

ИЗМЕНЕНИЕ NO-ЕРГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ЕЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

Екатерина Валерьевна Елисеева¹, Инесса Валерьевна Дюйзен², Анна Владимировна Тыртышникова¹, Елена Филипповна Романченко¹

¹ГОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Росздрава 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

²Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

В условиях экспериментальной нефрогенной гипертензии у крыс исследована гистохимическая активность синтазы оксида азота (NOS) в нейронах мозгового вещества надпочечников и установлена динамика активности фермента на фоне коррекции экспериментальной нефрогенной гипертензии β -адреноблокаторами, ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), антагонистами кальциевых каналов. Предполагается наличие NO-ергического компонента в реализации фармакологических эффектов исследованных препаратов.

Ключевые слова: надпочечник, NO-синтаза, гипертензия, гипотензивные препараты.

Несмотря на наличие большого количества гипотензивных препаратов различных классов, лечение артериальной гипертензии (АГ) остается трудной задачей, что обусловлено многообразием патофизиологических механизмов, участвующих в повышении артериального давления (АД). Одним из важнейших патогенетических звеньев в развитии АГ и формировании ее осложнений (включая структурное ремоделирование сердечно-сосудистой системы) является увеличение тонуса симпатoadреналовой системы [1, 2].

Открытие биологической роли оксида азота (NO) в нейрогенной, гуморальной и эндотелиальной регуляции АД предоставило широкие возможности для разработки новых подходов к фармакологической коррекции гипертензивного синдрома. Известно, что взаимодействие симпатoadреналовой и NO-ергической систем на разных уровнях нейроэндокринного контроля АД имеет специфические черты и может проявляться развитием как антагонистических, так и синергических модулирующих эффектов. Известно, например, что в катехоламинергических ядрах гипоталамуса, нейронах голубоватого пятна и каудальных отделов продолговатого мозга животных с синдромом артериальной гипертензии происходит активация синтеза NO; при этом ингибиторы нейрональной NOS, угнетая активность центров нейрогенного контроля АД, способствуют развитию гипотензивного эффекта [3]. Активность нейрональной NOS кардиомиоцитов потенцирует развитие β -адренергических эффек-

тов на сердце [4]. В то же время повышение АД неизменно сопровождается снижением активности NOS в эндотелии сосудов, что и определяет выраженный антигипертензивный эффект доноров или предшественников синтеза NO [5]. Механизмы влияния NO на ткань мозгового вещества надпочечников при гипертензии и проведении гипотензивной терапии до настоящего времени остаются малоизученным и противоречивыми и касаются, в основном, анализа его ингибиторных [6] либо активирующих [7] эффектов в моделях *in vitro*.

В настоящем исследовании для уточнения роли адреномедулярного NO при гипертензии и развитии антигипертензивных эффектов препаратов была использована экспериментальная модель ренопривной гипертензии. С помощью гистохимической реакции на NADPH-диафорузу у экспериментальных животных была изучена динамика активности NO-синтазы в нейронах мозгового вещества надпочечников при АГ и при использовании препаратов следующих групп: ингибиторов АПФ, β -блокаторов и антагонистов кальциевых каналов.

Материал и методы

Учитывая этический аспект производимого экспериментального исследования, мы пытались максимально сократить количество используемых в эксперименте животных, оставаясь в рамках статистически репрезентативной группы. При этом было одномоментное изучение всех органов-мишеней, которые вовлечены при формировании АГ, что устраняло необходимость повторного проведения

Елисеева Е.В. — д.м.н., проф. кафедры общей и клинической фармакологии, e-mail: yeliseeff@rbcm.ru.

Дюйзен И.В. — д.м.н., проф., ст.н.с. лаборатории фармакологии, e-mail: duval@mail.ru

Тыртышникова А.В. — ассистент кафедры общей и клинической фармакологии, e-mail: annafarm2000@mail.ru

Романченко Е.Ф. — ассистент кафедры общей и клинической фармакологии, e-mail: e_fromanch2005@mail.ru

эксперимента. В данной статье рассматривается только фрагмент всей экспериментальной работы.

Исследование выполнено на 80 белых нелинейных крысах-самцах массой 200–220 г в соответствии с Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977) и Стандартом отрасли «Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации» ОСТ 42-511-99 (утв. МЗ РФ 29.12.1998). Животных содержали в виварии в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» (от 06.04.1993), кормили в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР от 10.03.1996 № 163.

Всем животным экспериментальных групп формировали модель нефрогенной гипертензии путем введения 0,1 мл 10% раствора формалина в передний полюс правой и левой почек [8]. Преимуществами модели являются простота выполнения (не требует тяжелой полостной операции, как предусматривается при удалении почки или перевязке аорты или почечных артерий) и постепенность повышения АД, приводящего к структурным, функциональным и патологическим изменениям органов-мишеней. Систолическое АД у крыс контрольной группы до операции составляло $120 \pm 3,7$ мм рт.ст., к концу 1 недели – $128 \pm 3,4$ мм рт.ст., через 2 недели – $156 \pm 2,7$ мм рт.ст., через 4 недели – $181 \pm 5,2$ мм рт.ст. и сохранялось на высоком уровне до 8 недели эксперимента. Измерение АД у экспериментальных животных проводили ежедневно в утренние часы с помощью устройства для неинвазивного мониторинга АД Medlab –U/4c 501 (Китай).

В 1 группу были включены животные (группа АГ), не получавшие лекарственных препаратов. Начиная с 28 дня после операции, животным 2–4 групп проводили фармакологическую коррекцию: крысам 2 группы ежедневно вводили внутримышечно β -блокатор пропранолол (2 мг/кг), 3 группы – внутривенно ингибитор АПФ эналаприлат (0,3 мг/кг/6 часов), 4 группы – внутримышечно антагонист кальциевых каналов верапамил (0,1 мг/кг). Животных выводили из эксперимента на 7, 14, 28 и 42 сутки после начала фармакологической коррекции (по 5 крыс в каждой точке). В качестве контроля использовали 5 ложнопериоперированных крыс, которым аналогичным способом в почки вводили физиологический раствор. Изучение состояния NOS проводилось на серийных продольных срезах надпочечников с помощью гистохимического метода, предложенного Норе [9]. Исследуемый материал в течение 4 часов фиксировали в охлажденном, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) 4% растворе параформальдегида, затем сутки промывали при той же температуре в 30% забуферном растворе сахарозы.

Из замороженных в криостате образцов изготавливали срезы надпочечников толщиной 25 мкм и помещали в среду, состав и конечная концентрация которой были следующими: 50 мМ трис-буфер (рН 8,0), 1 мМ NADPH (Sigma, США), 0,5 мМ нитросинего тетразолия (Sigma, США) и 0,2 % тритона X-100 (ICN, США). Инкубацию проводили в течение 30 мин при 37 °С, после чего срезы ополаскивали в дистиллированной воде, обезвоживали по стандартной методике и заключали в бальзам.

Количественную оценку плотности преципитата проводили с использованием видеокомпьютерной системы, смонтированной на микроденситометре Vickers M-85 (Vickers Instruments Ltd., UK). Цифровую обработку изображения проводили с помощью программ Adobe Photoshop 7.0 и ImageJ. Активность фермента выражали в условных единицах оптической плотности (ЕОП), плотность распределения гистохимически-позитивных структур выражали числом клеток на 5 мм² ткани, число NADPH-d-позитивных нейронов – в % по отношению к общему числу нейронов в параллельных срезах, окрашенных по Нисслю.

Для статистической обработки результатов использовали пакеты прикладных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel 97. Анализ полученных данных проводили методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической величины (M) и среднеквадратического отклонения (σ), относительной величины (P), ошибки средних арифметических и относительных величин (m). Оценку значимости различий двух независимых и зависимых совокупностей выполняли с помощью критерия Стьюдента (t), показателя вероятности различий (p).

Результаты и обсуждение

Мозговое вещество надпочечников представляет собой нервный ганглий, в котором локализируются хромаффиноциты и локальные интернейроны. Хромаффинные клетки мозгового вещества синтезируют катехоламины – эpineфрин, норэpineфрин и дофамин, которые депонируются и выделяются в кровотоки. Медуллярные интернейроны имеют различный химический фенотип и выполняют в ганглии модулирующую роль в отношении секреторной активности хромаффинных клеток и параметров внутриорганного кровотока [10].

В мозговом веществе надпочечников контрольных животных при постановке реакции на NADPH-диафорузу выявлялась небольшая популяция нервных клеток, одиночные или сгруппированные в пучки нервные волокна, единичные хромаффиноциты мозгового вещества, а также фрагменты микроциркуляторного русла. Нейроны отличались от диафоруза-позитивных хромаффинных клеток значительно более высоким уровнем гистохимической активности и мультиполярной формой клеточных тел, от которых отходили 2–5 первичных отростков. Плотность расположения нейронов в срезе площа-

дью 5 мм² достигала $2,88 \pm 0,21$, что составляло 72 % от общего числа нейронов, окрашенных по Нисслю. Гистохимическая активность диафоразы-позитивных клеток равнялась $101,88 \pm 2,1$ ЕОП.

При формировании экспериментальной ренопривной гипертензии (группа АГ) динамика активности NO-синтазы носила фазовый характер и проявлялась в изменении как числа позитивных нейронов, так и показателей их гистохимической активности (рис. 1). Наиболее выраженные изменения в состоянии фермента регистрировались к концу 1 недели эксперимента. В этот период у крыс группы АГ происходило статистически достоверное ($p < 0,001$) повышение активности NADPH-диафоразы и числа NO-позитивных нейронов (до 95 % от общей популяции нейронов). Увеличение активности фермента в нейронах сопровождалось и активацией биосинтетических процессов в их отростках, которые в мозговом веществе животных с АГ формировали густую фибриллярную сеть. На препаратах не всегда удавалось проследить связь нервных волокон с телом нейрона, поэтому мы не исключали, что в состав NADPH-d-позитивного нейропиля входят не только локальные аксоны, но и проводники преганглионарных нейронов.

Начиная со 2 недели, число NO-позитивных нейронов постепенно уменьшалось. Максимального снижения количество NO-позитивных нейронов (в 2 раза по сравнению с контрольной группой) достигло в конце 4 недели развития гипертензии, показатели их гистохимической активности, приобретая тенденцию к снижению, оставались выше контрольного уровня. Параллельно с этим у экспериментальных животных были зафиксированы стабильно высокие показатели системного систолического АД — до 180 мм рт.ст.

Повторный всплеск NO-ергической активности адреномедуллярных нейронов был зафиксирован на 6 неделе эксперимента и сопровождался

увеличением численности NO-позитивных нейронов (до $4,0 \pm 0,47$) при сохранении близких к контрольному уровню значений их гистохимической активности.

Введение экспериментальным животным лекарственных препаратов, сопровождаясь развитием антигипертензивного эффекта, изменяло динамику биохимической реакции NO-ергических нейронов мозгового вещества надпочечников на развитие артериальной гипертензии. При этом NO-ергический «ответ» нейронов при использовании препаратов различных групп имел специфические черты, приводя к уменьшению числа NO-позитивных нейронов, их гистохимической активности или сочетанной реализацией обоих этих изменений. Так, у крыс 2 группы на первой неделе введения пропранолола наблюдалось статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение количества NO-позитивных нейронов; одновременно уменьшалась и активность фермента по сравнению с крысами контрольной группы и животными группы АГ. В дальнейшем, на 4–6 неделе коррекции пропранололом активность NADPH-диафоразы в NO-позитивных нейронах возрастала до $104,75 \pm 5,02$ ЕОП, хотя популяция активных клеток не превышала 29 % от общего числа интернейронов ганглия (рис. 2 а, б).

В группе животных, получающих эналаприлат, на 1–2 неделе коррекции количество NO-позитивных нейронов снизилось до 38 % от контрольных значений, уменьшилась и активность NADPH-диафоразы в них. В дальнейшем, в течение 4–6 недель коррекции эналаприлатом, наблюдалось постепенное увеличение количества нейронов до 54 % и их активности до $92,01 \pm 2,67$ ЕОП (рис. 2 а, б).

Наиболее выраженное NO-ингибирующее действие было характерно для верапамила на 2 неделе его применения (рис. 2 а, б). В надпочечниках животных 4 группы в течение всего периода коррекции количество NADPH-d-позитивных нейро-

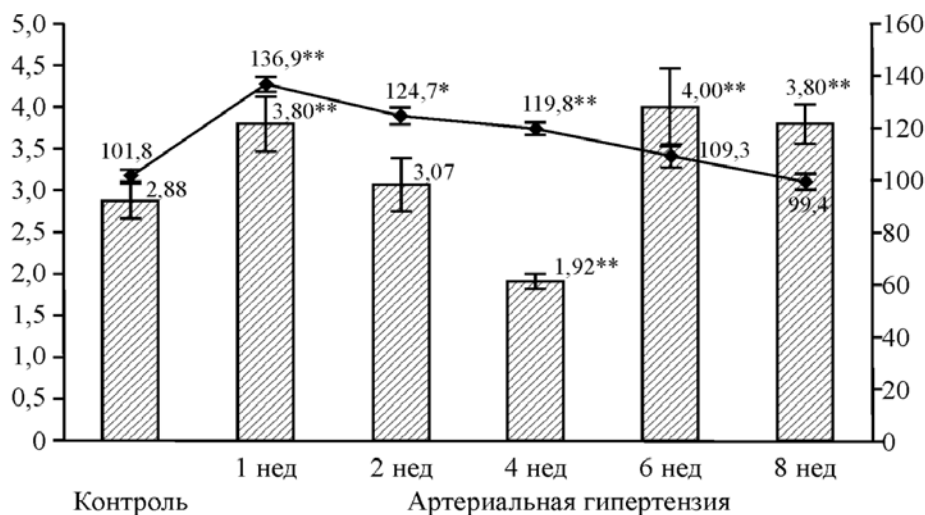


Рис. 1. Динамика числа (■, левая шкала) и активности (—, правая шкала) NO-позитивных нейронов мозгового вещества надпочечников крыс с моделью экспериментальной ренопривной гипертензии (** — отличие от контроля достоверно при $p < 0,0001$)

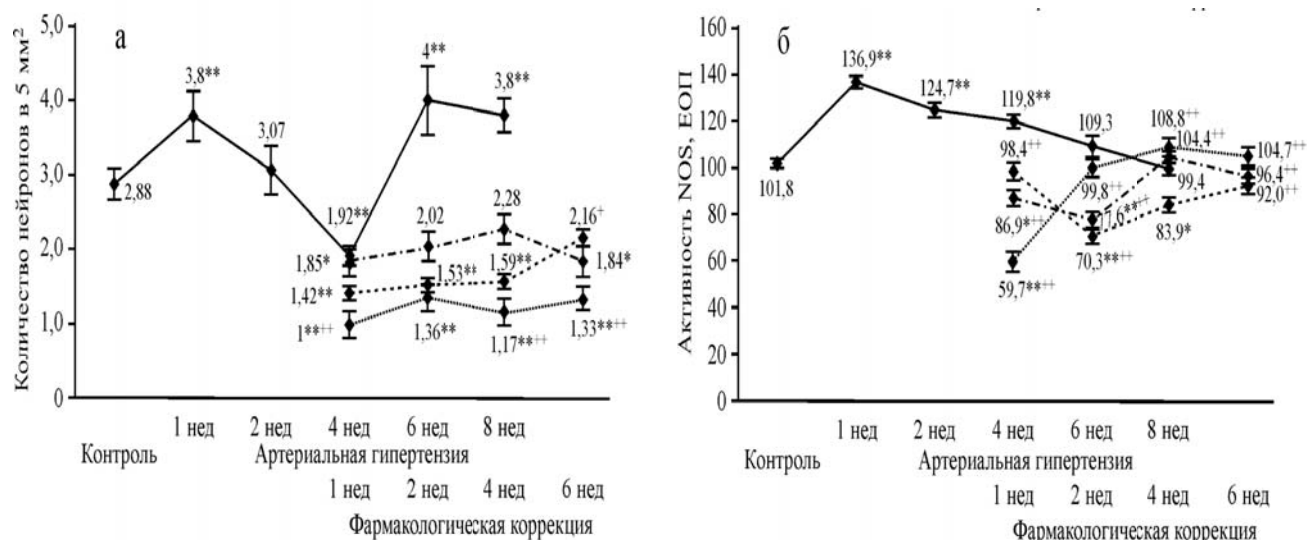


Рис. 2. Динамика количества NO-позитивных нейронов мозгового вещества надпочечников (а) и активности NOS в нейронах (б) у крыс с моделью экспериментальной гипертензии (—) и при введении препаратов гипотензивного действия эналаприла (---), пропранолола (....), верапамила (---); отличие от соответствующего показателя в контроле достоверно: * — при $p < 0,05$, ** — при $p < 0,0001$; отличие от соответствующего показателя на 4 нед. гипертензии без фармакологической коррекции достоверно: + — при $p < 0,05$, ++ — при $p < 0,0001$

нов было примерно в 3 раза меньше контрольного уровня и в 2 раза меньше аналогичного показателя у животных с АГ на данном сроке наблюдения.

До настоящего времени в литературе нет единого мнения относительно направленности эффектов NO на синтез и высвобождение катехоламинов. Ряд исследователей обосновывают стимулирующее влияние самого NO, его доноров или предшественников на уровень продукции биогенных моноаминов в мозге [11], симпатических ганглиях [12] и надпочечниках [13]. Другие авторы подтверждают симпатотонизирующее действие NO [14] либо вообще отрицают участие NO в модуляции хромоафинной ткани [15]. Такая неоднозначная ситуация, очевидно, определяется разными условиями проведения эксперимента, сроками наблюдения и выбором экспериментальной модели. Не исключено также, что ингибирующие эффекты NO реализуются при совместной локализации NOS и тирозингидроксилазы в одном нейроне [14] или под влиянием эндотелиальной NOS [4], в то время как симпатотонизирующее действие NO проявляется при его ретроградном или антероградном влиянии на мишень [11, 13].

По данным [15, 16], в мозговом веществе надпочечников NADPH-диафораза маркирует исключительно NOS-позитивные структуры, к числу которых относятся собственные медулярные интернейроны и пресинаптические волокна. NO-ергические нервные элементы на наших препаратах богато иннервировали мозговое вещество надпочечников, формировали многочисленные варикозные утолщения на телах NADPH-d-негативных хромоафинных клеток. Это позволяло предполагать, что высвобождаемый ими NO принимал уча-

стие в модуляции секреторной активности катехоламинергических клеток в норме, при патологии и ее фармакологической коррекции.

В настоящем исследовании было установлено, что повышение АД у крыс с повреждением паренхимы почек сопровождается динамическими изменениями NO-ергической активности нейронов мозгового вещества надпочечников. В развитии изменений NO-ергической активности можно выделить три периода. Первая фаза повышения активности фермента, очевидно, определялась региональной травмой и сопровождалась увеличением как числа NADPH-d-позитивных нейронов, так и показателей их гистохимической активности. Ко второму периоду, длящемуся до конца 4 недели, когда происходило последовательное уменьшение обоих этих показателей, мы склонны относить развитие компенсаторной реакции со стороны нейромедиаторных систем мозгового вещества надпочечников. В течение последующих 4 недель формирование гипертензивного синдрома сопровождалось активацией NO-ергической популяции медулярных нейронов, хотя их гистохимическая активность сохраняла тенденцию к снижению. Наиболее выраженное торможение NO-ергической активности медулярных интернейронов зафиксировано нами при использовании антигипертензивных препаратов. Все использованные в эксперименте средства из различных фармакологических групп (β -адреноблокаторы, ингибиторы АПФ и блокаторы Са-каналов) развивали антигипертензивное действие на фоне динамического, дифференцированного и селективного угнетения активности синтеза NO в этих клетках. В литературе антигипертензивные эффекты пре-

паратов связывают преимущественно с активацией синтеза NO в эндотелии сосудов [17]. Мы также наблюдали экспрессию NO-синтазы в артериях мышечного и эластического типа, а также в некоторых ядрах головного мозга при использовании данных препаратов (собственные неопубликованные данные). Не исключено поэтому, что описанные в настоящей работе эффекты обусловлены спецификой функционирования внутриклеточных сигнальных каскадов в нервной ткани мозгового вещества надпочечников или возникают вторично за счет изменения нейромедиаторного баланса в пресинаптических нервных цепях.

Заключение

При патологии сердечно-сосудистой системы большое значение имеют изменения метаболической активности клубочковой и пучковой зон коры надпочечников, а также клеток хромаффинной ткани мозгового вещества. В совокупности эти элементы, а также модулирующие их нейроэндокринные механизмы формируют сложную разветвленную систему регуляции артериального давления. В настоящей работе установлено, что развитие экспериментальной АГ сопровождается реакцией со стороны NO-ергических нейронов мозгового вещества надпочечников. Эти клетки, выполняя функции локальных интернейронов, модулируют биохимическую активность хромаффиноцитов и могут принимать участие в реализации гипотензивных эффектов. Результаты настоящего экспериментального исследования подтверждали это предположение. Таким образом, механизмы реализации NO-модулирующего эффекта препаратов различных групп, а также значение NO-ергического компонента в спектре их фармакологических эффектов нуждаются в дальнейшем изучении.

Список литературы

1. Шляхто В.В., Конради А.О. Причины и последствия активации симпатической нервной системы при артериальной гипертензии // *Consilium medicum*. 2003. 9. (3). 464–468.
2. Shlyakhto V.V., Konradi A.O. Causes and consequences of sympathetic nervous system activation under arterial hypertension // *Consilium medicum*. 2003. 9. (3). 464–468.
3. Huang P.L. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency // *Am. Soc. Nephrol.* 2000. 11. Suppl. 16. S120–S123.
4. Shaohua Ye., Nosrati S., Campese V.M. Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF) // *J. Clin. Invest.* 1997. 99. 540–548.
5. Wang H., Kohr M.J., Wheeler D.G., Ziolo M.T. Endothelial nitric oxide synthase decreases β -adrenergic responsiveness via inhibition of the L-type Ca^{2+} current // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008. 294. 1473–1480.
6. Keymel S., Malte K., Petra K. Nitric oxide in the vascular system: Meet a challenge // *Bioengineering in Cell and Tissue Research*. Eds. G.M. Artmann, S. Chien. Springer, 2008. 18. 451–468.
7. Torres M., Ceballos G., Rubio R.P. Role of nitric oxide in catecholamine secretion by chromaffin cells in the presence and absence of cultured endothelial cells // *J. Neurochem.* 1994. 63. 988–996.
8. Kumai T., Tanaka M., Tateishi T. et al. Effects of sodium nitroprusside on the catecholamine synthetic pathway in the adrenal medulla of rats // *Jpn. J. Pharmacol.* 1998. 77. (3). 205–210.
9. Тищенко О.В., Елисеева Е.В., Мотавкин П.А. Значение оксида азота в развитии гипертрофии сердца в условиях экспериментальной почечной гипертензии // *Цитология*. 2002. 44. (3). 263–269.
10. Tishenko O.V., Eliseeva E.V., Motavkin P.A. Significance of nitric oxide in development of heart hypertrophy under experimental renal hypertension // *Tsitologiya*. 2000. 44. (3). 263–269.
11. Hope V.T., Michael G.J., Knigge K.M. et al. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 1991. 88. 2811–2814.
12. Barnes R.D., Ward L.E., Frank K.P. et al. Nitric oxide modulates evoked catecholamine release from canine adrenal medulla // *Neuroscience*. 2001. 104. (4). 1165–1173.
13. Kiss J.P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission // *Brain Res. Bull.* 2000. 52. (6). 459–466.
14. Navarro-Oliveira C.M., Vassiliev V.S., Cordellini S. The sympathetic adrenomedullary system, but not the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, participates in aorta adaptive response to stress: nitric oxide involvement // *Auton. Neurosci.* 2000. 83. 140–147.
15. Moro M.A., Michelena P., Sanchez-Garcia P. et al. Activation of adrenal medullary L-arginine: nitric oxide pathway by stimuli which induce the release of catecholamines // *Eur. J. Pharmacol.* 1993. 246. 213–218.
16. Li D., Wang L., Lee C.-W. et al. Noradrenergic cell specific gene transfer with neuronal nitric oxide synthase reduces cardiac sympathetic neurotransmission in hypertensive rats // *Hypertension*. 2007. 50. 69–74.
17. Marley P.D., McLeod J., Anderson C. et al. Nerves containing nitric oxide synthase and their possible function in the control of catecholamine secretion in the bovine adrenal medulla // *J. Auton. Nerve System*. 1995. 54. 184–194.
18. Alm P., Larsson B., Ekblad E. et al. Immunohistochemical localization of peripheral nitric oxide synthase-containing nerves using antibodies raised against synthesized C- and N-terminal fragments of a cloned enzyme from rat brain // *Acta Physiol. Scand.* 1993. 148. 421–429.
19. Talman W.T. NO and central cardiovascular control: A simple molecule with a complex story // *Hypertension*. 2006. 48. 552–554.

DYNAMICS OF THE ADRENAL MEDULLAR NEURON NO-SYNTHASE ACTIVITY IN EXPERIMENTAL HYPERTENSION AND ITS PHARMACOTHERAPEUTICAL CORRECTION

Ekaterina Valeryevna ELISEEVA¹, Inessa Valeryevna DYUIZEN², Anna Vladimirovna TYRTYSHNIKOVA¹, Elena Filippovna ROMANCHENKO¹

¹*Vladivostok State Medical University
690002, Vladivostok, Ostryakov av., 2*

²*Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy FEB RAN
600041, Vladivostok, Pal'chevsky st., 17*

Adrenal medullar neuron's NO synthase histochemical activity has been studied in experimental rats with induced renoprive arterial hypertension. Positive NO-synthase dynamics was revealed under correction of experimental renal hypertension with β -adrenoreceptor blockers, inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE), and antagonists of calcium channels. The mechanism of antihypertensive drugs pharmacodynamics in renoprival arterial hypertension treatment was specified.

Key words: adrenals, NO synthase, arterial hypertension, antihypertensive drugs.

*Eliseeva E.V. – doctor of medical sciences, professor of chair for basic and clinical pharmacology,
e-mail: yeliseeff@rbcmail.ru*

Dyuzen I.V. – doctor of medical sciences, professor, senior of laboratory of pharmacology, e-mail: duval@mail.ru

Tyrtysnikova A.V. – assistant of chair for basic and clinical pharmacology, e-mail: annafarm2000@mail.ru

Romanchenko E.F. – assistant of chair for basic and clinical pharmacology, e-mail: e_fromanch2005@mail.ru