

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821.6

**ОКСИД АЗОТА ВНОСИТ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ВКЛАД
В ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ АДАПТАЦИИ
К ГИПОКСИИ НА РАЗВИТИЕ СТРЕССОРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ
У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО—МОЛОДКИНОЙ****В.С. Кузенков, В.П. Реутов¹, А.Л. Крушинский, В.Б. Кошелев²,
Е.Г. Сорокина³, Л.М. Байдер⁴, З.В. Куроптева⁴, Л.Х. Комиссарова⁴***(кафедра физиологии человека и животных; e-mail: kouzenkov@mail.ru)*

Неселективный ингибитор NO-синтаза L-NNA (2,5 мг/100 г) уменьшал протекторный эффект кратковременной адаптации к гипоксии (1 ч, 5000 м над ур. моря) на развитие индуцированных акустическим стрессом нарушений у крыс Крушинского—Молодкиной, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам. Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) установлено увеличение продукции NO в крови и селезенки крыс, адаптированных к кратковременной гипоксии. Результаты исследования позволяют заключить, что NO вносит положительный вклад в защитный эффект при кратковременной адаптации к гипоксии.

Ключевые слова: адаптация к гипоксии, оксид азота, ЭПР метод.

Проведенные нами исследования показали, что кратковременная адаптация к умеренной гипоксии, соответствующей высоте 5000 м над ур. моря, оказывает значительный протекторный эффект на развитие стрессорных нарушений у крыс линии Крушинского—Молодкиной (КМ). Время гипоксической экспозиции составляло от 30 мин до 2 ч [1, 2, 3].

Созданная путем многолетней селекции генетическая модель судорожного припадка и сердечно-сосудистых нарушений является удобным объектом для исследований различных факторов, препятствующих или способствующих развитию стрессорных нарушений [4]. Эксперименты, проведенные на крысах этой линии, показали, что в результате длительного применения прерывистых звуковых раздражителей возникает резкое возбуждение мозга, которое сопровождается двигательными и вегетативными нарушениями, острыми нарушениями кровообращения и гибелью части животных от кровоизлияний в мозг [4].

Судорожный припадок является мощной функциональной нагрузкой на организм [5]. При эпилептическом статусе происходит значительное падение напряжения кислорода в нервной ткани [6, 7]. В мозге крыс линии КМ, подвергнутых акустическому стрессу, наблюдаются патологические изме-

нения нервных клеток и нейроглии, характерные для кислородной недостаточности [8]. Известно, что гипоксия мозга является одним из критических факторов при развитии внутричерепных кровоизлияний [2, 5].

Вероятно, протекторный эффект кратковременной адаптации к гипоксии на животных в условиях акустического стресса в значительной степени обусловлен улучшением утилизации кислорода тканями мозга в результате лучшей его доставки с кровью, что может обеспечиваться срочными реакциями адаптации [9]. Эти реакции реализуются прежде всего через увеличение скорости кровотока [10] и увеличение количества функционирующих капилляров [11].

Ранее нами было показано, что воздействие относительно низких доз (0,5 мг/100 г) NO-генерирующего соединения — нитрита натрия (NaNO_2) уменьшает развитие стрессорных нарушений у крыс линии КМ [12, 13]. Сходное протекторное действие оказывал предшественник оксида азота (NO) L-аргинин в дозе 20 мг/100 г [14]. Оксид азота, являясь активным вазодилататором [15—17], способен увеличивать скорость кровотока в мозге [18, 19] и, возможно, участвует в механизмах перехода резервных капилляров мозга в активные формы. Таким образом, это соединение может отвечать за реали-

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва.

² Кафедра нормальной и патологической физиологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

³ Научный центр здоровья детей РАМН, г. Москва.

⁴ Институт биохимической физики РАН, г. Москва.

зацию ряда срочных реакций адаптации к гипоксии. Способность NO ингибировать агрегацию тромбоцитов [16, 20] также может препятствовать ишемии мозга и развитию кровоизлияний в условиях акустического стресса. В то же время в литературе имеются данные о том, что умеренная гипоксия способствует усилению синтеза оксида азота [13, 21]. Возникает предположение, что оксид азота вносит положительную составляющую в реализацию защитного эффекта кратковременной адаптации к гипоксии на крыс линии КМ.

Материалы и методы

1. Исследовалось влияние неселективного ингибитора NO-синтазы L-NNA (N^W -нитро-L-аргинин, “Sigma”) на устойчивость животных, кратковременно адаптированных к умеренной экзогенной гипоксии в условиях акустического стресса. В экспериментах использовали 64 крысы линии КМ (самцы в возрасте 4,5 мес массой 200 ± 30 г). Животные были разделены на четыре группы по 16 животных в каждой серии. Первая группа служила контролем и находилась в условиях нормального атмосферного давления. Вторая группа помещалась на 1 ч в барокамеру, где создавали разрежение воздуха, соответствующее высоте 5000 м над уровнем моря. Третья группа, так же как и вторая, в течение первого часа находилась в барокамере, однако непосредственно перед “подъемом на высоту” животным внутрибрюшинно вводили L-NNA в дозе 2,5 мг/100 г. Четвертой группе животных за 1 ч до эксперимента вводили L-NNA в дозе 2,5 мг/100 г внутрибрюшинно без последующего “гипоксического” воздействия. Первой и второй группам животным за 1 ч до эксперимента вводили физиологический раствор в эквивалентном количестве. Акустическое воздействие проводили по ранее разработанной схеме [4]. После полутораминутного действия сильного электрического звонка (110–115 дБ) подавали серию сильных и слабых (80 дБ) акустических сигналов длительностью 10 с с десятисекундными интервалами между ними. Через 15 мин такого воздействия делали трехминутный перерыв и затем снова включали сильный звук в течение 1 мин. Во время акустического воздействия у контрольных и опытных крыс определяли параметры, характеризующие возбудимость центральной нервной системы: величину латентного периода, интенсивность и характер судорожного припадка. Также оценивали выраженность нарушений движений и смертность животных во время акустической экспозиции. Выделялись нарушения движений трех степеней: а) легкие нарушения движений (незначительные нарушения мышечного тонуса, не ограничивающие передвижение животного); б) средние нарушения движений (парез конечностей, чаще задних, затрудняющий передвижение);

в) тяжелые нарушения движений (животное практически теряет способность к передвижению). Сразу после окончания экспериментов животных декапитировали, мозг фиксировали в 10%-м растворе формалина. Площадь субдуральных и видимых субарахноидальных кровоизлияний определяли на бинокуляр-микрометре.

2. Исследовалась концентрация оксида азота (NO) в крови и селезенке крыс линии КМ, адаптированных к кратковременной экзогенной гипоксии по сравнению с контрольными животными. В эксперименте использовались 24 крысы линии КМ (самцы в возрасте 5 мес, массой 280–300 г). Адаптация к гипоксии проводилась в барокамере, где с помощью вакуумного насоса поддерживали разрежение воздуха, соответствующее высоте 5000 м над уровнем моря в течение одного часа. Концентрация NO определялась методом ЭПР. Спектр ЭПР образцов крови и селезенки регистрировали на спектрометре ESR-300 фирмы “Брукер” (ФРГ), оснащенным мини-ЭВМ, при температуре жидкого азота.

Достоверность различий средних в разных экспериментальных группах животных оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Достоверность процентных соотношений оценивалась с помощью критерия Фишера.

Результаты и обсуждение

Кратковременная адаптация к гипоксии значительно повысила устойчивость крыс линии КМ в условиях акустической экспозиции (рис. 1). В опытной группе снижена смертность по сравнению с контролем (0% и 18,8% соответственно, $p < 0,05$) и доля животных с тяжелыми нарушениями движений (0% и 68,7% соответственно, $p < 0,001$). Среди адаптированных к гипоксии животных значи-

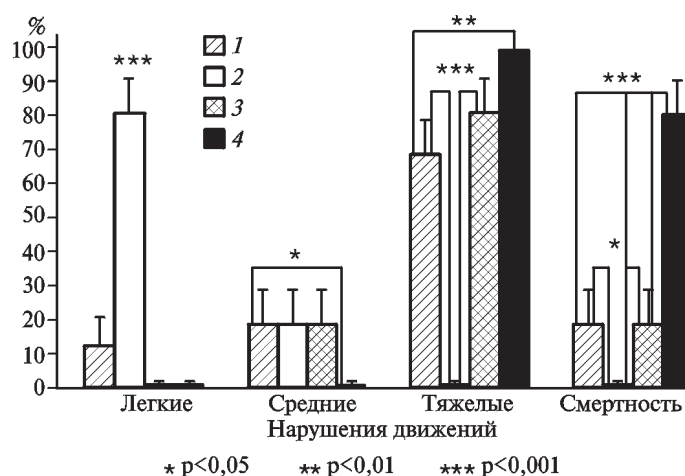


Рис. 1. Влияние кратковременной адаптации к гипобарической гипоксии и блокатора NO-синтазы (L-NNA) на устойчивость крыс линии КМ к акустическому стрессу. 1 — контроль; 2 — барокамера (5000 м); 3 — барокамера + L-NNA; 4 — L-NNA 2,5 мг/100 г. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

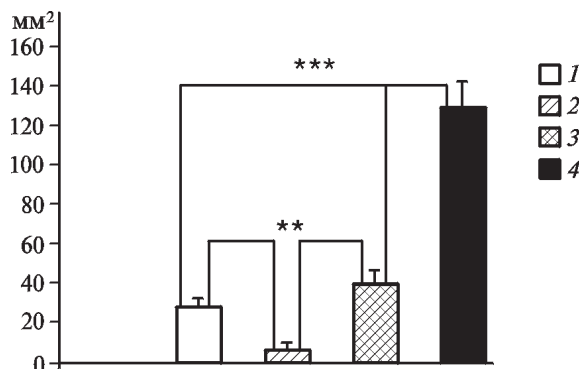


Рис. 2. Влияние кратковременной адаптации к гипобарической гипоксии и блокатора NO-синтазы (L-NNA) на развитие внутричерепных кровоизлияний у крыс линии КМ в условиях звукового стресса. 1 — контроль; 2 — барокамера (5000 м); 3 — барокамера + L-NNA; 4 — L-NNA 2,5 мг/100 г. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

тельно больше доля крыс с легкими нарушениями движений по сравнению с контрольными (81,2% и 12,5% соответственно, $p < 0,001$). Параметры, характеризующие возбудимость центральной нервной системы, также различались у обеих групп животных. Латентный период наступления судорожного припадка в опытной группе был значительно увеличен по сравнению с контролем ($4,5 \pm 0,4$ с и $2,5 \pm 0,2$ с соответственно, $p < 0,001$). В опытной группе уменьшена доля животных с максимальной интенсивностью судорожного припадка по сравнению с контролем (81,2% и 100% соответственно, $p < 0,05$). Кратковременная гипоксическая адаптация значительно уменьшала площади субдуральных и видимых субарахноидальных кровоизлияний по сравнению с контролем: $7,5 \pm 2,6$ мм² и $28,4 \pm 4,8$ мм² соответственно, $p < 0,01$ (рис. 2). Предварительное введение ингибитора NO-синтазы значительно ослабляло эффект гипоксической стимуляции (рис. 1).

Так, в группе животных, получавших L-NNA на фоне адаптации к гипоксии по сравнению с животными, получавшими на фоне адаптации к гипоксии физиологический раствор в эквивалентном количестве, была увеличена смертность (18,8% и 0% соответственно, $p < 0,05$) и доля животных с тяжелыми нарушениями движений (81,2% и 0% соответственно, $p < 0,001$). У животных, получавших L-NNA на фоне адаптации к гипоксии, была значительно увеличена площадь субдуральных и видимых субарахноидальных кровоизлияний: $39,9 \pm 7,2$ мм² и $7,5 \pm 2,6$ мм² соответственно, $p < 0,01$ (рис. 2). Параметры, характеризующие возбудимость централь-

ной нервной системы, достоверно не различались у обеих групп животных.

Наиболее тяжело акустическую экспозицию переносили животные, получавшие блокатор NO-синтазы без гипоксического воздействия (рис. 1). В этой группе значительно увеличена смертность по сравнению с контролем (81,2% и 18,8% соответственно, $p < 0,001$), увеличена доля животных с тяжелыми нарушениями движений (100% и 68,7% соответственно, $p < 0,01$). В группе животных, получавших L-NNA без гипоксического воздействия, значительно увеличена средняя площадь субдуральных и видимых субарахноидальных кровоизлияний по сравнению с контролем: $129,1 \pm 12,7$ мм² и $28,4 \pm 4,8$ мм² соответственно, $p < 0,001$ (рис. 2). Параметры, характеризующие возбудимость центральной нервной системы, в обеих группах животных достоверно не различались.

Проведенные исследования показали достоверное увеличение концентрации оксида азота (по интенсивности ЭПР-сигнала Hb-NO комплексов) в крови и селезенке у животных, адаптированных к кратковременной гипоксии по сравнению с контролем (рис. 3).

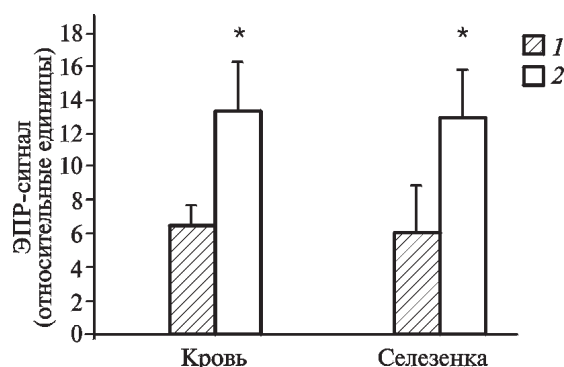


Рис. 3. Влияние кратковременной адаптации к гипобарической гипоксии на интенсивность ЭПР сигнала гемоглобин-NO комплексов у крыс линии КМ в крови и селезенке. 1 — контроль; 2 — барокамера (5000 м). * $p < 0,05$

Таким образом, значительное снижение протекторного эффекта адаптации к кратковременной экзогенной гипоксии на фоне блокатора NO-синтазы у крыс линии КМ в условиях акустической экспозиции может свидетельствовать о существенной роли оксида азота в реализации защитных механизмов гипоксической адаптации антистрессовой защиты. По-видимому, защитный эффект кратковременной адаптации к гипоксии частично реализуется через умеренную активацию синтеза оксида азота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ryasina T.V., Koshelev V.B., Krushinsky A.L., Lozhnikova S.M., Sotskaya M.N., Lyndrovskaya J.Y. The role of short-term hypobaric hypoxia in prevention of disorders

of the cerebral circulation in rats during acoustic stress // Brain Research. 1988. Vol. 473. P. 153—156.

2. Крушинский А.Л., Рясина Т.В., Кошелев В.Б., Сотская М.Н., Ларский Э.Г. Протекторное действие разных видов и режимов адаптации к гипоксии на развитие стрессорных повреждений у крыс линии КМ // Физиол. журн. СССР. 1989. Т. 75. № 11. С. 1576—1584.
3. Крушинский А.Л., Кошелев В.Б., Рясина Т.В., Яскин В.А., Кузенков В.С. Кратковременная гипоксическая стимуляция повышает устойчивость крыс линии КМ в условиях акустического стресса // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2001. № 3. С. 46—48.
4. Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии. М., 1960.
5. Кошелев В.Б. Структурная перестройка кровеносного русла при экспериментальной артериальной гипертензии и адаптации к гипоксии: Автореф. дис. ... докт. М., 1990.
6. Назаренко А.И. Значение гипоксии и адаптации к ней в течении экспериментальных судорожных припадков // Физиол. журн. УССР. 1966. Т. 52. № 5. С. 622—625.
7. Elger C.E., Wieser. Pathophysiologie der Epilepsie // Schweiz. med. Wochenschr. 1984. Vol. 114. N 38. P. 1278—1288.
8. Ничков С.В., Кривицкая Г.Н. Акустический стресс и церебровисцеральные нарушения. М.: Медицина, 1969. 231 с.
9. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. М., 1981. 230 с.
10. Иванов К.П., Левкович Ю.И., Калинина М.К. Скорость кровотока в капиллярах мозга при гипоксии // Докл. АН СССР. 1977. Т. 235. № 6. С. 1449—1452.
11. Francois-Dainville E., Bucweitz E., Weiss H.R. Effect of hypoxia on percent of arteriolar and capillary beds perfused in the rat brain // J. Appl. Physiology. 1986. Vol. 60. N 1. P. 280—288.
12. Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Кошелев В.Б. Влияние нитрита натрия (NO-генерирующего соединения) на развитие стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского—Молодкиной // Роль нейромедиаторов и

регуляторных пептидов в процессах жизнедеятельности. Минск, 1999. С. 162—164.

13. Реутов В.П., Кузенков В.С., Крушинский А.Л., Кошелев В.Б., Рясина Т.В., Левшина И.П., Шуйкин Н.Н., Косицын Н.С., Айрапетянц М.Г. Развитие стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского—Молодкиной, генетически предрасположенных к судорожным припадкам, при действии NO-генерирующего соединения и блокатора NO-синтазы // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2002. № 1. С. 5—10.

14. Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П., Кошелев В.Б., Алексеенко А.А., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С. Влияние L-аргинина на развитие стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского—Молодкиной // Новости медико-биологических наук. 2004. № 1. С. 61—64.

15. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // Nature. 1987. Vol. 327. P. 524—527.

16. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода — новый класс сигнальных молекул // Усп. физиол. наук. 1996. Т. 27. № 4. С. 30—43.

17. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 3—5.

18. Zhang F., Iadecola C. Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after local ischemia // NeuroReport. 1993. Vol. 4. N 5. P. 559—562.

19. Каменский А.А., Савельева К.В. Оксид азота и поведение. М., 2002.

20. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets // Br. J. Pharmacol. 1987. Vol. 92. P. 181—187.

21. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Архипенко Ю.В. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 17—21.

Поступила в редакцию
14.12.07

NITRIC OXIDE PLAYS A ROLE IN THE PROTECTIVE EFFECTS OF SHORT-TERM ADAPTATION TO HIPOXIA ON THE STRESS-INDUCED DISORDERS IN RATS OF KRUSHINSKY—MOLODKINA STRAIN

V.S. Kuzenkov, V.P. Reutov, A.L. Krushinsky, V.B. Koshelev, E.G. Sorokina, L.M. Baider, Z.V. Kuropteva, L.Kh. Komissarova

The NO-synthase inhibitor LNNA (2,5 mg/100 g) abolished the protective effects of short-term adaptation to hypoxia (1 hour, 5000 m above sea level) on the development of stress-induced disorders on the model of acoustic stress in the Krushinsky—Molodkina rats genetically predisposed to audiogenic seizures. Using electronic spine resonance method (ESR) we also demonstrated an increase in NO production during short-term hypoxia in the blood and spleen. The results suggest that NO plays a positive role in protective effects of short-term adaptation to hypoxia.

Key words: adaptation to hypoxia, nitric oxide, ESR method.

Сведения об авторах

Кузенков Виктор Сергеевич — канд. биол. наук, ст. лаб. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. (495) 304-81-17; e-mail: kouzenkov@mail.ru

Реутов Валентин Палладиевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел. (495) 390-85-96; e-mail: valeninreutov@mail.ru

Крушинский Алексей Леонидович — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел. (499) 238-32-81; e-mail: krushinsky@pochta.ru

Кошелев Владимир Борисович — докт. биол. наук, проф. кафедры нормальной и патологической физиологии факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел. (495) 932-89-32; e-mail: koshelev@fbm.msu.ru

Сорокина Елена Геннадиевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. Научного центра здоровья детей РАМН. Тел. (495) 390-85-96; e-mail: sorokina@nczd.ru

Байдер Лариса Михайловна — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. Института биохимической физики РАН. Тел. 613-60-33; e-mail: lmbaider@mail.ru

Куроптева Зоя Веняминовна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. Института биохимической физики РАН. Тел. (499) 193-28-26; e-mail: zvk@sky.chph.ru

Комиссарова Любовь Хачиковна — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. Института биохимической физики РАН. Тел. (495); e-mail: komissarova@mail.ru