

УДК 599.323.4:618.3:612.017.2]:543.9
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-3-61-69

Л. Е. БЕЛЯЕВА, А. Н. ПАВЛЮКЕВИЧ

Биохимическая оценка системы синтеза оксида азота у пренатально стрессированных крыс

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
г. Витебск, Республика Беларусь
Республика Беларусь, г. Витебск, пр. Фрунзе, д. 27
E-mail: lyudm.belyaeva2013@yandex.by

Статья поступила в редакцию 17.11.20 г.; принята к печати 04.02.21 г.

Резюме

Введение. Развитие беременности в неблагоприятных условиях может способствовать нарушению образования оксида азота NO у потомства в постнатальной жизни и «программировать» заболевания сердечно-сосудистой системы потомства. Выяснение особенностей и механизмов нарушения функционирования системы синтеза и действия оксида азота после перенесенного пренатального стресса позволит расширить представления о патогенезе целого ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы и предложить новые подходы к их профилактике и лечению. *Цель* – оценить характер образования и действия оксида азота у половозрелых крыс, матери которых во время беременности подвергались воздействию хронического «непредсказуемого» стресса. *Материалы и методы.* Из беременных крыс сформировали группы «контроль» и «стресс» (по 20 голов). Крыс группы «стресс» подвергали неоднократным стрессорным воздействиям через различные промежутки времени: лишению пищи в течение суток, иммобилизации в воде комнатной температуры в течение 20 мин, контакту с экскрементами кошек в течение суток. В сыворотке крови 3-месячного потомства (n=96, в том числе группа «контроль» самцы – 24, группа «контроль» самки – 26, группа «стресс» самцы – 22, группа «стресс» самки – 24) определяли содержание конечных продуктов деградации NO – нитратов/нитритов ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$), концентрацию эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) изоформ NO-синтазы, ингибитора NO-синтазной реакции – асимметричного диметиларгинина (ADMA), содержание циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА), а также концентрацию С-реактивного белка высокочувствительным методом ($^{\text{hs}}\text{CRP}$). *Результаты.* Было обнаружено снижение содержания eNOS и цГМФ (на 12,9 и 31,9 % соответственно), повышение концентрации iNOS, $^{\text{hs}}\text{CRP}$ и ADMA (на 49,9, 20,3 и 63,1 % соответственно) без статистически значимых изменений уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, а также увеличение содержания ДК на 21,1 % и МДА в 1,5 раза в сыворотке крови пренатально стрессированных самцов, по сравнению с самцами, родившимися у крыс группы «контроль». У самок, матери которых подвергались хроническому «непредсказуемому» стрессу во время беременности, были обнаружены тенденция к снижению концентрации eNOS, увеличение содержания iNOS на 30,6 %, $^{\text{hs}}\text{CRP}$ на 23,9 % и МДА в 2,3 раза (сравнение с соответствующими показателями группы «контроль» самки) без статистически значимых изменений в концентрации цГМФ, ADMA, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и ДК в сыворотке крови. *Выводы.* Выявленные изменения в системе образования и функционирования оксида азота у пренатально стрессированных крыс-самцов могут свидетельствовать о высоком риске поражения у них сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: пренатальный стресс, NO-синтаза, асимметричный диметиларгинин, цГМФ, нитраты/нитриты, диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, С-реактивный белок

Для цитирования: Беляева Л. Е., Павлюкевич А. Н. Биохимическая оценка системы синтеза оксида азота у пренатально стрессированных крыс. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(3):61–69. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-3-61-69.

UDC 599.323.4:618.3:612.017.2]:543.9
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-3-61-69

L. E. BELYAEVA, H. N. PAULIUKEVICH

The biochemical estimation of the nitric oxide system in prenatally stressed rats

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus
27, Frunze pr., Vitebsk, Republic of Belarus
E-mail: lyudm.belyaeva2013@yandex.by

Received 17.11.20; accepted 04.02.21

Summary

Introduction. Pregnancy development following unfavorable conditions could facilitate disorders of nitric oxide (NO) production during offspring's postnatal life and «program» offspring's cardiovascular diseases. Investigation of particular features and mechanisms of nitric oxide synthesis and action disorders following prenatal stress will promote expansion of considerations about pathogenesis of different cardiovascular diseases and propose new approaches to their prevention and management. The *aim* of the investigation is to assess the nature of nitric oxide synthesis and action in mature rats whose moth-

ers were exposed to chronic «unpredictable» stress during pregnancy. *Materials and methods.* Pregnant rats were subdivided into the «control» and «stress» groups (in 20 animals). The rats from the «stress» group were exposed to multiple different stressors at various intervals, such as 1-day famine; 20-min. immobilization in the water at room temperature; 1-day contact with cats' excrements. In the blood serum of 3-mo offspring (n=96, including «control» males – 24, «control» females – 26, «stress» males – 22, «stress» females – 24) concentration of the stable products of NO degradation – nitrates/nitrites ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) isoforms of the NO-synthase, inhibitor of NO-synthase asymmetric dimethyl-arginine (ADMA), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), lipid peroxidation products – diene conjugates (DC) and malonic dialdehyde (MDA) and C-reactive protein ($^{\text{hs}}$ CRP) was detected. *Results.* The decrease of eNOS and cGMP concentration (by 12.9 and 31.9 %, respectively), increase of iNOS, $^{\text{hs}}$ CRP and ADMA concentration (by 49.9, 20.3 и 63.1 %, respectively) without statistically significant fluctuation in the $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ level and accumulation of DC and MDA by 21.1 % and 1.5 times in a prenatally stressed male rats' blood serum were found (as compared with «control» male rats). In a blood serum of female rats, whose mothers were exposed to chronic «unpredictable» stress during pregnancy, a tendency to eNOS concentration decreasing, and increase of iNOS by 30.6 %, $^{\text{hs}}$ CRP by 23.9 % and MDA by 2.3 times without statistically significant changes in cGMP, ADMA, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, and DC concentration were detected (as compared with «control» female rats). *Conclusion.* Identified changes of the nitric oxide system synthesis and action in the prenatally stressed male rats could argue the high risk of their cardiovascular system lesion.

Keywords: prenatal stress, NO-synthase, asymmetric dimethylarginine, cGMP, nitrates/nitrites, diene conjugates, malonic dialdehyde, C-reactive protein

For citation: Belyaeva L. E., Pauliukevich H. N. The biochemical estimation of the nitric oxide system in prenatally stressed rats. *Regional hemodynamics and microcirculation.* 2021;20(3):61–69. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-3-61-69.

Введение

Оксид азота NO представляет собой сигнальную молекулу малых размеров (диаметром около 1 нм) с высокой диффузионной способностью, интра-, ауто- и паракринным действием, активно реагирующую с другими биомолекулами и имеющую период полужизни всего около 2 мс, что делает достаточно сложным определение концентрации этого вещества [1]. В настоящее время количественные методы по определению содержания оксида азота условно разделяются на две группы: 1) прямые методы определения NO *in situ* в режиме реального времени, которые являются весьма точными, но малоудобными при трансляции результатов научных исследований в практику; 2) непрямые методы, основанные на определении содержания в крови метаболитов оксида азота (нитратов/нитритов) и (или) различных изоформ NO-синтазы и измерении ее активности [2].

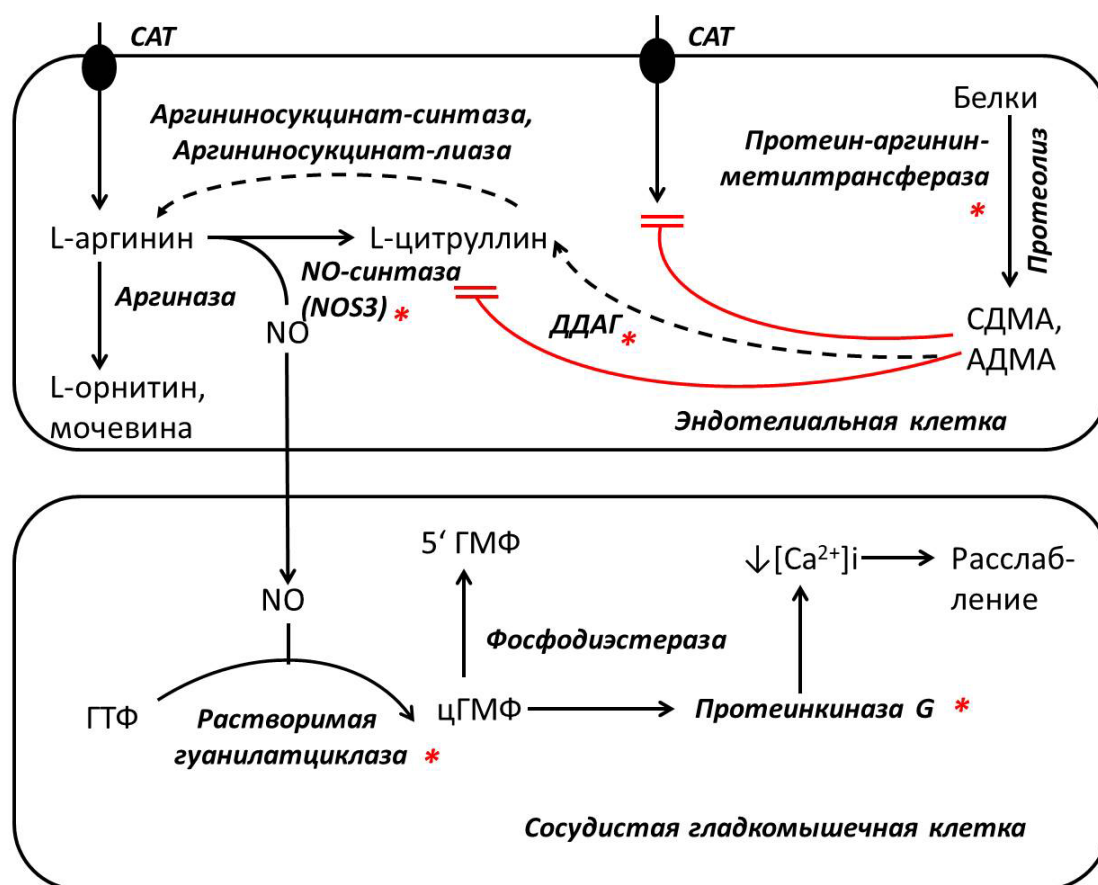
Оксид азота NO был назван «чудесной молекулой» за важность его роли в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы. Помимо вазодилаторного действия, описанного в 80-е гг. прошлого века, NO обеспечивает атромбогенные свойства эндотелия; подавляет воспаление в сосудистой стенке; регулирует ангиогенез; подавляет пролиферацию сосудистых гладкомышечных клеток; ингибирует окисление ЛПНП и др. [3]. Краткие представления об образовании и действии оксида азота в сосудистой стенке показаны на рис. 1.

Оксид азота в кровеносных сосудах ферментативным путем образуется эндотелиальной NO-синтазой (eNOS, NOS3), индуцибельной NO-синтазой (iNOS, NOS2), экспрессирующейся в сосудистых гладкомышечных клетках, нейтрофилах, макрофагах и тромбоцитах, а также нейрональной NO-синтазой (nNOS, NOS1) и митохондриальной NO-синтазой (mtNOS) из аминокислоты L-аргинина (для этого расходуется примерно 1,5 % от количества этой аминокислоты в организме), а также неферментативным путем из нитратов и нитритов (с участием бактерий, а также в условиях гипоксии и ацидоза). На рис.1 показано действие только eNOS в эндотелиоцитах в физио-

логических условиях. L-аргинин транспортируется в клетки катионными переносчиками CAT. В физиологических условиях NO-синтаза образует оксид азота и L-цитруллин, а при недостатке кофактора тетрагидробиоптерина и при окислительном стрессе происходит «разобщение» NOS, и этот фермент образует супероксидный радикал и пероксинитрит. Концентрация нитратов/нитритов в биологических жидкостях отражает «валовое» образование NO всеми изоформами NOS. В клетках присутствуют естественные ингибиторы NOS – симметричный диметиларгинин (CDMA) и асимметричный диметиларгинин (ADMA), которые ограничивают продукцию NO: CDMA – подавляя транспорт L-аргинина, а ADMA – конкурентно ингибируя активность NOS. Под влиянием ферментов диметиларгинин диметиламиногидролаз (DDAG) ADMA разрушается и превращается в L-цитруллин. Оксид азота диффундирует в сосудистые гладкомышечные клетки (сГМК), в которых он активирует растворимую гуанилатциклазу, превращающую ГТФ в цГМФ. Этот нуклеотид посредством активации протеинкиназы G способствует снижению содержания ионизированного кальция в сГМК с последующим их расслаблением. Концентрация цГМФ в крови зависит, во-первых, от активности растворимой и мембранно-связанной изоформ гуанилатциклазы (причем последняя активируется натрийуретическими пептидами); во-вторых, от активности фосфодиэстераз, разрушающих цГМФ, и, в-третьих, от активности белков-транспортеров, выводящих цГМФ из клеток [4–6].

Таким образом, образование и действие оксида азота на клетки сосудистой стенки зависят от множества факторов: экспрессии различных изоформ NO-синтазы и их активности, наличия субстрата и кофакторов для NO-синтазной реакции, а также от концентрации ингибиторов этой реакции; количества образующихся активных форм кислорода (АФК), активности растворимой гуанилатциклазы и характера активности протеинкиназ, связанных с eNOS и др.

Уменьшение количества и (или) снижение биодоступности NO, образуемого в основном eNOS,



* - биохимические пути, изменяющиеся при окислительном стрессе;

—||— ингибирование

Рис. 1. Упрощенные представления об образовании и действии оксида азота в сосудистой стенке

Fig. 1. Simplified interpretation of nitric oxide synthesis and action in the vascular wall

а также повышенное образование оксида азота iNOS – одно из проявлений дисфункции эндотелиоцитов кровеносных сосудов и важное звено патогенеза различных форм патологии сердечно-сосудистой системы: артериальной гипертензии, атеросклероза, ишемической болезни сердца, сосудистых осложнений сахарного диабета и заболеваний почек, септического шока и др. [7]. Многочисленные экспериментальные исследования показывают, что нарушение самых ранних периодов онтогенеза (при развитии беременности в неблагоприятных условиях, например, при гипоксии, неадекватном питании, действии повышенных концентраций глюкокортикостероидов, веществ, нарушающих функционирование эндокринной системы и др.) сопровождается изменениями образования и действия NO в более поздние периоды постнатальной жизни [8–11] и вызывает раннее «программирование» заболеваний сердечно-сосудистой системы. Выяснение особенностей и механизмов нарушения функционирования системы синтеза и действия оксида азота крайне актуально, так как позволит расширить представления о патогенезе целого ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы, а значит, и предложить новые подходы к профилактике и лечению таких заболеваний.

Цель работы – оценить характер образования и действия оксида азота у половозрелых крыс, матери которых во время беременности подвергались

воздействию хронического «непредсказуемого» стресса.

Материалы и методы исследования

Эксперименты на животных проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, ТКП 125-2008. Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (от 30.04.2019 г.). Для получения потомства были отобраны и высажены в клетки в соотношении 1:1 по 20 4-месячных, не использовавшихся ранее для воспроизводства самок и самцов беспородных белых крыс, находящихся в стандартных условиях вивария и получающих стандартный рацион. После наступления беременности, первым днем которой считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке самки, самцы были отсажены, из самок методом случайного выбора сформировали равночисленные группы «контроль беременные» и «стресс беременные». Для моделирования хронического «непредсказуемого» стресса во

Характеристика используемых наборов для ИФА

Parameters of employed ELISA kits

Определяемое вещество	Производитель, наименование набора	Минимальная определяемая концентрация вещества
eNOS	Cloud-Clone Corp. (SEA868Ra ELISA Kit for Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial, NOS3)	0,65 нг/мл
iNOS	Cloud-Clone Corp. (E-EL-R0520 ELISA Kit for Nitric Oxide Synthase 2, Inducible, NOS2)	0,62 нг/мл
цГМФ	Elabscience (Cyclic GMP, Catalog № E-EL-0083)	0,47 пмоль/мл
АДМА	Bioassay Technology Laboratory (EA0008Ra ELISA Kit for Rat Asymmetrical Dimethylarginine)	0,99 нг/мл
hsCRP	Elabscience (high-sensitivity C-Reactive Protein, Catalog № E-EL-R0506)	0,1 нг/мл

2-й, 9-й и 16-й дни беременности крыс лишали пищи в течение суток, обеспечивая свободный доступ к воде; в 4-й и 11-й дни их фиксировали в вертикальном положении в пластиковом пенале, заполненном водой ($t=23\pm 2$ °C), до уровня шеи, в течение 20 мин; в 6-й и 13-й дни беременности имитировали присутствие хищника (контакт с экскрементами кошек в течение суток). Данная модель стресса была разработана нами на основании данных о воздействии стрессоров на беременных грызунов [12] таким образом, чтобы не вызвать у беременных крыс преждевременные роды. Стресс такого рода вызывает серьезные нарушения поведения половозрелого потомства, а также способствует повышению у них артериального давления [13]. В 3-месячном возрасте потомство крыс ($n=96$, в том числе группа «контроль» самцы – 24, группа «контроль» самки – 26, группа «стресс» самцы – 22, группа «стресс» самки – 24) взвешивали с помощью весов настольных электронных ВН-15 ГП «Завод Эталон» (Республика Беларусь), затем наркотизировали нембуталом (60 мг/кг, внутривенно) и декапитуировали, собирая кровь в пробирку. В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли концентрацию eNOS, iNOS, цГМФ, АДМА и С-реактивного белка (hsCRP) при длине волны для определения оптической плотности, составлявшей 450 ± 10 нм, с помощью фотометра универсального Ф 300 ТП (ОАО «Витязь», Республика Беларусь). Полученные данные обрабатывали с помощью программы «MedARM» (версия 3.4). Характеристика наборов, используемых для ИФА, приведена в таблице.

Спектрофотометрически в сыворотке крови потомства определяли концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) [14, 15], а также содержание стабильных продуктов деградации оксида азота – нитратов/нитритов ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) – методом, основанным на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди с последующим определением нитрит-ионов с помощью реакции Грисса при длине волны 520 нм [16]. Использовали спектрофлуориметр CM 2203, ЗАО «Спектроскопия, Оптика и Лазеры – Авангардные Разработки» (Республика Беларусь).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica 10.0». Харак-

теристики частотных распределений представляли в виде Ме (15 %; 85 %). Цифровые данные сравнивали с использованием U-критерия Манна – Уитни для независимых групп, так как распределение данных в сравниваемых группах не соответствовало нормальному, что обосновывает необходимость использования данного критерия [17]. Различия цифровых показателей считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Масса тела крыс группы «стресс» статистически значимо не отличалась от таковой у контрольных крыс: 236 (212; 274) г против 237 (206; 260) г у самок ($p=0,314$) и 294 (250; 374) г против 295 (260; 363) г у самцов ($p=0,890$) соответственно.

Концентрация eNOS в сыворотке крови контрольных самок была более чем в 2 раза выше ($p=0,006$), по сравнению с таковой у самцов (рис. 2).

В сыворотке крови самцов, перенесших пренатальный стресс, содержание eNOS снижалось на 12,9 % ($p=0,039$) по сравнению с концентрацией eNOS у самцов контрольной группы. Содержание eNOS в сыворотке крови пренатально стрессированных самок имело тенденцию к снижению ($p=0,066$, сравнение с показателем в группе контрольных самок), но все же было большим, чем у пренатально стрессированных самцов ($p<0,001$).

Содержание iNOS в сыворотке крови контрольных самок и самцов статистически значимо не различалось. У самцов и самок, перенесших пренатальный стресс, концентрация iNOS в сыворотке крови возрастала на 49,9 % ($p<0,001$) и 30,6 % ($p=0,024$) (сравнение с концентрацией iNOS в крови контрольных крыс соответствующего пола) (рис. 3).

Статистически значимых различий в концентрации стабильных продуктов деградации оксида азота в сыворотке крови ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) контрольных и пренатально стрессированных крыс выявлено не было.

Концентрация естественного ингибитора NO-синтазы – АДМА – в сыворотке крови контрольных самок и самцов статистически значимо не различалась. Развитие беременности в условиях хронического стресса способствовало повышению содержания АДМА в сыворотке крови у родившихся самцов на 63,1 % ($p=0,009$), причем концентрация АДМА была значительно большей по сравнению с таковой

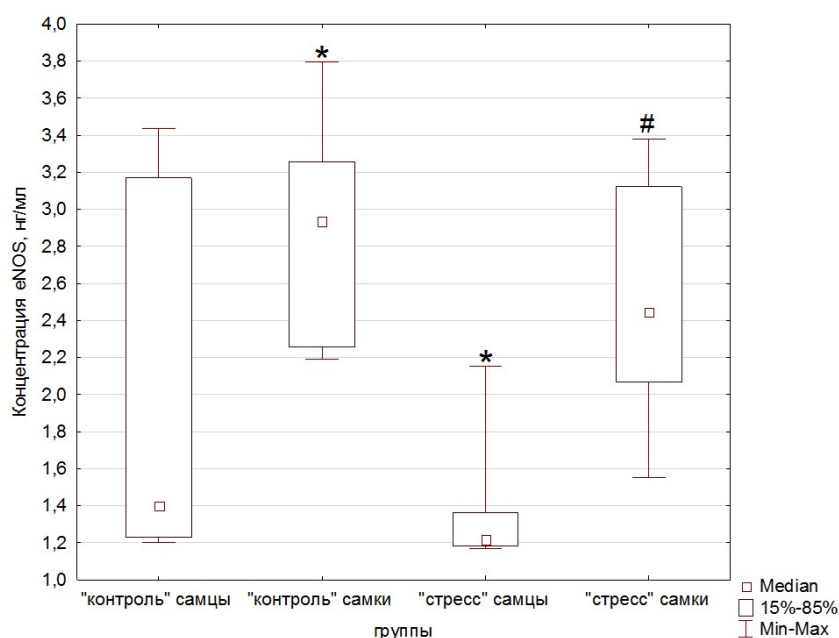


Рис. 2. Содержание eNOS в сыворотке крови крыс, нг/мл: * – $p < 0,05$, сравнение с группой «контроль» самцы; # – $p < 0,05$, сравнение с группой «стресс» самцы

Fig. 2. The concentration of eNOS in the rats' blood serum, ng/ml: * – $p < 0.05$ comparison with males of the «control» group; # – $p < 0.05$ comparison with males of the «stress» group

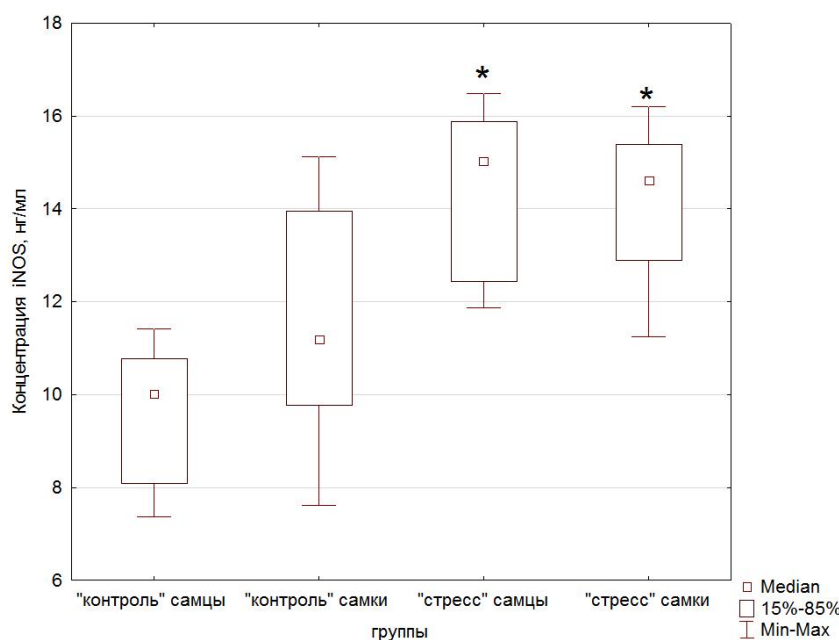


Рис. 3. Содержание iNOS в сыворотке крови крыс, нг/мл: * – $p < 0,05$, сравнение с группой «контроль» соответствующего пола

Fig. 3. The concentration of iNOS in the rats' blood serum, ng/ml: * – $p < 0.05$ comparison with the «control» group of corresponding gender

у самок этой же группы ($p < 0,001$). У пренатально стрессированных и контрольных самок статистически значимых изменений содержания этого ингибитора NO-синтазы в сыворотке крови выявлено не было (рис. 4).

Статистически значимых половых различий в содержании цГМФ в сыворотке крови контрольных крыс также не было выявлено. У пренатально стрессированных самцов, но не самок, концентрация цГМФ в сыворотке крови на 31,9 % была ниже таковой ($p = 0,024$) в сыворотке крови контрольных самцов (рис. 5).

Содержание МДА в сыворотке крови контрольных крыс разного пола статистически значимо не различалось. Пренатальный стресс способствовал увеличению содержания ДК в сыворотке крови самцов, но не самок, на 21,1 % ($p = 0,005$), в то время как повышенное содержание МДА было выявлено у крыс обоих полов – в 1,5 раза у самцов ($p < 0,001$) и в 2,3 раза у самок ($p < 0,001$) по сравнению с таковыми в сыворотке крови контрольных крыс соответствующего пола.

Содержание ^{hs}СРБ в сыворотке крови пренатально стрессированных крыс превышало соответствующую

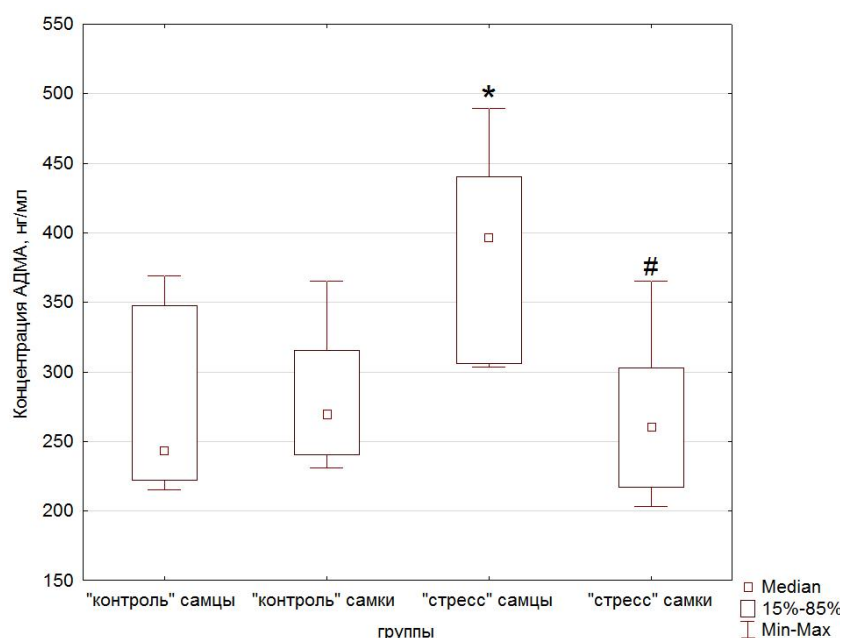


Рис. 4. Содержание АДМА в сыворотке крови крыс, нг/мл: * – $p < 0,05$, сравнение с группой «контроль» самцы; # – $p < 0,05$, сравнение с группой «стресс» самцы

Fig. 4. The concentration of ADMA in the rats' blood serum, ng/ml: * – $p < 0.05$ comparison with males of the «control» group; # – $p < 0.05$ comparison with males of the «stress» group

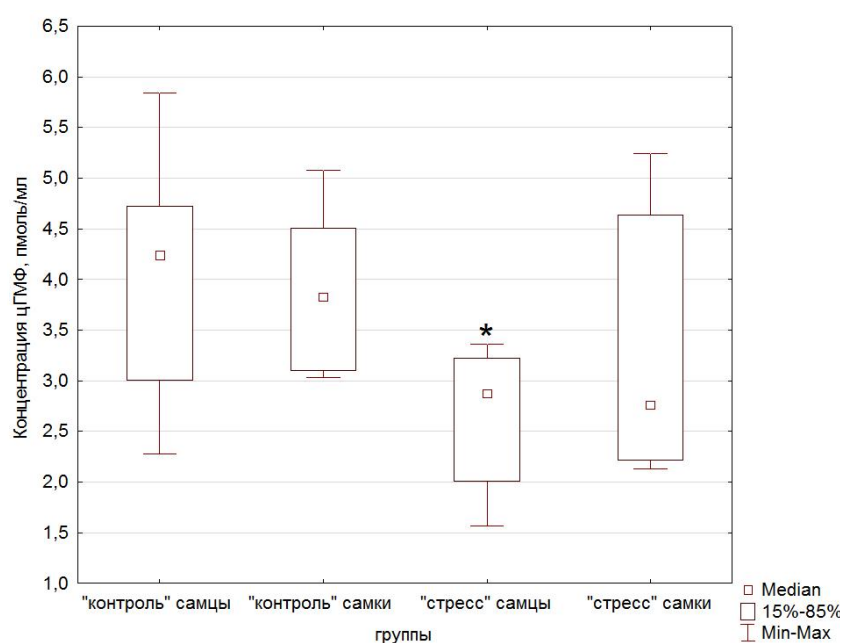


Рис. 5. Содержание цГМФ в сыворотке крови крыс, пмоль/мл: * – $p < 0,05$, сравнение с группой «контроль» самцы

Fig. 5. The concentration of cGMP in the rats' blood serum, pmol/ml: * – $p < 0.05$ comparison with males of the «control» group

величину у контрольных крыс: на 23,9 % у самок ($p < 0,001$) и на 20,3 % у самцов ($p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что хронический «непредсказуемый» стресс у беременных крыс существенным образом нарушает функционирование системы синтеза оксида азота у их 3-месячного потомства, и особенно у самцов. В частности, у пренатально стрессированных самцов имеются все условия для уменьшения образования NO эндотелиальной NO-синтазой и нарушения его действия, о чем свидетельствует, во-первых, уменьшение содержания самого фермента в крови,

во-вторых, увеличение концентрации в крови эндогенного ингибитора NO-синтазной реакции АДМА и, в-третьих, уменьшение содержания цГМФ. Закономерно возникает вопрос о природе таких изменений. Доказано, что при задержке развития плода, благодаря эпигенетическим изменениям – специфическому метилированию ДНК в составе гена eNOS, а также ацетилированию гистона H3 и действию специфических микро-РНК, возникает долговременное изменение экспрессии гена eNOS [18–20].

Сходные результаты были обнаружены группой X. Chen et al. [21], которая установила факт уменьшения

экспрессии мРНК eNOS в эндотелии мезентериальных сосудов 20-месячных крыс-самцов, матери которых с 5-го по 21-й день беременности подвергались гипоксии (содержание кислорода в подаваемом в клетку воздухе составляло 10,5 %). Сниженное содержание eNOS в сыворотке крови является важным индикатором эндотелиальной дисфункции [22], развитие которой можно предположить у пренатально стрессированных самцов. Повышение концентрации АДМА, конкурирующего с L-аргинином за связывание с активным центром NO-синтазы, указывает на возможное снижение активности eNOS у самцов, родившихся от крыс, которые подвергались стрессу во время беременности. Под влиянием АДМА также не исключается «разобщение» eNOS, в результате чего этот фермент образует супероксидный радикал и пероксинитрит [23]. Накопление АДМА в крови самцов, перенесших пренатальный стресс, может быть обусловлено окислительным стрессом, при котором, с одной стороны, повышается образование этого ингибитора NO-синтазной реакции, и, с другой стороны, нарушается разрушение АДМА диметиларгинин диметиламиногидролазами. Факт наличия окислительного стресса в крови пренатально стрессированных крыс подтверждается повышением содержания конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. В этих условиях может формироваться «порочный круг», в котором увеличение образования АФК является как причиной, так и следствием нарушения функционирования eNOS.

Примечательно, что в сыворотке крови пренатально стрессированного потомства повышалось содержание iNOS, экспрессия гена которой позитивно регулируется АФК, провоспалительными цитокинами, бактериальным липополисахаридом, фактором HIF-1, компонентами клеточной стенки бактерий, различными «образчиками молекул, ассоциированных с патогенами» и др. [24] и, кроме того, действием эпигенетических механизмов [25]. Полученные нами результаты согласуются с данными, свидетельствующими о повышенной экспрессии iNOS в нервной ткани потомства крыс, подвергавшихся холодовому стрессу во время беременности, и в кардиомиоцитах потомства, страдавшего от внутриутробной гипоксии [26, 27]. Повышенное содержание СРБ, определенное высокочувствительным методом в сыворотке крови пренатально стрессированных крыс, свидетельствует о развитии у них системного воспаления низкой интенсивности и является косвенным маркером повышения уровня провоспалительных цитокинов в крови таких животных, а также прогностическим фактором, указывающим на высокий риск поражения у них сердечно-сосудистой системы [28]. Теоретически, гиперцитокинемия у пренатально стрессированных крыс может быть обусловлена нарушением развития кишечника и повышением его проницаемости в условиях дисбиоза с усиленной бактериальной энтеральной транслокацией [29, 30]. Увеличение содержания iNOS в сыворотке крови крыс, перенесших пренатальный стресс, может объяснить, почему в условиях дефицита eNOS концентрация метаболитов NO – нитратов/нитритов – в сыворотке крови крыс не

отличалась от таковой в контроле. При этом у пренатально стрессированных животных нельзя исключить и избыточной активации аргиназы, расщепляющей L-аргинин. По крайней мере, факт активации этого фермента при снижении активности eNOS выявлен у 5-недельных крыс, родившихся от самок, страдавших во время беременности от белкового голодания [31].

Нами также получены косвенные доказательства нарушения действия оксида азота в виде сниженного содержания цГМФ в сыворотке крови у пренатально стрессированных самцов. Во-первых, в условиях дефицита NO, образуемого eNOS, создаются условия для недостаточного образования цГМФ цитозольной гуанилатциклазой; во-вторых, нельзя исключить усиленного разрушения цГМФ фосфодиэстеразой, и, в-третьих, нарушения выведения цГМФ из клеток в кровь. Однако следует иметь в виду, что цГМФ сыворотки крови также отражает характер образования этого циклического нуклеотида мембранно-связанной изоформой гуанилатциклазы, активируемой натрийуретическими пептидами и присутствующей на поверхности многих клеток [32]. R. H. Boger et al. [33] предложили проводить одновременное количественное определение содержания в крови $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и цГМФ, при котором полученный результат может указывать как на нарушение синтеза NO, так и на его окислительную инактивацию. Поскольку у пренатально стрессированных самцов отсутствовали статистически значимые различия в содержании $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на фоне сниженного содержания цГМФ в сыворотке крови (по сравнению с соответствующими показателями у самцов группы «контроль»), можно судить об окислительной инактивации NO у таких животных, что согласуется с нашими результатами, демонстрирующими интенсификацию ПОЛ у пренатально стрессированных крыс.

Результаты выполненного исследования также свидетельствуют о том, что воздействие стрессоров на организм беременных крыс по-разному влияет на систему продукции NO у их потомства – самцов и самок. У самок, матери которых подвергались воздействию стрессоров во время беременности, изменения в системе продукции оксида азота были менее выражены. Одной из причин таких различий может быть влияние эстрогенов, которые способны модулировать биодоступность NO разными путями: посредством «геномного» механизма за счет увеличения экспрессии eNOS и «негеномного» – путем активации eNOS через фосфорилирование, а также посредством эстроген-зависимого уменьшения концентрации АДМА [34–36]. По-видимому, у пренатально стрессированных самок окислительный стресс был менее выражен. Повышенное содержание МДА в сыворотке крови самок, перенесших стресс в пренатальном периоде, без статистически значимого изменения концентрации ДК может быть объяснимо тем, что эстрогены, обладая антиоксидантным действием, могут нейтрализовать образование ДК как ранних продуктов ПОЛ. Однако в процессе такого «обезвреживания» (при условии значительного количества АФК) образуются производные соединения эстрогенов, которые затем сами могут выступать

в качестве оксидантов [37] и стимулировать образование МДА – «позднего» продукта ПОЛ.

В целом, у потомства крыс, которые подвергались воздействию стрессоров во время беременности, как у самок (в меньшей степени), так и у самцов (в большей степени), наблюдаются нарушения функционирования системы продукции оксида азота и воспаление низкой интенсивности, что указывает на повышенный риск развития сердечно-сосудистой патологии у таких организмов в виде повышения артериального давления, обнаруженного нами ранее [13], и ускоренного развития атеросклероза. Данные, полученные в нашем исследовании, не дают прямого ответа на вопрос о механизмах нарушений функционирования системы синтеза и действия оксида азота у пренатально стрессированных организмов. Тем не менее анализ научных данных по этой проблеме позволяет предположить наличие, по крайней мере, двух взаимосвязанных механизмов – эпигенетической регуляции активности генов, продукты которых участвуют в механизмах образования и действия NO, а также редокс-регуляции активности этих генов [18–20, 23–25, 29–30, 34–36].

Выводы

1. Воздействие стрессоров на беременных крыс способствует снижению концентрации eNOS, накоплению эндогенного ингибитора активности этого фермента АДМА и окислительной инактивации оксида азота в сыворотке крови их 3-месячного потомства – самцов, а также повышению концентрации iNOS в сыворотке крови пренатально стрессированных самцов и самок на фоне системного воспаления низкой интенсивности и интенсификации ПОЛ.

2. Выявленные изменения в функционировании системы оксида азота у пренатально стрессированных крыс-самцов могут свидетельствовать о высоком риске поражения у них сердечно-сосудистой системы.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzellie S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton C, Harris C, Roberts DD, Wink DA. The chemical biology of nitric oxide. Implications in cellular signaling // *Free Radic Biol Med*. 2008;45(1):18–31. Doi: 10.1016.
2. Vidanapathirana AK, Psaltis PJ, Bursill CA, Abell AD, Nicholls SJ. Cardiovascular bioimaging of nitric oxide: achievements, challenges, and the future // *Medicinal Research Reviews*. 2020;1–29. Doi: 10.1002/med.21736.
3. Кузнецов А. С. и др. Эндотелий. Физиология и патология: монография. – Одесса: Феникс, 2018. – С. 284. [Kuznecov AS. Endoteliy. *Physiologiya i patologiya: monograph*. 2018:284. (In Russ.)].
4. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine // *Biochem Soc Trans*. 1989;17(4):642–644. Doi: 10.1042/bst0170642.
5. Guilivi C. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide // *Mitochondrial Biology: New Perspectives: Novartis Found Symp*. 2007;(287):92–100. Doi: 10.1002/9780470725207.ch7.

6. Kapil V, Khambata RS, Jones DA, Rathod K, Primus C, Massimo G, Fukuto JM, Ahluwalia A. The noncanonical pathway for in vivo nitric oxide generation: the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway // *Pharmacol. Rev*. 2020;(72):692–766. Doi: 10.1124/pr.120.019240.
7. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases // *Vascul Pharmacol*. 2018;(100):1–19. Doi: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
8. Grandvuillemin I, Buffat C, Boubred F, Lamy E, Fromont J, Charpiot P, Simoncini S, Sabatier F, Dignat-George F, Peyter AC, Simeoni U, Yzydorczyk C. Arginase upregulation and eNOS uncoupling contribute to impaired endothelium-dependent vasodilation in a rat model of intrauterine growth restriction // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2018;315(3):509. Doi: 10.1152/ajpregu.00354.2017.
9. Ayuso M, Cruchten SV, Ginneken CV. Birthweight determines intestinal microvasculature development and alters endothelial nitric oxide synthase density in young piglets // *Anat. Histol. Embryol*. 2020;49(5):627–634. Doi: 10.1111/ah.12534.
10. Brain KL, Allison BJ, Niu Y, Cross CM, Itani N, Kane AD, Herrera EA, Skeffington KL, Botting KJ, Giussani DA. Intervention against hypertension in the next generation programmed by developmental hypoxia // *PLOS Biology* 2019. Doi: 10.1371/journal.pbio.2006552.
11. Hsu CN, Lin YJ, Tain YL. Maternal exposure to bisphenol A combined with high-fat diet-induced programmed hypertension in adult male rat offspring: effects of resveratrol // *Int J. Mol Sci*. 2019;20(18):4382. Doi: 10.3390/ijms20184382.
12. Weinstock M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior // *Neurobiol. Stress*. 2017;(6):3–13. Doi: 10.1016/j.ynstr.2016.08.004.
13. Хронический непредсказуемый стресс у беременных крыс и здоровье их потомства / Л. Е. Беляева, А. Н. Федченко, С. С. Лазуко, И. В. Лигецкая // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. – 2016. – Т. 102, № 7. – С. 852–863 [Belyaeva LE, Fedchenko AN, Lazuko SS, Ligeckaya IV. *Hronicheskij nepredskazuemyj stress u beremennyh krys i zdorov'e ih potomstva*. *Ross. fiziol. zhurn. im. IM. Sechenova*. 2016;102(7):852–863 (In Russ.)].
14. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Хмара Н. Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов // *Лаб. дело*. – 1988. – Т. 2. – С. 60–64. [Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of diene conjugates in plasma by ultraviolet absorption of heptane and isopropyl extracts. *Lab. business*. 1988;(2):60–64. (In Russ.)].
15. Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кушкун А. А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // *Лаб. дело*. – 1988. – Т. 11. – С. 41–43. [Andreeva LI, Kozhemyakin LA, Kishkun AA. Modification of the method for determining lipid peroxides in the test with thiobarbituric acid. *Lab. business*. 1988;(11):41–43. (In Russ.)].
16. Mir SA. An improved zinc reduction method for direct determination of nitrate in presence of nitrite // *As. J. Chem*. 2007;19(7):5703–5710.
17. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – С. 312. [Rebrova OYu. *Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA*. Moscow, Media-Sfera. 2002;312. (In Russ.)].
18. Krause BJ, Costello PM, Munoz-Urrutia E, Lillycrop KA, Hanson MA, Casanella P. Role of DNA methyltrans-

- ferase 1 on the altered eNOS expression in human umbilical endothelium from intrauterine growth restricted fetuses // *Epigenetics*. 2013;8(9):944–952. Doi: 10.4161/epi.25579.
19. Postberg J, Kanders M, Forcob S, Willems R, Orth V, Hensel KO, Weil PP, Wirth S, Jenke AC. CpG signalling, H2A.Z/H3 acetylation and microRNA-mediated deferred self-attenuation orchestrate foetal NOS3 expression // *Clin. Epigenetics*. 2015;(7):9. Doi: 10.1186/s13148-014-0042-4.
20. Herrera EA, Cifuentes-Zúñiga F, Figueroa E, Villanueva C, Hernández C, Alegria R, Arroyo-Jousse V, Peñaloza E, Farías M, Uauy R, Casanella P, Krause BJ. N-acetylcysteine, a glutathione precursor, reverts vascular dysfunction and endothelial epigenetic programming in intrauterine growth restricted guinea pigs // *J. Physiol.* 2017;595(4):1077–1092. Doi: 10.1113/JP273396.
21. Chen X, Qi L, Fan X, Tao H, Zhang M, Gao Q, Liu Y, Xu T, Zhang P, Su H, Tang J, Xu Z. Prenatal hypoxia affected endothelium-dependent vasodilation in mesenteric arteries of aged offspring via increased oxidative stress // *Hypertens. Res.* 2019;42(6):863–875. Doi: 10.1038/s41440-018-0181-7.
22. Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction // *Pflugers Arch.* 2010;460(6):965–974. Doi: 10.1007/s00424-010-0867-4.
23. Liu X, Xu X, Shang R, Chen Y. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as an important risk factor for the increased cardiovascular diseases and heart failure in chronic kidney disease // *Nitric Oxide*. 2018;(78):113–120. Doi: 10.1016/j.niox.2018.06.004.
24. Minhas R, Bansal Y, Bansal G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update // *Med. Res. Rev.* 2020;40(3):823–855. Doi: 10.1002/med.21636.
25. Dreger H, Ludwig A, Weller A, Baumann G, Stangl V, Stangl K. Epigenetic suppression of iNOS expression in human endothelial cells: a potential role of Ezh2-mediated H3K27me3 // *Genomics*. 2016;107(4):145–149. Doi: 10.1016/j.ygeno.2016.02.002.
26. Wang D, Xu B, Wang J, Wang H, Guo J, Ji H, Li S, Wu R, Yang H, Lian S. Response of the maternal hypothalamus to cold stress during late pregnancy in rats // *Brain Res.* 2019;(1722):146354. Doi: 10.1016/j.brainres.2019.146354.
27. Figueroa H, Alvarado C, Cifuentes J, Lozano M, Rocco J, Cabezas C, Illanes SE, Eixarch E, Hernández-Andrade E, Gratacós E, Irarrázabal CE. Oxidative damage and nitric oxide synthase induction by surgical uteroplacental circulation restriction in the rabbit fetal heart // *Prenat Diagn.* 2017;37(5):453–459. Doi: 10.1002/pd.5031.
28. Ridker PM. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection // *Circ Res.* 2016;118(1):145–156. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306656.
29. Aubert P, Oleynikova E, Rizvi H, Ndjim M, Le Berre-Scoul C, Grohard PA, Chevalier J, Segain JP, Le Drean G, Neunlist M, Boudin M. Maternal protein restriction induces gastrointestinal dysfunction and enteric nervous system remodeling in rat offspring // *H. FASEB J.* 2019;33(1):770–781. Doi: 10.1096/fj.201800079R.
30. Hu J, Ly J, Zhang W, Huang Y, Glover V, Peter I, Hurd YL, Nomura Y. Microbiota of newborn meconium is associated with maternal anxiety experienced during pregnancy // *Dev. Psychobiol.* 2019;61(5):640–649. Doi: 10.1002/dev.21837.
31. Grandvuillemin I, Buffat C, Boubred F, Lamy E, Fromonot J, Charpiot P, Simoncini S, Sabatier F, Dignat-George F, Peyter AC, Simeoni U, Zydorczyk C. Arginase up-regulation and eNOS uncoupling contribute to impaired endothelium-dependent vasodilation in a rat model of intrauterine growth restriction // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2018;315(3):509. Doi: 10.1152/ajpregu.00354.2017.
32. Sprenger JU, Nikolaev VO. Biophysical techniques for detection of cAMP and cGMP in living cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2013;(14):8025–8046. Doi: 10.3390/ijms14048025.
33. Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC. The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications // *Atherosclerosis*. 1996;(127):1–11. Doi: 10.1016/s0021-9150(96)05953-9.
34. Monsalve E, Oviedo P, Garciaperez M, Tarín J, Cano A, Hermenegildo C. Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2007;73(1):66–72. Doi: 10.1016/j.cardiores.2006.09.020.
35. Novella S, Laguna-Fernández A, Lózaró-Franco M, Sobrino A, Bueno-Beth C, Tarín JJ, Monsalve E, Sanchis J, Hermenegildo C. Estradiol, acting through estrogen receptor alpha, restores dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and nitric oxide production in oxLDL-treated human arterial endothelial cells // *Mol. and Cell. Endocrinol.* 2013;365(1):11–16. Doi: 10.1016/j.mce.2012.08.020.
36. Liao Q, Li X, Zhou S, Liu L, Zhao Sh, Lian Y, Dong HJ. Estrogen treatment inhibits vascular endothelial senescence and asymmetrical dimethylarginine in ovariectomized rabbits // *Cardiovasc. Pharmacol.* 2011;57(2):174–82. Doi: 10.1097/FJC.0b013e31820270bb.
37. Prokai L, Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Simpkins JW. Mechanistic insights into the direct antioxidant effects of estrogens // *Drug Dev. Res.* 2006;(66):118–125. Doi: 10.1002/ddr.20050.

Информация об авторах

Беляева Людмила Евгеньевна – канд. мед. наук, доцент, зав. кафедрой патологической физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь, e-mail: lyudm.belyaeva2013@yandex.by.

Павлюкевич Анна Николаевна – м. м. н., старший преподаватель кафедры патологической физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь, e-mail: anna.fedchenko.89@mail.ru.

Authors information

Belyaeva Lyudmila E. – Candidate of Medical Sciences, associate professor, head of the Chair of Pathologic Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus, e-mail: lyudm.belyaeva2013@yandex.by.

Pauliukevich Hanna N. – Master of Medical Sciences, senior lecturer of the Chair of Pathologic Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus, e-mail: anna.fedchenko.89@mail.ru.