и донора NO на нарушения сердечного ритма, вызванные реперфузией у крыс // Бюл. эксперим. биол. — 1999. — Т. 127, №2. — С. 137—140.
4. Ланкин В.З., Корчин В.И., Коновалова Г.Г., Лисина М.О., Тихазе А.К., Акмаев И.Г. Роль антиоксидантных ферментов и антиоксиданта пробуккола в антиоксидантной защите бета-клеток поджелудочной железы при диабете, вызванном аллоксаном // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2004. — Т. 137, №1. — С. 20—23.
5. Пшеничкова М.Г., Белкина Л.М., Бахтина Л.Ю., Байда Л.А., Попкова Е.В., Малышев И.Ю. Роль стресс-белков hsp70 и адренергической системы в разной устойчивости к инфаркту миокарда крыс генетических линий Август и Вистар // Рос. физиол. ж. им. И.М. Сеченова. — 2001. — Т. 87 (9). — С. 1171—1177.
6. Benjamin N., Vallance P. Plasma nitrite as a marker of nitric oxide production // Lancet. — 1994. — Vol. 344, №8927. — P. 960.
7. Celtek S., Anderson P.N., Foxwell N.A. Nitregic neurodegeneration in cerebral arteries of streptozotocin-induced diabetic rats: a new insight into diabetic stroke // Diabetes. — 2005. — Vol. 54. — P. 212—219.
8. Crespo M.J., Zalacain J., Dunbar D.C., Cruz N., Arocho L. Cardiac oxidative stress is elevated at the onset of dilated cardiomyopathy in streptozotocin-diabetic rats // J. Cardiovasc. Pharmacol. Therap. — 2008. — Vol. 13, №1. — P. 64—71.
9. El-Missury M.A., Othman A.I., Amer M.A. L-Arginine ameliorates oxidative stress in alloxan-induced experimental diabetes mellitus // J. Appl. Toxicol. — 2004. — Vol. 24, №2. — P. 93—97.

10. Feng Q., Lu X., Jones D.L., Shen J., Arnold J.M.O. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and a higher mortality after myocardial infarction in mice // *Circulation*. — 2001. — Vol. 104 (6). — P. 700–704.
11. Ferdinandy P., Danial H., Ambrus I., Rothery R.A., Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure // *Circ. Res.* — 2000. — Vol. 87 (3). — P. 241–247.
12. Gyorgy K., Vegh A., Rastegar M.A., Papp J.G., Parratt J.R. Iso-sorbide-2-mononitrate reduces the consequences of myocardial ischaemia, including arrhythmia severity: implications for preconditioning // *Cardiovasc. Drugs Ther.* — 2000. — Vol. 14, №5. — P. 481–488.
13. Ho E., Chen G., Bray T.M. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NF-kappaB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice // *FASEB J.* — 1999. — Vol. 13. — P. 1845–1854.
14. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes // *Diabetologia*. — 2008. — Vol. 51. — P. 216–226.
15. Liu P., Hock C.E., Nagele R., Wong P.Y. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats // *Am. J. Physiol.* — 1997. — Vol. 272, №5. — Pt 2, H2. — P. 327–336.
16. Manning A., Hearse D. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 1984. — Vol. 16. — P. 497–518.
17. Marec A., Peer G., Iaina A., Blum M., Wollman Y., Cserniovsky T., Silverberg D.S., Cabili S. et al. Nitric oxide in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats // *Clin. Sci. (Lond.)*. — 1996. — Vol. 90, №5. — P. 379–384.
18. McDaniel M.L., Corbett J.A., Kwon G., Hill J.R. A role for nitric oxide and other inflammatory mediators in cytokine-induced pancreatic beta-cell dysfunction and destruction // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 1997. — Vol. 426. — P. 313–319.
19. Meerson F.Z., Didenko V.V., Belkina L.M., Manukhina E.B. Cellular antioxidant defense mechanisms // *CRC Press INK*. — 1988. — P. 215–245.
20. Mendez J.D., Balderas F.L. Inhibition by L-arginine and spermidine of hemoglobin glycation and lipid peroxidation in rats with induced diabetes // *Biomed. Pharmacother.* — 2006. — Jan. — 60(1). — P. 26–31.
21. Nonami Y. The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury // *Jpn. Circ. J.* 1997. — Vol. 61, №2. — P. 119–132.
22. Nunoshiba T., de Rojas-Walker T., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Demple B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1993. — Vol. 90. — P. 9993–9997.
23. Patel K.P., Zhang K., Zucker I.H., Krukoff T.L. Decreased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in hypothalamus and brainstem of rats in heart failure // *Brain Res.* — 1996. — 734:1–2. — P. 109–115.
24. Schwarz P., Diem R., Dun N.J., Fostermann U. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves // *Circ. Res.* — 1995. — Vol. 77 (4). — P. 841–848.
25. Siebenlist U., Franzoso G., Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B // *Annu. Rev. Immunol.* — 1994. — Vol. 10. — P. 405–455.
26. Snyder S.H., Bredt D.S. Nitric oxide as neuronal messenger // *Trends Pharmacol. Sci.* — 1991. — Vol. 12 (4). — P. 125–128.
27. Vasilijevic A., Buzadzic B., Korac A. Petrovic V, Jankovic A, Korac B. Beneficial effects of L-arginine nitric oxide-producing pathway in rats treated with alloxan // *J. Physiol.* — 2007. — Vol. 5849 (Pt. 3). — P. 921–933.
28. West I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes // *Diabet. Med.* — 2000. — Vol. 17. — P. 171–180.
29. Wildhirt S.M., Suzuki H., Horstman D., Weismuller S., Dudek R.R., Akiyama K., Reichart B. Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction // *Circulation*. — 1997. — Vol. 96 (5). — P. 1616–1623.
30. Zhao G., Zhang X., Smith C.J., Xu X., Ochoa M., Greenhouse D., Vogel T., Curran C., Hintze T.H. et al. Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes // *Am. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 277, №1 (Pt 2). — H268–H278.

The role of nitric oxide in the pathogenesis of myocardial ischemia and diabetes type 1 diabetes in rats of different genetic lines

**Belkina L.M., Smirnova E.A., Terekhina O.L.,
Pschennikova M.G., Kruglov S.V., Boitchuk E.S., Saltykova V.A.**

Federal State Budgetary Institution «Institution of General Pathology and pathophysiology» of the Russian Academy of Medical Science, Russian Federation, Moscow

The study of genetic characteristics of the mechanisms that determine the resistance (or vulnerability) to pathogenic factors — the actual problem of pathophysiology. In this context, it seems promising to study the mechanisms of resistance to damaging factors in animals with different patterns of neurohumoral regulation. In this paper we compared the resistance to acute myocardial infarction (AMI) and diabetes mellitus type 1, caused alloxan, in August rats with increased activity of nitric oxide and in Wistar rats. In August rats the intensity of arrhythmias caused by a 10-minute ischemia and subsequent reperfusion, and mortality from AMI were significantly lower than in Wistar rats. Pretreatment with NO-synthase blocker — N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA) increased the mortality from AMI in August rats from 20% to 50%, and in Wistar rats from 40% to about 71%. Alloxan (130 mg/kg, s/c, single dose) caused a hyperglycaemia component in Wistar rats and August rats — 27,1±3,7 and 22± 1,1 mmol/l (p <0,03), and during 15 days after injection of alloxan in the first was 2 times higher than the second (48% vs 26%). L-NNA completely prevented mortality in diabetic August rats, and Wistar rats with diabetes reduced to 13%, while the glucose level decreased to normal in both groups. Diabetes increased the expression of iNOS in the liver of August rats from 1.43 to 4.23 in the ODU (p <0,01), while in Wistar rats from 0.82 to 3.0 in the ODU (p <0,01). L-NNA reduced the content of iNOS to the initial level in both groups. These data suggest that the increased mortality in August, compared with the Wistar is associated with increased activity of NO-system, which speaks in favor of the important role of NO in the pathogenesis of alloxan diabetes. Thus, the inherent increased activity of NO in ischemic injury has a protective effect, whereas in diabetic hyperglycemia, conversely, potentiate the development of pathology.

Key words: nitric oxide, iNOS, myocardial ischemia, diabetes mellitus type 1, alloxan, mortality, Wistar and August rats