На правах рукописи

КОМАНДРЕСОВА ТАТЬЯНА МИХАЙЛОВНА

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ОПИОИДЕРГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ СТРЕССОБУСЛОВЛЕННОЙ ВАЗОКОНСТРИКЦИИ

03.00.13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Архангельск – 2006

Работа выполнена на кафедре медицинской биологии с курсом медицинской генетики ГОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор **Наталья Александровна Бебякова**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор **Сергей Валентинович Колмогоров**

доктор биологических наук **Ирина Михайловна Рощевская**

Ведущая организация: ГОУ ВПО « Российский государственный медицинский университет»

Защита диссертации состоится «____»_____2006 г. в_____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.191.01 при Поморском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 163045, г. Архангельск, ул. Бадигина, д.3.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Поморского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «_____» _____ 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент Н.В. Афанасенкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Стрессорные нагрузки являются важной причиной, изменяющей механизмы регуляции сердечно-сосудистой системы (Судаков К.В., 1993, Пшенникова М.Г., 2001). Экспериментальные исследования и клинические наблюдения показывают, что стрессобусловленные изменения системы кровообращения носят преимущественно прессорный характер (Пшенникова М.Г., 2000).

Большое значение в ограничении стресс-реакции играет изменение активности стресс-лимитирующих систем организма. Одной из важных стресс-лимитирующих систем организма является система опиоидных пептидов (Меерсон Ф.З., 1985, Меерсон Ф.З., 1989, Юматов Е.А., 1997).

В настоящее время установлена важная роль опиоидных пептидов в модуляции уровня артериального давления (Вальдман А.В., Медведев О.С., Рожанская Н.И., 1982, Меерсон Ф.З. и соавт., 1985, Золоев Г.К., Слепушкина В.Д., Аргинтаева Е.С., 1986, Бебякова Н.А., 1997, Маслов Л.Н. и соавт., 2004). В исследованиях, посвященных изучению опиоидергической модуляции артериального давления, авторы ограничиваются, как правило, лишь констатацией влияния лигандов опиатных рецепторов на развитие стрессобусловленных сдвигов артериального давления, либо рассматривается влияние опиоидов на центральные механизмы регуляции давления. Вопрос о влиянии опиоидов на периферический сосудистый тонус, изменение которого является одним из важнейших механизмов регуляции артериального давления, остается недостаточно исследованным. В литературе имеются лишь единичные данные, касающиеся модуляции опиоидами периферического сосудистого тонуса (Saunders W.S., 1985, Randich A., Robertson J.D., Willingham T.,1993, Маслов Л.Н. и соавт., 2002). Кроме того, клеточные механизмы влияния опиоидных пептидов на стрессобусловленные изменения периферического сосудистого тонуса изучены недостаточно.

В настоящее время в механизмах внутриклеточной регуляции тонуса кровеносных сосудов установлена важная роль оксида азота (NO), который является одним из самых мощных эндотелиальных вазодилататоров (Марков Х.М., 1996, Марков Х.М., 2001). Вместе с тем, в эндотелии сосудов обнаружены μ- и δ- опиатные рецепторы (Stefano G.B.et. al., 1998). Эти факты свидетельствуют о возможном участии NO, как эндотелиального фактора, в механизме опиоидергической регуляции периферического сосудистого тонуса. В основе этого предположения лежат также данные литературы о том, что активация μ- опиатных рецепторов морфином и другими агонистами опиатных рецепторов способна увеличивать образование NO в изолированных эндотелиоцитах (Minneman K.P., Iversen L.L., 1976, Champion H.C., Kadowitz P.J., 1998), и тот факт, что NO играет роль посредника между μ- опиатными рецепторами и гуанилатциклазой, активация которой в конечном итоге приводит к вазодилятации (Cadet P., Bilfinger T.V., Fimiani C., 2000). Однако вопрос о роли NO в механизмах опиоидергической регуляции периферического

сосудистого тонуса в условиях острого стресса не получил развернутой оценки в отечественной и зарубежной литературе. Вместе с тем, для введения опиоидных пептидов в практику профилактики и коррекции стрессорных изменений гемодинамики необходимо знание тонких механизмов опиоидергической модуляции периферического сосудистого тонуса в условиях острого стресса.

Цель и задачи исследования. Цель исследования - изучить роль оксида азота в механизме влияния активации опиатных рецепторов на стрессобусловленную вазоконстрикцию.

В ходе исследования необходимо было решить следующие задачи:

1. Выявить участие опиоидергической системы в регуляции периферического сосудистого тонуса на фоне острого стресса путем блокады и активации μ-, δ- и κ- опиатных рецепторов.
2. Изучить изменения уровня NO в условиях острого стресса на фоне активации μ-, δ- и κ- опиатных рецепторов.
3. При помощи блокады NO-синтаз установить степень участия NO в механизмах влияния активации μ-, δ- и κ- опиатных рецепторов на стрессобусловленные изменения гемодинамики.

Положения, выносимые на защиту. 1. Модуляция показателей периферического сосудистого тонуса на фоне блокады и активации опиатных рецепторов в условиях острого стресса свидетельствует об участии опиоидергической системы в регуляции тонуса сосудов при стрессе. Наибольший протективный эффект на стрессобусловленную вазоконстрикцию на протяжении всего периода эксперимента наблюдался при активации μ- опиатных рецепторов, менее выраженный - при сочетанной активации μ- и δ- опиатных рецепторов, при селективной активации δ- опиатных рецепторов был выявлен протективный эффект начиная с 15-й мин стрессирования, в то время как при активации κ- опиатных рецепторов наблюдался кратковременный протективный эффект только на 15-й мин эксперимента.

2. Активация всех типов опиатных рецепторов в условиях острого стресса сопровождалась увеличением уровня продукции NO. Наибольшее увеличение уровня продукции NO на 145,5% и на 134,0% было выявлено на фоне селективной активации μ- опиатных рецепторов при помощи DAGO, а также при сочетанной активации μ- и δ- опиатных рецепторов при помощи даларгина. Селективная стимуляция δ- опиатных рецепторов при помощи DSLET приводила к увеличению уровня продукции NO на 41,5%. При активации κ- опиатных рецепторов при помощи динорфина (1-13) наблюдалось увеличение уровня продукции NO на 66,6%. Эти факты свидетельствуют о важной роли NO в механизме протективного действия активации опиатных рецепторов на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса.

3. Изучение стрессорных изменений показателей периферического сосудистого тонуса и уровня NO в условиях блокады NO-синтаз показало, что ведущее значение в механизме протективного эффекта даларгина играет

увеличение уровня продукции NO, обусловленное изменением активности NO-синтаз. В DAGO-опосредованном протективном эффекте на стрессобусловленную вазоконстрикцию наряду с увеличением активности NO-продуцирующей системы важную роль играют и другие механизмы, не связанные с NO. В механизме протективного влияния DSLET на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса большое значение играет увеличение продукции NO, обусловленное не только изменением активности NO-синтаз, но и другими механизмами. Кратковременный протективный эффект активации κ- опиатных рецепторов на стрессобусловленную вазоконстрикцию не связан с NO-синтазной активностью.

Научная новизна работы. Впервые установлено участие NO в протективном эффекте активации μ-, δ- и κ- опиатных рецепторов на стрессобусловленную вазоконстрикцию.

Выявлено, что ведущим фактором в протективном эффекте сочетанной активации μ- и δ- опиатных рецепторов является активация синтеза NO.

В реализации протективного эффекта селективной активации μ- опиатных рецепторов на стрессобусловленные изменения периферического сосудистого тонуса наряду с активацией синтеза NO участвуют и другие вазоактивные механизмы.

В эффекте селективной активации δ- и κ- опиатных рецепторов важную роль играет изменение уровня продукции NO, не связанное с изменением активности NO-синтаз.

Результаты данного исследования будут способствовать расширению представлений о клеточных механизмах влияния стресс-лимитирующей системы опиоидных пептидов на периферический сосудистый тонус.

Научно-практическая значимость. Результаты исследования расширят представления о клеточных механизмах регуляции лигандами μ-, δ- и κ- опиатных рецепторов периферического сосудистого тонуса и внесут определенный вклад в понимание тонких механизмов регуляции периферического тонуса сосудов. Результаты исследования могут быть использованы в программе обучения студентов медицинских ВУЗов и биологических факультетов университетов в курсе физиологии сердечно-сосудистой системы. Полученные данные могут быть использованы для разработки фармакологических препаратов и методов коррекции стрессобусловленных изменений периферического сосудистого тонуса. Наиболее перспективным для разработки пептидных препаратов для регуляции периферического сосудистого тонуса в условиях острого стресса является селективный агонист μ- опиатных рецепторов DAGO.

Материалы диссертационного исследования используются в преподавании курса физиологии сердечно-сосудистой системы в программе обучения студентов Северного государственного медицинского университета на кафедре нормальной физиологии (акт внедрения от 08. 02. 2006 г.).

Диссертационное исследование выполнено в ГОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» (г. Архангельск) Федерального

агентства по здравоохранению и социальному развитию на кафедре медицинской биологии с курсом медицинской генетики при поддержке грантов РФФИ и администрации Архангельской области «Опиоидергическая модуляция стрессобусловленных изменений гемодинамики» № 03-04-96175, «Эндотелиальные механизмы опиоидергической модуляции стрессобусловленной вазоконстрикции» № 05-04-97530, гранта областного конкурса «Молодые ученые Поморья» № 14-03 «Влияние блокады опиатных рецепторов на периферический сосудистый тонус и уровень NO в условиях острого стресса».

Апробация работы. Результаты данного исследования были представлены и обсуждены на международной молодёжной конференции – «Архангельск- 2003», международной молодёжной конференции – «Экология – 2003», VI международном конгрессе «Кардиостим – 2004» (Санкт-Петербург), на 8-й Международной Пущинской школе - конференции молодых ученых Пущинского научного центра РАН – 2004 г., Коми республиканских молодежных научных конференциях «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (г. Сыктывкар, 2004, 2005, 2006), на 9-й и 10-й школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2005, 2006), на I съезде физиологов СНГ (г. Сочи, 2005).

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора научной литературы, раздела, посвященного материалам и методам исследования, глав, содержащих результаты собственных исследований и их обсуждение, а также заключения и выводов. Работа содержит 7 таблиц и 16 рисунков. Библиография включает 126 отечественных и 120 зарубежных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было проведено на половозрелых бодрствующих крысах-самцах Вистар массой 200-250 г, которые характеризуются гипертензивными реакциями на острый стресс (Кветнанский Р., и др., 1981, Хромова А.В., 2002). Всего было проведено 13 экспериментальных серий, количество животных в каждой экспериментальной серии составляло 15 особей.

Острый стресс моделировали путем иммобилизации животного в течение одного часа в камере без жесткой фиксации. Такое воздействие характеризуется наибольшими изменениями параметров сердечно-сосудистой системы, не приводящими животное к гибели (Тявокин В.В., 1975, Маркель А.Л., Осадчук А.В., 1978, Кветнанский Р. и соавт., 1981).

Для оценки тонуса периферических сосудов был применен метод тетраполярной реографии. Для снятия реовазограммы использовали многофункциональный компьютерный комплекс «Диастом-01» (Бебякова Н.А. и соавт., 2002). Тонус сосудов оценивали, используя индексы количественного анализа: индекс периферического сопротивления (ИПС) и индекс эластичности (ИЭ). Реовазограмму записывали с интервалом в 15 минут в течение всего

времени эксперимента, что позволяло в динамике проследить стрессобусловленные изменения периферического тонуса сосудов.

Для активации опиатных рецепторов использовали опиоидные пептиды, производства лаборатории «Синтез Пептидов» Кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ (рук. канд. хим. наук Беспалова Ж.Д.): неселектиный агонист μ- и δ- опиатных рецепторов даларгин (D-Ala^2- Leu^5-Arg^6-enkephalin) в дозе 0,1 мг/кг и селективные агонисты опиатных рецепторов: DAGO (H-Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol) – агонист μ- опиатных рецепторов в дозе 0,1 мг/кг; DSLET (H-Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr) - лиганд δ- опиатных рецепторов в дозе 0,1 мг/кг; динорфин 1-13 (D-Ala^2 –Leu^5-Arg^6) – агонист κ- опиатных рецепторов в дозе 0,2 мг/кг. Пептиды вводили в объеме 0,9 мл раствора Рингера внутрибрюшинно за 5 мин до начала эксперимента.

Блокаду опиатных рецепторов проводили при помощи налоксона (Варшавский фармакологический завод, Польша) – неселективного антагониста опиатных рецепторов (Головко А.И. и соавт., 2003) в дозе 0,7 мг/кг, который вводили за 15 мин до стрессирования внутрибрюшинно в объеме 0,9 мл раствора Рингера.

В качестве блокатора NO-синтаз использовали производное аминокислоты L- NG-нитро-L-аргинин (LNNA) («Sigma», США) в дозе 20 мг/кг, который вводили за 10 мин до стрессирования внутрибрюшинно в объеме 0,9 мл раствора Рингера

Животным контрольной серии вводили 0,9 мл раствора Рингера внутрибрюшинно за 5 мин до начала эксперимента.

Уровень продукции оксида азота оценивали по содержанию его стабильных конечных метаболитов - нитратов и нитритов в плазме крови ферментативным методом с помощью наборов фирмы «Labsystems» (Австрия). Учитывая, что время полувыведения нитратов и нитритов, поступающих с пищей, составляет 6 часов (Granger D.L. et al., 1996), для ограничения поступления нитратов и нитритов с пищей животные не получали корм за 12 часов до эксперимента. Статистическая обработка полученных экспериментальных данных проводилась с использованием стандартных методов биостатистики на IBM-Pentium. Достоверность отличий средних величин оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных контрольной серии на протяжении всего срока иммобилизации наблюдался достоверный стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса и снижение эластичности сосудов. К 60-й мин эксперимента ИПС возрастал на 84,3% ($p<0,001$), а ИЭ снижался на 45,6% ($p<0,001$) по сравнению с 5-й мин стрессирования (рис.1).

Для установления участия опиоидной системы в регуляции изменений периферического сосудистого тонуса в условиях острого стресса стрессобусловленные изменения тонуса сосудов оценивали в условиях

неселективной блокады опиатных рецепторов налоксоном. Блокада опиатных рецепторов приводила к более выраженному, чем в контрольной серии росту ИПС, который составил 107,2% ($p<0,001$) (рис.1-а). На фоне стрессобусловленного роста ИПС в данной серии наблюдалось достоверное снижение эластичности сосудов на протяжении всего времени эксперимента. Снижение ИЭ с 5-й по 60-ю мин составило 44,2% ($p<0,001$) (рис.1-б). Полученные в данной серии результаты доказывают участие опиатных рецепторов в регуляции сосудистого тонуса в условиях острого стресса.

Роль NO в регуляции периферического сосудистого тонуса в условиях острого стресса устанавливали при помощи введения блокатора NO-синтаз на модели острого стресса. Блокада синтеза NO приводила к увеличению ИПС по сравнению со стресс-контролем на протяжении всего времени эксперимента. Так, уже на 5-й мин стрессирования на фоне блокады NO-синтаз ИПС был на 34,5% выше аналогичного показателя в контрольной серии ($p<0,001$) (рис.1-а), а ИЭ на 5-й мин стрессирования снижался на 31,8% ($p<0,001$) по сравнению с соответствующим показателем в контроле (рис.1-б). Увеличение сосудистого тонуса в условиях острого стресса на фоне блокады NO-синтазной активности свидетельствует об участии NO в регуляции стрессорной вазоконстрикции.

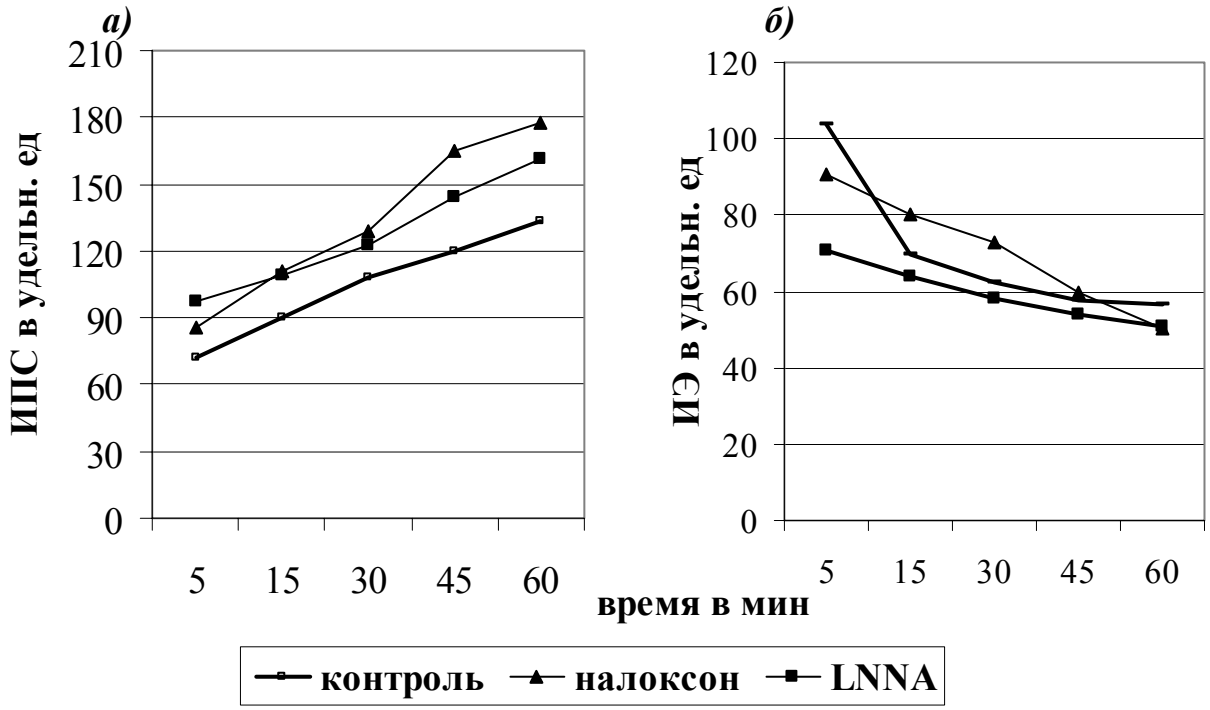

Рис. 1. Изменения показателей периферического сосудистого тонуса в условиях острого стресса в контроле, на фоне неселективной блокады опиатных рецепторов налоксоном и блокады синтеза оксида азота LNNA.

В контрольной серии наблюдалось снижение на 35,3% ($p<0,001$) уровня продукции NO по сравнению с базовым (определенным у интактных животных), что свидетельствовало об изменении функционального состояния вазоактивной системы NO в условиях острого стресса (рис.2).

Учитывая значительный рост периферического сосудистого тонуса в условиях острого стресса на фоне введения блокатора опиатных рецепторов налоксона, логичным было предположить снижение уровня продукции NO в данной экспериментальной серии, однако на фоне введения налоксона наблюдалось увеличение уровня продукции NO на 49,4% ($p<0,001$) по сравнению с контрольной серией (рис.2). Такое увеличение синтеза NO в данной экспериментальной серии, вероятно, связано с тем, что при введении налоксона на фоне острого стресса происходит мощное (почти в два раза) увеличение содержания эндотелина-1 в плазме крови крыс Вистар (Курицын С.Н., Командресова Т.М., 2005). Взаимодействие эндотелина-1 с локальными вазоактивными факторами сосудистой сети может приводить к компенсаторному увеличению продукции оксида азота эндотелиальными клетками (Патарая С.А., Преображенский Д.В., 2000).

Для установления участия различных типов опиатных рецепторов в регуляции стрессорных изменений периферического сосудистого тонуса на модели острого стресса были проведены серии экспериментов, в которых изменения периферического сосудистого тонуса оценивались на фоне введения селективных и неселективных агонистов опиатных рецепторов.

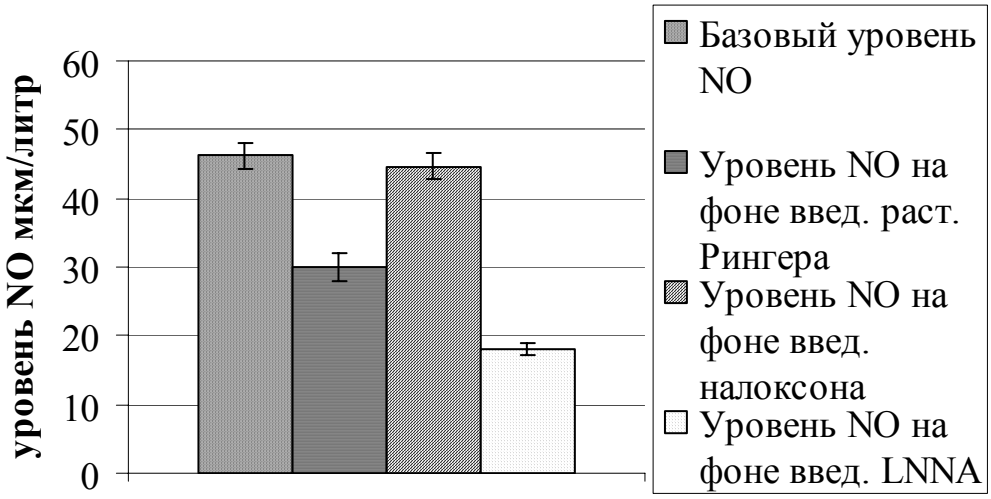

Рис. 2. Стрессобусловленные изменения уровня продукции оксида азота.

Было выявлено, что активация μ-, δ- и κ- опиатных рецепторов в условиях острого стресса оказывала протективный эффект на стресссобусловленную вазоконстрикцию с различной степенью выраженности.

Наибольший протективный эффект на стрессорный рост периферического сосудистого тонуса был выявлен у агониста μ-опиатных рецепторов DAGO и несколько менее выраженный у неселективного агониста μ- и δ - опиатных рецепторов даларгина (рис. 3). Так, в условиях острого стресса на фоне введения DAGO на 5-й мин ИПС был ниже контрольного уровня на 35,7% ($p<0,001$), а также ниже аналогичного показателя на фоне введения даларгина на 16,2% ($p<0,01$). К 60-й мин эксперимента эти отличия составили 22,0% ($p<0,001$) и 8,8% .

Селективный агонист δ-опиатных рецепторов DSLET оказывал менее выраженный, чем у даларгина протективный эффект на стрессобусловленные изменения показателей периферического сосудистого тонуса, который проявлялся, начиная с 15-й мин стрессирования и сохранялся до конца эксперимента (рис.3). На 15-й мин стрессирования на фоне введения DSLET ИПС был на 9,7% ниже, чем в контроле ($p<0,001$) и на 28,9% выше, чем на фоне введения даларгина ($p<0,001$) на этой же мин стрессирования. К 60-й мин эксперимента эти отличия составляли, соответственно, 7,3% ($p<0,001$) и 8,6%.

Активация κ- опиатных рецепторов приводила к незначительному и кратковременному снижению роста ИПС. Кратковременный протективный эффект динорфина (1-13) наблюдался на 15-й мин эксперимента. В этой серии ИПС на 15-й мин стрессирования был ниже на 10,5%, чем в контроле ($p<0,05$).

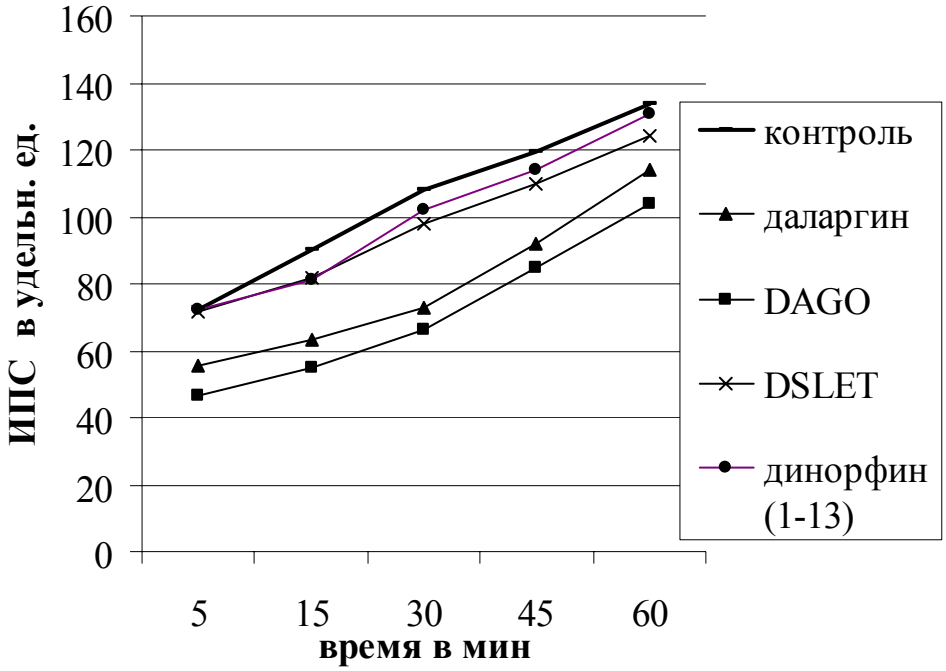

Рис. 3. Стрессобусловленные изменения ИПС на фоне введения раствора Рингера (контроль), активации опиатных рецепторов при помощи введения даларгина, DAGO, DSLET, динорфина (1-13).

ИЭ на фоне введения DAGO на 5-й мин эксперимента был на 21,4% выше, чем в контрольной серии ($p<0,001$) и на 5,3% выше, чем на фоне введения даларгина. К 60-й мин стрессирования эти отличия составляли, соответственно, 41,8% ($p<0,001$) и 6,3%. На фоне введения DSLET ИЭ на 15-й мин стрессирования был на 7,0% выше, чем в контроле и на 28,9% ниже, чем на фоне введения даларгина на этой же мин эксперимента ($p<0,001$). К концу срока иммобилизации ИЭ в этой серии был на 9,9% выше, чем в контроле и на 24,0% ниже ($p<0,001$), чем на фоне введения даларгина. На фоне ведения динорфина (1-13) ИЭ на 15-й мин эксперимента был на 15,7% выше, чем в контроле ($p<0,01$). При этом на протяжении остального времени эксперимента

средние значения показателей ИПС и ИЭ были ниже контрольных значений, но достоверно от них не отличались.

В целом, полученные данные свидетельствуют об участии всех типов опиатных рецепторов (μ-, δ- и κ-) в регуляции периферического сосудистого тонуса в условиях острого стресса. Ведущая роль в регуляции стрессобусловленных изменений периферического сосудистого тонуса принадлежит μ- опиатным рецепторам, активация которых оказывает наибольший протективный эффект на стрессорную вазоконстрикцию.

Определение уровня NO на фоне введения агонистов различных типов опиатных рецепторов показало, что активация всех типов опиатных рецепторов приводила к увеличению уровня продукции NO по сравнению с контролем (табл.2).

Таблица 2

Уровень продукции NO (M±m)

Экспериментальная серия	Уровень NO (мкм/л)
Базовый уровень	46,2±1,9***
Стресс на фоне введения:	
раствора Рингера (контроль)	29,9±2,0
LNNA	18,0±0,9***
даларгина	70,0±4,3***
DSLET	42,3±2,4***
DAGO	73,4±4,0***
динорфина 1- 13	49,8±5,1***
налоксона (неспецифическая блокада опиатных рецепторов)	44,7±1,9***

Примечание: * достоверные изменения по сравнению с контролем: *** $p<0,001$.

Наибольшее увеличение уровня продукции NO по сравнению с контрольной серией на 147,8% и на 134,0% ($p<0,001$) наблюдалось на фоне активации μ-опиатных рецепторов, а также на фоне сочетанной активации μ- и δ- опиатных рецепторов. Селективная стимуляция δ- опиатных рецепторов также приводила к увеличению по сравнению с контролем на 41,5% ($p<0,001$) уровня NO. Селективная стимуляция κ- опиатных рецепторов приводила к увеличению уровня NO на 66,6% ($p<0,001$) по сравнению с контролем.

Для того, чтобы установить взаимосвязь опиоидиндуцированого уровня продукции NO с активностью NO-синтаз, на экспериментальной модели острого стресса лиганды опиатных рецепторов вводили на фоне предварительной блокады NO-синтаз (рис. 4).

Предварительная блокада NO-синтаз в значительной степени снимала даларгин- и DAGO-опосредованное увеличение уровня продукции NO. Так, уровень продукции NO в серии с предварительной блокадой NO-синтаз и активацией μ- и δ- опиатных рецепторов снижался по сравнению с серией с введением даларгина на 56,7% ($p<0,001$) (рис.4-а), а DAGO-индуцированный

уровень NO, снижался на 62,8 % ($p<0,001$) (рис.4-б), приближаясь к значениям в контроле и достоверно от них не отличаясь. Это свидетельствует о том, что DAGO- и даларгин-индуцированный уровень NO обусловлен изменением активности NO-синтаз.

На фоне предварительной блокады NO-синтаз при помощи введения LNNA не снижалась DSLET-стимулированная выработка NO (рис. 4-в). Уровень NO был на 40,1% ($p<0,01$) выше по сравнению с контролем, что свидетельствует о том, что DSLET-стимулированный уровень NO обусловлен другими механизмами, не связанными с NO-синтазами, например выходом NO из депо кровеносных сосудов.

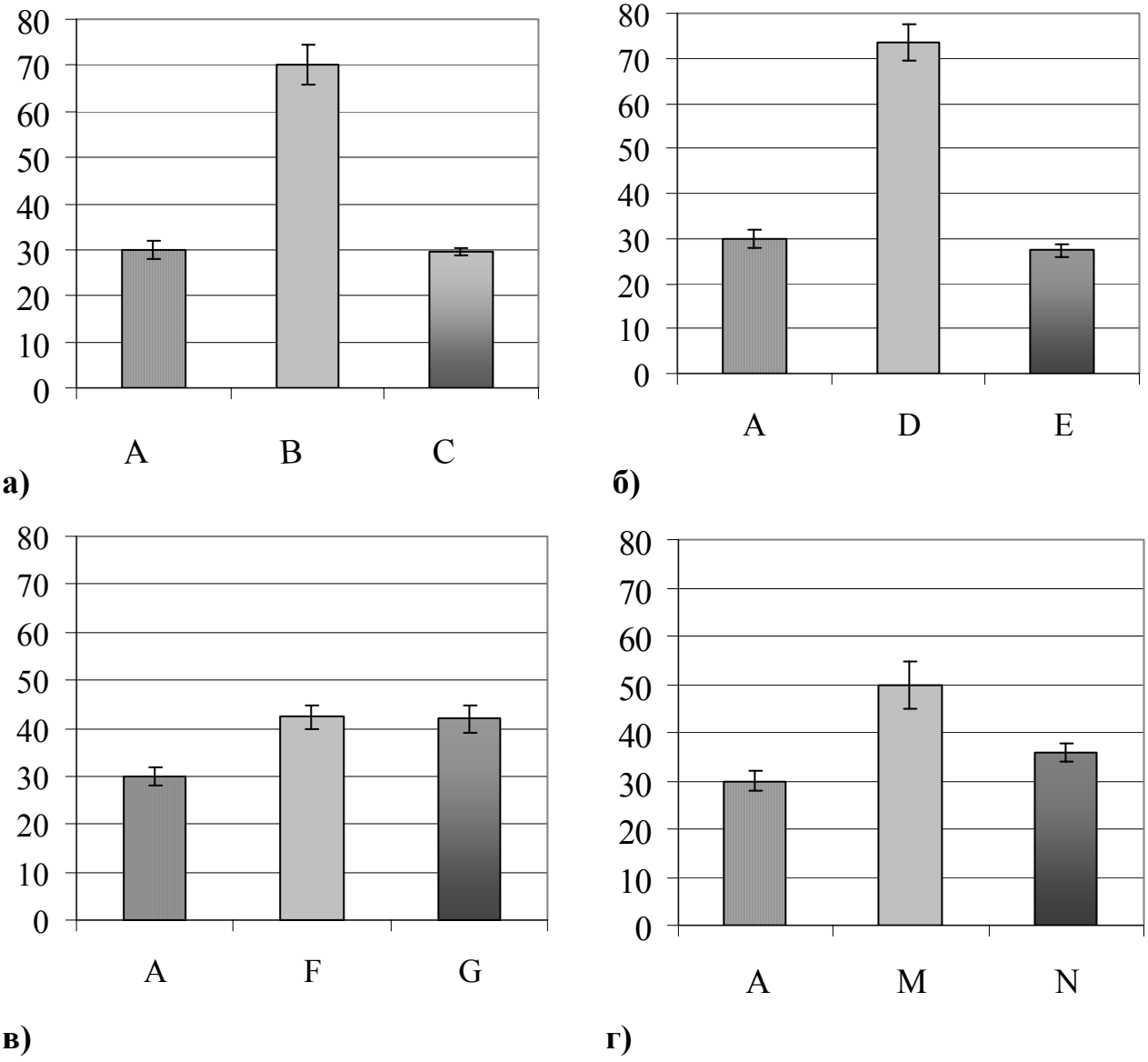

Рис. 4. Изменение опиоид-индуцированного уровня NO на фоне предварительной блокады NO-синтаз в условиях острого стресса (по оси ординат: уровень NO в мкм/литр).
A – контроль, B- даларгин, C – даларгин + LNNA, D – DAGO, E – DAGO+LNNA, F – DSLET, G – DSLET + LNNA, M – динорфин (1-13), N – динорфин (1-13) + LNNA.

На фоне предварительной блокады NO-синтаз при помощи введения LNNA динорфин-стимулированный уровень NO снижался на 27,9% ($p<0,05$), однако его показатель был достоверно выше контрольного уровня (рис.4-г), что является свидетельством того, что динорфин–опосредованное изменение уровня NO связано не только с изменением активности этого фермента, но и с возможным выходом NO из депо кровеносных сосудов.

Для того, чтобы установить, насколько протективные эффекты лигандов опиатных рецепторов на стрессобусловленные изменения периферического сосудистого тонуса связаны с изменением активности NO-синтаз, был проведен анализ стрессобусловленных изменений периферического сосудистого тонуса на фоне блокады NO-синтаз.

Предварительная блокада NO-синтаз при помощи введения LNNA приводила к исчезновению протективного эффекта неселективного агониста μ- и δ- опиатных рецепторов даларгина на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса (рис.5). Учитывая, что даларгин-индуцированный уровень NO был связан с изменением активности NO-синтаз, можно сделать вывод, что ведущим механизмом в протективном эффекте даларгина на стрессобусловленную вазоконстрикцию является изменение NO-синтазной активности.

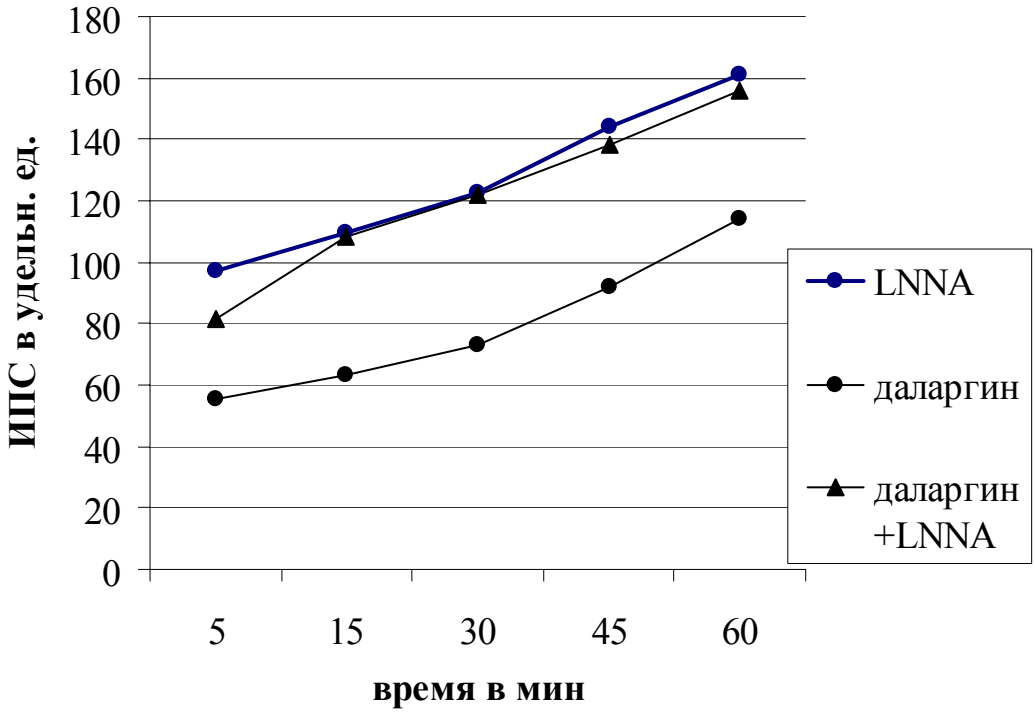

Рис. 5. Изменения ИПС на фоне предварительной блокады NO-синтаз и сочетанной активации μ- и δ- опиатных рецепторов в условиях острого стресса.

Предварительная блокада NO-синтаз приводила к снижению протективного эффекта DAGO на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса, однако не снимала его полностью (рис.6). О снижении протективного эффекта DAGO в условиях блокады NO-синтаз свидетельствует

увеличение показателей ИПС: на 5-й мин на 65,2 %, а к концу эксперимента на 29,0 % ($p<0,001$) по сравнению с аналогичными показателями в серии с активацией μ-опиатных рецепторов. Однако показатели ИПС в данной серии были достоверно ниже, чем в экспериментальной серии с контрольной блокадой NO-синтаз. Снижение ИПС на 26,6% на 5-й мин эксперимента

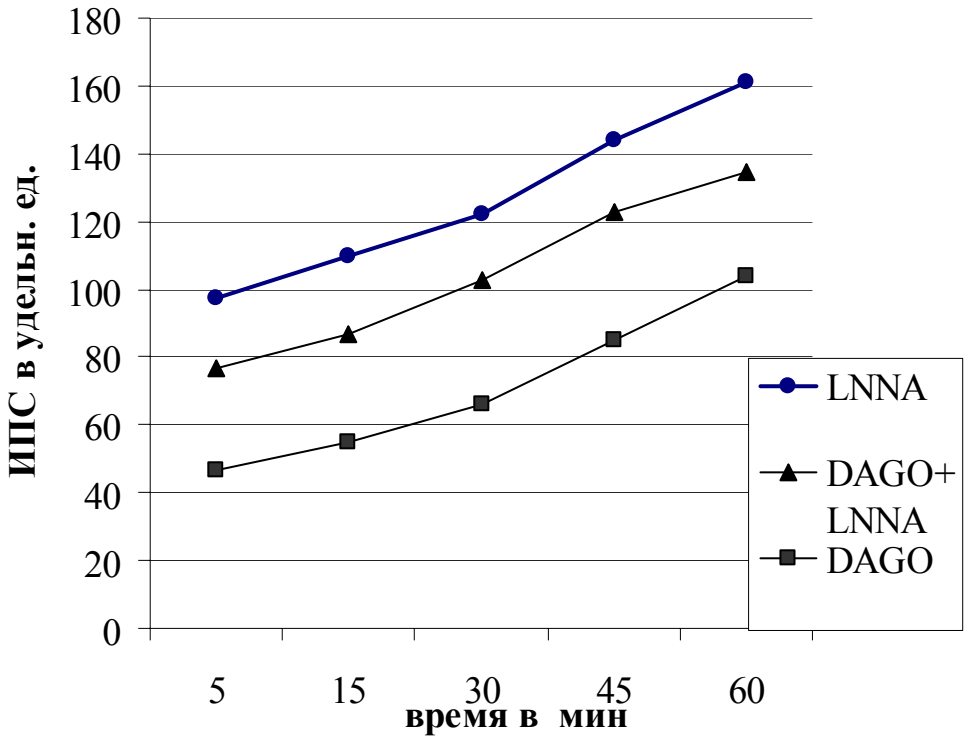

Рис. 6. Изменения ИПС на фоне предварительной блокады NO-синтаз и активации μ- опиатных рецепторов в условиях острого стресса.

и на 16,7% ($p<0,001$) на 60-й мин стрессирования по сравнению с контрольной блокадой NO-синтаз свидетельствовало о частичном сохранении протективного эффекта DAGO на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса. Учитывая, что DAGO-индуцированный уровень NO был обусловлен изменением NO-синтазной активности, частичное сохранение протективного эффекта данного агониста μ- опиатных рецепторов в условиях блокады NO-синтаз свидетельствует о том, что в реализации протективного эффекта данного агониста участвуют и другие механизмы регуляции сосудистого тонуса, не связанные с NO.

Предварительная блокада NO-синтаз также приводила к снижению протективного эффекта агониста δ- опиатных рецепторов DSLET на стрессобусловленную вазоконстрикцию. Учитывая, что в условиях блокады NO-синтаз сохранялся DSLET-стимулированный уровень NO, в протективном эффекте данного агониста опиатных рецепторов на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса важную роль играет оксид азота, связанный не только с изменением активности NO-синтаз, но и, вероятно, с выходом NO из депо кровеносных сосудов.

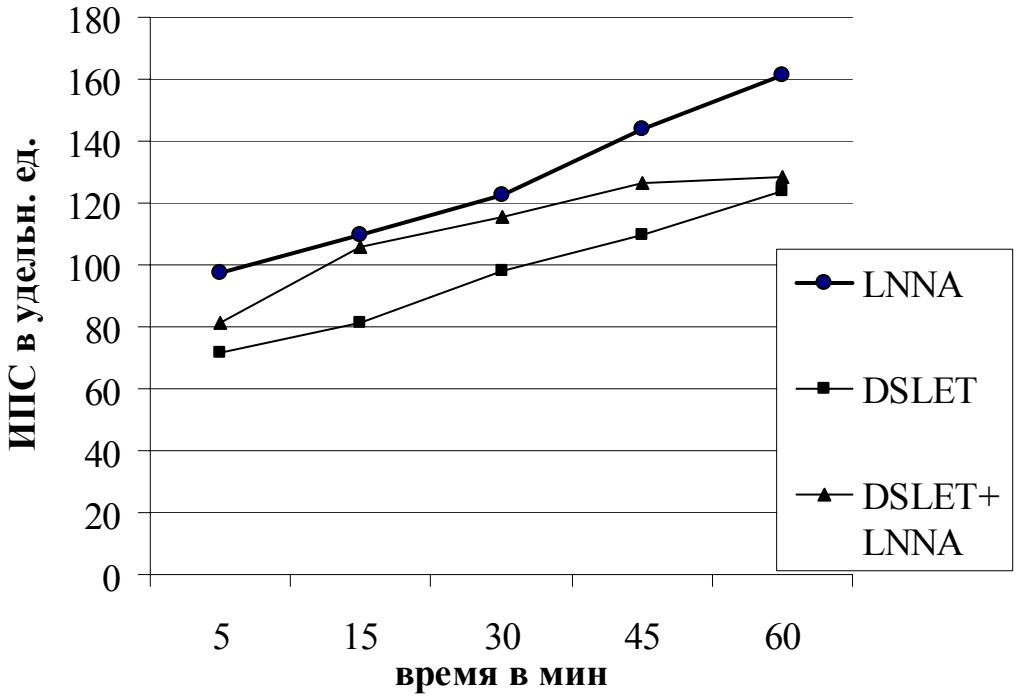

Рис. 7. Изменения ИПС на фоне предварительной блокады NO-синтаз и активации δ- опиатных рецепторов в условиях острого стресса.

Предварительная блокада NO-синтаз при помощи введения LNNA не снимала кратковременный протективный эффект динорфина (1-13) (рис.8), что свидетельствует о том, что его протективный эффект не является следствием изменения активности NO-синтаз.

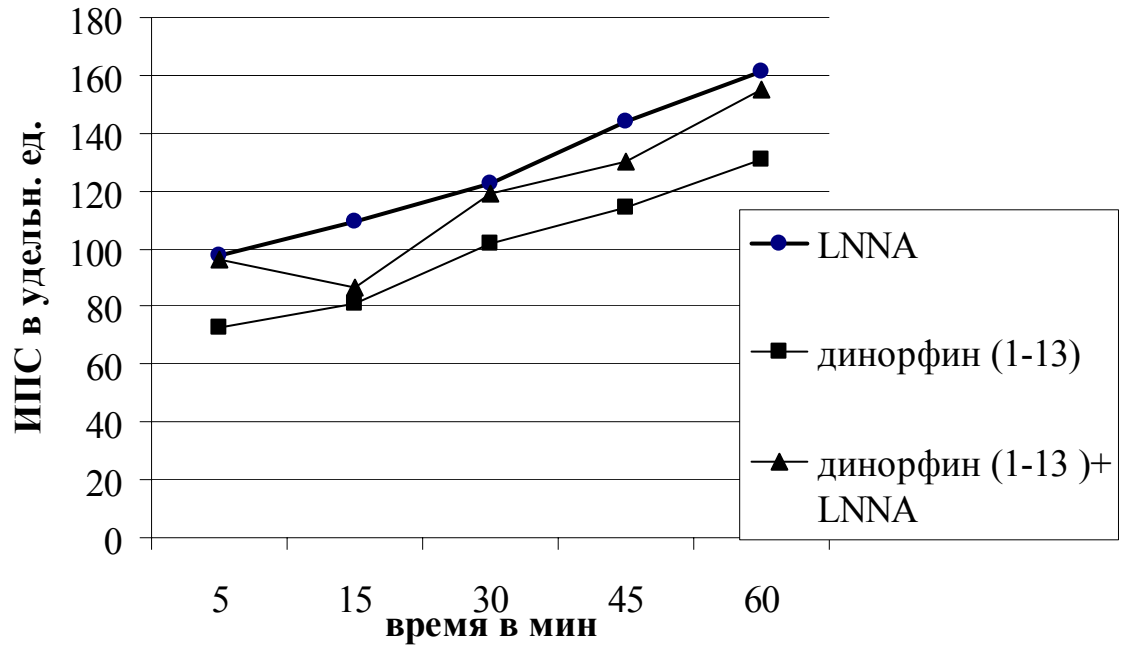

Рис. 8. Изменения ИПС на фоне предварительной блокады NO-синтаз и активации к- опиатных рецепторов в условиях острого стресса.

Повышение уровня NO на фоне активации к- опиатных рецепторов и частичное сохранение повышенного уровня в условиях предварительной блокады NO-синтаз свидетельствует о том, что протективный эффект динорфина может быть связан с выходом NO из депо кровеносных сосудов.

Рис. 9. Роль NO в опиоидергической регуляции стрессобусловленной вазоконстрикции.

Проведенные исследования показали участие NO в механизмах протективного эффекта селективной и неселективной активации опиатных рецепторов на стрессобусловленную вазоконстрикцию (рис.9). Однако степень участия NO в протективных эффектах лигандов опиатных рецепторов, а также механизмы опиоид-стимулированного изменения уровня NO различались при активации различных типов опиатных рецепторов.

ВЫВОДЫ

1. Неселективная блокада опиатных рецепторов приводила к увеличению стрессобусловленного роста основных показателей периферического сосудистого тонуса, что указывает на участие данных рецепторов в регуляции стрессорной вазоконстрикции.

2. При активации периферических μ, δ- и κ-опиатных рецепторов наблюдался протективный эффект на стрессобусловленную вазоконстрикцию с разной степенью выраженности. Наибольший протективный эффект на протяжении всего периода стрессирования наблюдался при активации μ-опиатных рецепторов, менее выраженный - при сочетанной активации μ- и δ- опиатных рецепторов, в то время как при активации δ-опиатных рецепторов наблюдался протективный эффект, начиная с 15-й мин стрессирования, а при активации κ-опиатных рецепторов наблюдался кратковременный протективный эффект только на 15-й мин эксперимента.
3. Неселективная активация μ- и δ- опиатных рецепторов при помощи даларгина в условиях стресса приводила к увеличению уровня NO на 134,0%. Ведущее значение в механизме протективного эффекта даларгина на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса играет увеличение продукции NO, обусловленное изменением активности NO-синтаз.
4. Селективная активация μ-опиатных рецепторов DAGO приводила к увеличению уровня NO на 145,5% в условиях острого стресса. В протективном эффекте DAGO на стрессобусловленную вазоконстрикцию наряду с увеличением активности NO-продуцирующей системы играют роль и другие механизмы, не связанные с NO.
5. Селективная стимуляция δ-опиатных рецепторов DSLET на фоне острого стресса приводила к увеличению уровня продукции NO на 41,5%. В механизме протективного влияния DSLET на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса важную роль играет увеличение продукции NO, обусловленное не только изменением активности NO-синтаз, но и другими механизмами.
6. При активации κ-опиатных рецепторов в условиях острого стресса наблюдалось увеличение уровня продукции NO на 66,6%. Кратковременный протективный эффект активации κ-опиатных рецепторов на стрессобусловленную вазоконстрикцию не связан с NO-синтазной активностью.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Модуляция опиоидами стрессорной артериальной гипертензии / Н.А. Бебякова, Т.М. Командресова, С.Д. Михайлова, А.В. Хромова // Экология человека. – 2003.– № 3. – С.13-16.
2. А.В. Хромова Опиоидная модуляция стрессобусловленных изменений периферического сосудистого тонуса у крыс разных генетических линий / А.В. Хромова, Т. М. Командресова // Бюл. СГМУ. – 2003. – № 2. – С. 85-87.
3. А.В Хромова. Коррекция опиоидами стрессорной артериальной гипертензии / А.В. Хромова, Т.М. Командресова, Н.А. Бебякова // Экология – 2003: материалы междунар. молодёжн. конф.– Архангельск. – 2003. – С. 293-294.

4. Влияние опиоидных пептидов на миокард в условиях острого стресса / А.В. Хромова, Т.М. Командресова, Ж.Д. Беспалова, Н.А. Бебякова // Кардиостим – 2004: материалы VI междунар. конгр. – № 3. - С.173.
5. Т. М. Командресова Определение базового уровня оксида азота у крыс разных генетических линий / Т.М. Командресова, С.Н. Курицын, А.В. Хромова // Бюл. СГМУ. – 2004. – № 2. – С. 98-100.
6. А.В. Хромова Участие μ-опиатных рецепторов в модуляции параметров гемодинамики в условиях острого стресса / А.В. Хромова, Т.М. Командресова // Материалы докл. 15 Коми респ. молодежн. науч. конф. г. Сыктывкар, 2004. – Т. I. – С.121-123.
7. А.В. Хромова Влияние опиоидных пептидов на тонус сосудов / А.В. Хромова, Т.М. Командресова // Сб. тез. докл. 8-й Междунар. Пущинской школы - конференция молодых ученых. – Пущино, 2004. – С. 115-116.
8. Т.М. Командресова Роль активации и блокады μ- и δ- опиатных рецепторов в регуляции сосудистого тонуса / Т.М. Командресова, С.Н. Курицын, А.В. Хромова // Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике: материалы IV Молодежн. науч. конф. – Сыктывкар, 2005. – С. 30-32.
9. Т.М. Командресова Влияние блокады опиатных рецепторов на стрессобусловленные изменения периферического сосудистого тонуса / Т.М. Командресова, С.Н. Курицын, А.В. Хромова // Биология – наука XXI века: тез. докл. 9-й Междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых. – Пущино, 2005. – С. 150.
10. Роль мю-, дельта- и каппа- опиатных рецепторов в модуляции стрессорной вазоконстрикции / Н.А. Бебякова., Т.М. Командресова, С.Н. Курицын, А.В. Хромова // Науч. тр. I съезда физиологов СНГ: тез. доклад. – М., 2005. – Т. 1. – С.17.
11. С.Н. Курицын Участие эндотелина-1 в гемодинамических изменениях при остром стрессе / С.Н. Курицын, Т.М. Командресова // Бюл. СГМУ. – 2005. – № 2. – С. 134-1136.
12. С.Н. Курицын Взаимосвязь эндотелиальных факторов в условиях активации и блокады опиатных рецепторов при остром стрессе / С.Н. Курицын, Т.М. Командресова // Физиология человека и животных: от эксперимента к клин. практике: тез. докл. – Сыктывкар, 2006. – С. 28-30.
13. Т.М. Командресова Участие NO в модулирующем влиянии DSLET на стрессобусловленные изменения периферического сосудистого тонуса / Т.М. Командресова, С.Н. Курицын // Бюл. СГМУ. – 2006. – № 1. – С. 77-80.
14. С.Н.Курицын Роль эндотелина-1 в изменениях эластичности эндотелия сосудов в условиях острого стресса на фоне блокады опиатных рецепторов / С.Н. Курицын, Т.М. Командресова // Бюл. СГМУ. – 2006. – № 1. – С. 97-99.

Подписано в печать 16.05.2006. Бумага писчая. Формат 60x84 1/16.
Тираж 100 экз. Объем 1,0 п.л. Заказ № .

Отпечатано в издательском центре ПГУ
163002, Архангельск, пр. Ломоносова,6