

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821.6

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА НАТРИЯ НА РАЗВИТИЕ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА У КРЫС ПРИ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА**В.С. Кузенков, А.Л. Крушинский, В.П. Реутов¹***(кафедра физиологии человека и животных; кафедра высшей нервной деятельности)*

Было изучено дозозависимое влияние нитрата натрия (NaNO_3) на динамику неврологических нарушений и смертность крыс в результате ишемии мозга, вызванной одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий. NaNO_3 в дозах 50 мг/1000 г и 500 мг/1000 г уменьшал тяжесть неврологических нарушений и смертность крыс. NaNO_3 в дозе 5 мг/1000 г не оказывал достоверного эффекта.

Ключевые слова: нитраты, оксид азота, ишемия мозга.

В настоящее время проблема воздействия нитритов и нитратов на организм человека и животных приобретает все большее значение. Это связано прежде всего с увеличением использования данных соединений в промышленности, сельском хозяйстве, фармакологии и медицине. С продуктами питания, водой, воздухом и медицинскими препаратами эти вещества поступают в живые организмы. Нитриты и нитраты способны эндогенно синтезироваться в организме из L-аргинина с образованием в качестве промежуточного соединения оксида азота [1–3]. Оксид азота (NO) является важным регулятором физиологических функций у человека и животных в норме и патологии [3–7]. Интерес к NO в большей степени обусловлен разнообразием его физиологических функций. Оксид азота участвует в синаптической передаче и способствует выделению нейромедиаторов, выполняет роль активного вазодилатора, ингибирует агрегацию тромбоцитов [8–11]. Наряду с регуляторными функциями NO обладает нейротоксическими свойствами, которые проявляются в условиях избыточного синтеза [12]. Основным субстратом синтеза этого вещества является L-аргинин. Синтез NO происходит под действием NO-синтазы. Оксид азота и продукты его метаболизма способны участвовать в циклических взаимопревращениях [1]. Поэтому NO может образовываться не только из L-аргинина, но и из ионов NO_2 , которые восстанавливаются в NO при участии гемсодержащих белков. Ионы NO_2 в свою очередь могут образовываться путем восстановления ионов NO_3 под действием нитратредуктаз [13–15]. Особенно интенсивно такой ряд трансформации $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}$ протекает в условиях дефицита кислорода [16–19].

В предыдущих исследованиях нами было показано протекторное влияние NO-генерирующих соединений и L-аргинина на действие стрессирующего фактора, приводящего к сердечно-сосудистым нарушениям и внутричерепным кровоизлияниям [20–22].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния нитрата натрия (NaNO_3) на динамику неврологических нарушений и смертность животных в результате ишемии мозга, вызванной одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий.

Материалы и методы

В опытах использовали 84 самца крыс линии Вистар массой 120–150 г. Были проведены три серии экспериментов.

Опытную группу животных в каждой серии составляли крысы с ишемией мозга. Для создания дефицита кровоснабжения мозга применяли классическую модель неполной глобальной ишемии, вызванной одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий [23–24]. Крысам под эфирным наркозом отсепааровывали и перевязывали общие сонные артерии. За 60 мин до перевязки сонных артерий животным вводили нитрат натрия в дозах 5 мг/1000 г (1-я серия), 50 мг/1000 г (2-я серия) и 500 мг/1000 г (3-я серия). Контрольную группу в каждой серии составляли ложнопериорированные крысы, которым под эфирным наркозом отсепааровывали и перевязывали общие сонные артерии. За 60 мин до окончания операции животным вводили физиологический раствор в эквивалентном количестве. Длительность операции в обеих группах составляла не более 10 мин, затем крысы быст-

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

ро восстанавливались после эфирного наркоза. После этого животных помещали в отдельные клетки и визуально оценивали динамику развития неврологического дефицита в баллах по методике балльной оценки неврологического состояния крыс после двухсторонней перевязки общих сонных артерий [25]. Основные признаки неврологического дефицита включали ограничение подвижности животного, птоз, гиперактивное поведение, насильственные движения (вращения, прыжки, судорожные и вращательные припадки), парезы конечностей, кому и смерть. По шкале балльной оценки легкая степень неврологической симптоматики составляет от 0 до 3 баллов (состояние, близкое к норме); средняя степень — от 3 до 6 баллов; тяжелая степень — от 7 до 24 баллов; 25 баллов — смерть. Неврологический дефицит отдельно взятого животного оценивали через каждые 30 мин в течение 8 ч. Суммарный балл неврологического дефицита по каждому промежутку времени усредняли для всех животных в группе. На основе полученных данных строили графики динамики неврологических нарушений, отложив по оси ординат баллы, по оси абсцисс — время. Оценку летальности проводили по гистограммам, отражающим процент выживших и умерших животных. Для статистического анализа полученных данных по динамике неврологического дефицита использовали дисперсионный факторный анализ ANOVA. Для оценки летальности неврологических проявлений применяли критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов (NaNO_3 в дозе 5 мг/1000 г) при оценке динамики неврологического дефицита и смертности у крыс статистически достоверных различий между опытными и контрольными животными выявлено не было.

Во второй серии экспериментов нитрат натрия в дозе 50 мг/1000 г оказал некоторое протекторное влияние на неврологический дефицит у крыс линии Вистар. Это проявилось в менее интенсивном развитии тяжелой неврологической симптоматики и смертности у опытных животных по сравнению с контрольными. Так, на временном интервале 210—420 мин видно, что интенсивность нарастания неврологического дефицита у опытной

группы крыс ниже, чем у контрольной группы (рис. 1). Смертность в опытной группе животных была также достоверно ниже, чем в контрольной группе (рис. 3, а).

В третьей серии экспериментов нитрат натрия в дозе 500 мг/кг оказал наибольшее протекторное действие на крыс с окклюзией двух сонных артерий, о чем свидетельствует наименее интенсивное нарастание неврологических нарушений в опытной группе животных по сравнению с контрольными крысами (рис. 2). Снижение нарастания неврологического дефицита у опытных животных по сравнению с контрольными начинается с 60 мин и продолжается до конца эксперимента. Смертность у крыс, которым вводили нитрат натрия в дозе 500 мг/кг, была достоверно ниже ($p < 0,01$), чем у контрольных животных (рис. 3, б).

Таким образом, нами было показано дозозависимое влияние нитрата натрия на развитие неврологических нарушений и смертность животных, вы-

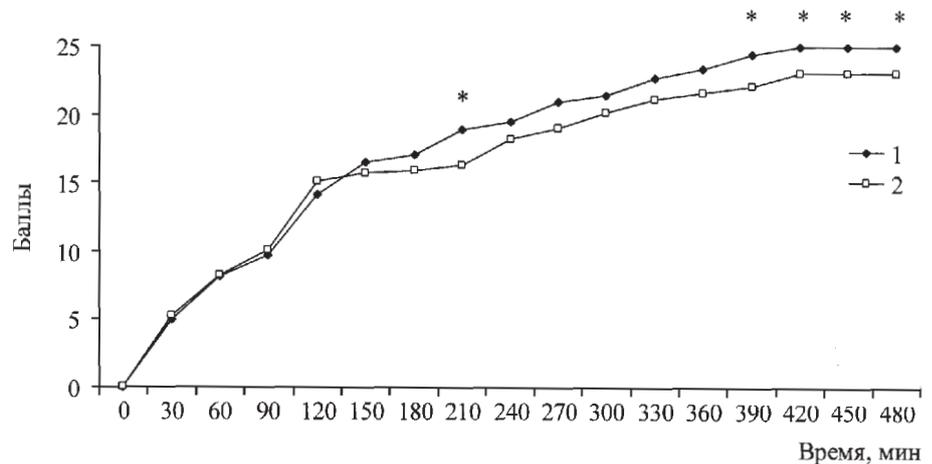


Рис. 1. Влияние NaNO_3 в дозе 50 мг/1000 г на развитие неврологического дефицита при неполной глобальной ишемии мозга: 1 — контроль, $n = 14$; 2 — опыт, $n = 14$; * $p < 0,05$

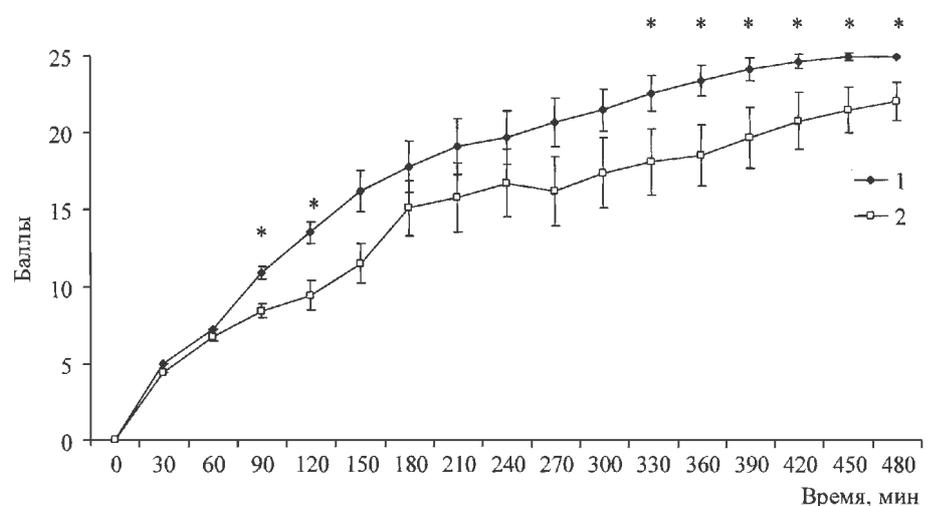


Рис. 2. Влияние NaNO_3 в дозе 500 мг/1000 г на развитие неврологического дефицита при неполной глобальной ишемии мозга: 1 — контроль, $n = 14$; 2 — опыт, $n = 14$; * $p < 0,05$

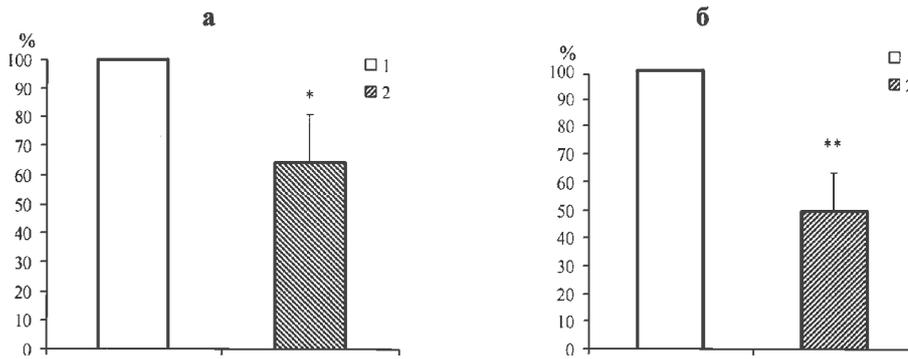


Рис. 3. Влияние NaNO₃ на смертность крыс при неполной глобальной ишемии мозга: а) 1 — контроль, n = 14; 2 — NaNO₃ в дозе 50 мг/1000 г, n = 14; *p < 0,05; б) 1 — контроль, n = 14; 2 — NaNO₃ в дозе 500 мг/1000 г, n = 14; **p < 0,01

званных одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий. Известно, что окклюзия двух сонных артерий вызывает развитие острой церебральной ишемии и запускает каскад патобиохимических реакций в головном мозге, вызывая повреждения нейронов и глии [23]. Протекторный эффект нитрата натрия в дозах 50 и 500 мг/1000 г можно объяснить тем, что нитраты трансформируются в нитриты, которые в свою очередь становятся источником NO. Известно, что в условиях гипоксии/ишемии мозга возрастает ферментативная активность нитратредуктазы и нитритредуктазы, которые осуществляют цепь превращений NO₃ → NO → NO [1, 15].

Оксид азота, являясь сильным вазодилататором, способен увеличивать скорость кровотока в мозге [3, 26], ингибировать агрегацию тромбоцитов [5, 8]. Поэтому оксид азота может уменьшать гипоксию/ишемию мозга, возникающие в результате перевязки сонных артерий. Этим можно объяснить меньшее проявление неврологических нарушений и снижение смертности в опытных группах. Кроме того, умеренное повышение содержания оксида азота и продуктов его метаболизма индуцирует пространственное перераспределение белков из растворимого в мембранно-связанное состояние. При этом может значительно увеличиваться как стабильность этих белков, так и стабильность мембран. Также могут активироваться многие ферментные системы, включая ферменты гликолиза, участвующие в синтезе АТФ [1], что также может снижать последствия ишемии и гипоксии мозга, возникающие в результате перевязки сонных артерий. Отсутствие протекторного влияния нитрата натрия в дозе 5 мг/1000 г, вероятно, связано с недостаточным уровнем синтеза NO из-за низкой концентрации нитрата натрия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 156 с.
2. Раевский К.С., Башкатова В.Г., Ванин А.Ф. Роль оксида азота в глутаматергической патологии мозга // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 11—15.
3. Каменский А.А., Савельева К.В. Оксид азота и поведение. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2002. С. 156.
4. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // Pharmacol. Rev. 1992. Vol. 43. P. 109—142.
5. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода — новый класс сигнальных молекул // Усп. физиол. наук. 1996. Т. 27. № 4. С. 30—43.
6. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 1029—1040.
7. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2000. № 4. С. 3—5.
8. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor // Nature. 1987. Vol. 327. P. 524—527.
9. Гурин А.В. Функциональная роль оксида азота в центральной нервной системе // Усп. физиол. наук. 1997. Т. 28. № 1. С. 53—60.
10. Дьяконова Т.Л., Реутов В.П. Влияние нитрита на возбудимость нейронов мозга виноградной улитки // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1998. Т. 84. № 11. С. 1264—1272.
11. Ситдикова Г.Ф., Зефиоров А.Л. Газообразные посредники в нервной системе // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92. № 7. С. 872—882.
12. Башкатова В.Г., Раевский К.С. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 1020—1028.
13. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицин Н.С., Охотин В.Е. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности. М.: Изд-во УРСС, 2003. С. 94.
14. Lundberg J.O., Weitzberg E. NO Generation from nitrite and its role in vascular control // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005. Vol. 25. P. 915—922.
15. Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R.T., Leaf C.D., Wishnok J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate // Biochemistry. 1988. Vol. 27. P. 8706—8711.
16. Millar T.M., Stevens C.R., Blake D.R. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ishaemia // Biochem. Soc. Trans. 1997. Vol. 25. N 3. P. 528—531.
17. Samouilov A., Li H., Liu X., Zweier J.L. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues // Biochemistry. 2003. Vol. 2. P. 1150—1159.
18. Martin H.M., Hancock J.T., Salisbury V., Harrison R. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent // Infection and Immunity. 2004. Vol. 72. N 9. P. 4933—4939.

19. Gladwin M.T. Hemoglobin as nitrite reductase regulating red cell-dependent hypoxic vasodilatation // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2005. Vol. 32. N 5. P. 363–366.

20. Крушинский А.Л., Рясина Т.В., Кошелев В.Б., Состская М.Н., Бебинов Е.М., Белых А.Г., Стрелков Р.Б., Коршунова Т.С., 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.

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

22. Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П., Кошелев В.Б., Алексеенко А.А., Сорокина Е.Г., Косицин Н.С.

Влияние L-аргинина на развитие стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского—Молодкиной // *Новости медико-биологических наук.* 2004. № 1. С. 61–64.

23. Hossman K.-A. Experimental models for the investigation of brain ischemia // *Cerebrovasc. Res.* 1988. Vol. 39. P. 106–120.

24. Кошелев В.Б. Структурная перестройка кровеносного русла при экспериментальной гипертензии и адаптации к гипоксии: механизмы и регуляторные последствия: Дис. ... докт. биол. наук. М., 1990.

25. Саркисов К.Ю., Опиц Б., Оеме П. Влияние фрагмента субстанции P (3–4) на течение ишемии мозга у крыс с разным типом поведения // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 1996. Т. 121. № 4. С. 399–403.

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

Поступила в редакцию
28.10.09

SODIUM NITRATE EFFECT ON DEVELOPMENT OF NEUROLOGICAL DEFICIENCY IN RATS AFTER SEMI-GLOBAL BRAIN ISHEMIA

V.S. Kouzenkov, A.L. Krushinsky, V.P. Reutov

Dose-dependent effects of sodium nitrate (NaNO_3) on the dynamic of neurological disorders after brain ischemia induced by bilateral occlusion of common carotid artery were investigated in rats of Wistar line. NaNO_3 at 50 and 500 mg/1000 g decreased the death-rate and neurological disorders. NaNO_3 at 5 mg/1000 g had no effect.

Key words: nitric oxide, sodium nitrate, brain ischemia.

Сведения об авторах

Кузенков Виктор Сергеевич — канд. биол. наук, ст. лаб. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. (495)303-81-17; e-mail: kouzenkov@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

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