

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821.6

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА КАЛИЯ НА НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

В.С. Кузенков, А.Л. Крушинский, В.П. Реутов*

(кафедра физиологии человека и животных; кафедра высшей нервной деятельности;
e-mail: kouzenkov@mail.ru)

Было изучено влияние нитрата калия (KNO_3) на динамику неврологических нарушений и смертность крыс в результате ишемии мозга, вызванной одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий. KNO_3 в дозе 5 мг/1000 г, введенный за 60 мин и перед окклюзией обеих сонных артерий, достоверно уменьшал тяжесть неврологических нарушений и смертность крыс.

Ключевые слова: нитраты, оксид азота, ишемия мозга.

Нитрат калия (KNO_3) известен человеку несколько тысячелетий. С XII в. на Западе нитрат калия (серебряный нитрат, или лунный каустик) применялся для лечения различных заболеваний. Он был предписан как противогрибковое и противовоспалительное средство, применялся как мочевой антисептик и мочегонное средство, для лечения оспы, бубонной чумы и лихорадки, использовался как успокаивающий агент против конвульсий, для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. В то же время большие дозы нитратов могут оказывать повреждающее воздействие на организм [3, 4].

Нитраты могут поступать в организм не только с пищей и водой, но и образовываться эндогенно. Большие концентрации нитратов, нитритов и оксида азота обнаруживаются при многих заболеваниях, особенно при различных патологиях мозга, в частности при инсультах [5, 6]. Известно, что эти вещества в организме способны участвовать в циклических взаимопревращениях [7–9]. NO может образовываться не только из L-аргинина, но и из ионов NO_2^- , которые восстанавливаются в NO при участии металлсодержащих белков (ксантиноксидазы, ксантиноксидоредуктазы и др.). Ионы NO_2^- в свою очередь могут образовываться путем восстановления ионов NO_3^- под действием нитратредуктаз [10–13]. Особенно интенсивно такой ряд трансформации $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ протекает в условиях дефицита кислорода, которым сопровождается ишемия мозга [14, 15].

Свои терапевтические свойства нитраты и нитриты реализуют в основном через оксид азота (NO), который также образуется эндогенно из аминокислоты L-аргинина под действием NO-синтаз [16–18]. Оксид азота — важный регулятор разнообразных фи-

зиологических функций у человека и животных как в норме, так и при патологии [19–22]. Оксид азота участвует в синаптической передаче, ингибирует агрегацию тромбоцитов, играет роль активного вазодилататора, что особенно важно при ишемии мозга [23–25]. В условиях избыточного синтеза NO обладает нейротоксическими свойствами [26].

Выше было отмечено, что интенсивное превращение нитратов в нитриты и NO осуществляется в условиях гипоксии/ишемии. Но на активность нитрат/нитритредуктаз влияют также катионы моновалентных и двухвалентных металлов, сопутствующие аниону. Падение нитратредуцирующей активности отмечено в ряду: K^+ , Na^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+ , Ba_2^+ [27]. Учитывая этот факт, можно ожидать, что дозировка экзогенно введенного нитрата будет зависеть и от его катиона, сопутствующего аниону (NO_3^-). Ранее нами было установлено защитное действие нитрата натрия (NaNO_3) в дозе 50 мг/1000 г, поскольку нитратредуцирующая активность катиона K^+ выше катиона Na^+ , предполагается, что нитрат калия (KNO_3) будет в более низкой дозе проявлять аналогичные протекторные свойства, но в более низкой концентрации, чем NaNO_3 .

Целью настоящей работы было изучение влияния нитрата калия в дозе 5 мг/1000 г, введенного внутрибрюшинно непосредственно перед окклюзией обеих сонных артерий и за 60 мин до окклюзии обеих сонных артерий, на динамику неврологических нарушений и смертность животных.

Материалы и методы исследований

В опытах использовали 72 самца крыс линии Wistar массой 100–130 г. Все группы животных со-

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

ставляли крысы с неполной глобальной ишемией мозга. Для создания дефицита кровоснабжения мозга применяли классическую модель неполной глобальной ишемии, вызванной одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий [28]. Крысам под эфирным наркозом отсепааровывали и перевязывали общие сонные артерии. Первой опытной группе (1-я группа) вводили нитрат калия (KNO_3) в дозе 5 мг/1000 г внутривентриально непосредственно (не более 1 мин) перед окклюзией обеих сонных артерий, $n = 23$. Второй опытной группе крыс (2-я группа) вводили нитрат калия в дозе 5 мг/1000 г внутривентриально за 60 мин до окклюзии обеих сонных артерий, $n = 23$. Контрольную группу (3-я группа) составляли животные, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном количестве, $n = 23$. Длительность операции составляла не более 10 мин, затем крысы быстро восстанавливались после эфирного наркоза. После операции животных помещали в отдельные клетки и визуально оценивали динамику развития неврологического дефицита в баллах по методике балльной оценки неврологического состояния крыс после двусторонней перевязки общих сонных артерий [29]. 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 0–3 балла (состояние, близкое к норме); средняя степень — 3–6 баллов; тяжелая степень — 7–24 балла; 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 статического анализа полученных данных по динамике неврологического дефицита использовали непараметрический тест Манна–Уитни с использованием компьютерной программы “Statistika 6”. Для оценки летальности неврологических проявлений применяли критерий Фишера.

Результаты исследований и их обсуждение

Нитрат калия в дозе 5 мг/1000 г оказал достоверное протекторное влияние на неврологический дефицит у крыс линии Вистар в обеих опытных группах. Это проявилось в менее интенсивном развитии тяжелой неврологической симптоматики и смертности у опытных животных по сравнению с контрольными крысами. Так, на временном интервале 120–480 мин видно, что интенсивность нарастания неврологического дефицита у опытных групп крыс ниже, чем у контрольной группы (рис. 1). Смертность в опытных группах животных была также достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе (рис. 2).

Таким образом, нами было показано защитное влияние нитрата калия на развитие неврологических

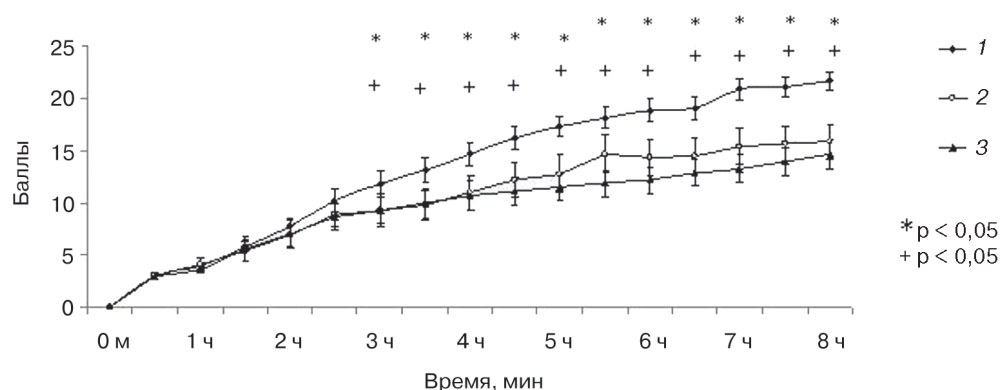


Рис. 1. Влияние KNO_3 в дозе 5 мг/1000 г на развитие неврологических нарушений у крыс при экспериментальной ишемии мозга.

1 — контроль, $n = 23$; 2 — KNO_3 в дозе 5 мг/1000 г, введенный перед окклюзией обеих сонных артерий, $n = 23$; 3 — KNO_3 в дозе 5 мг/1000 г, введенный за 60 мин до окклюзии обеих сонных артерий, $n = 23$; * $p < 0,05$ — достоверность между 1-й и 3-й группами, + $p < 0,05$ — достоверность между 1-й и 2-й группами

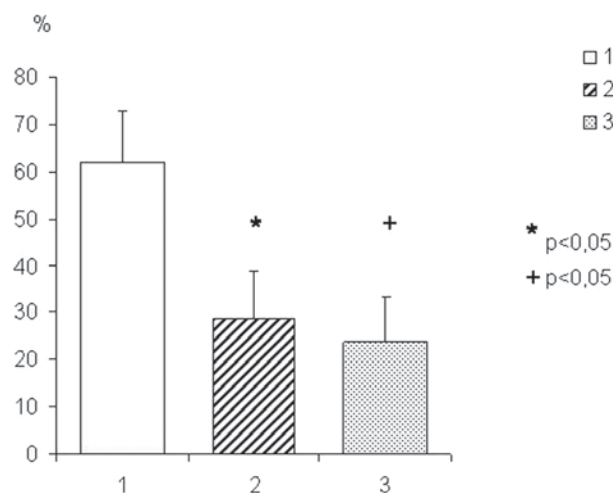


Рис. 2. Влияние KNO_3 на смертность крыс при экспериментальной ишемии мозга.

1 — контроль, $n = 23$; 2 — KNO_3 в дозе 5 мг/1000 г, введенный перед окклюзией обеих сонных артерий, $n = 23$; 3 — KNO_3 в дозе 5 мг/1000 г, введенный за 60 мин до окклюзии обеих сонных артерий, $n = 23$; * $p < 0,05$ — достоверность между 1-й и 2-й группами, + $p < 0,05$ — достоверность между 1-й и 3-й группами

нарушений и смертность животных, вызванных одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий. Известно, что окклюзия обеих сонных артерий вызывает развитие острой церебральной ишемии и запускает каскад патофизиохимических реакций в головном мозге, вызывая повреждения нейронов и глии [30]. Протекторное влияние нитрата калия в дозе 5 мг/1000 г можно объяснить тем, что в условиях гипоксии/ишемии мозга возрастает ферментативная активность нитратредуктаз и нитритредуктаз, которые осуществляют цепь превращений $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ [31]. Известно, что оксид азота, являясь сильным вазодилататором, способен увеличивать скорость кровотока в мозге, ингибировать агрегацию тромбоцитов [32]. Поэтому оксид азота может уменьшать гипоксию/ишемию мозга, возникающую в результате перевязки сонных артерий. Индуцируется пространственное перераспределение белков из растворимого в мембранно-связанное состояние. При этом может значительно увеличиваться

как стабильность этих белков, так и стабильность мембран. Могут активироваться многие ферментные системы, включая ферменты гликолиза, участвующие в синтезе АТФ, что также может снижать последствия ишемии и гипоксии мозга, возникающие в результате перевязки сонных артерий.

Важно отметить, что в предыдущих исследованиях нитрат натрия NaNO_3 в дозе 5 мг/1000 г не оказывал достоверного протекторного влияния на развитие неврологического дефицита и смертности у крыс. В тех же экспериментах нитрат натрия NaNO_3 в дозе 50 мг/1000 г оказывал достоверное защитное действие. Таким образом, из результатов настоящего исследования следует, что нитрат калия оказывает аналогичный защитный эффект в дозе значительно меньшей (на порядок), чем нитрат натрия. Это можно объяснить более сильным влиянием иона K^+ на активность ферментов, осуществляющих цепь химических реакций трансформации нитратов в оксид азота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rao A.M., Dogan A., Hatcher J.F., Dempsey R.J. Fluorometric assay of nitrite and nitrate in brain tissue after traumatic brain injury and cerebral ischemia // *Brain Res.* 1998. Vol. 18. N 793. Pt. 1. P. 265; Pt. 2. P. 1—70.
2. Webb A.J., Patel N., Loukogeorgakis S., Okorie M., Aboud Z., Misra S., Rashid R., Miall P., Deanfield J., Benjamin N., MacAllister R., Hobbs A.J., Ahluwalia A. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite // *Hypertension.* 2008. Vol. 51. P. 784—790.
3. Hogg N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 28. P. 1478—1486.
4. Maekawa A., Ogiu T., Onodera H., Furuta K., Matsuoaka C., Ohno Y., Odashima S. Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats // *Food and Chem. Toxicol.* 1982. Vol. 20. P. 25—33.
5. Chen S.M., Swilley S., Bell R., Rajanna S., Reddy S.L., Rajanna B. Lead induced alterations in nitrite and nitrate levels in different regions of the rat brain // *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 2000. Vol. 125. N 3. P. 315—323.
6. Millar T.M., Stevens C.R., Blake D.R. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischemia // *Biochem. Soc. Trans.* 1997. Vol. 25. N 3. P. 528—531.
7. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косичин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М., 1997. 140 с.
8. Hille R. The mononuclear molybdenum enzymes // *Chem. Rev.* 1996. Vol. 96. P. 2757—2816.
9. Yoshida K., Kasama K., Kitabatake M., Imai M. Bio-transformation of nitric oxide, nitrite and nitrate // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1983. Vol. 52. P. 103—115.
10. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // *Биохимия.* 1998. Т. 63. № 7. С. 1029—1040.
11. Jansson E.A., Huang L., Malkey R., Govoni M., Nihlen C., Olsson A., Stensdotter M., Petersson J., Holm L., Weitzberg E., Lundberg J.O. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis // *Nat. Chem. Biol.* 2008. Vol. 4. P. 411—417.
12. Li H., Samouilov A., Liu X., Zweier J.L. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 16939—16946.
13. Zweier J.L., Samouilov A., Kuppusamy P. Nonenzymatic nitric oxide synthesis in biological systems // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1411. N 2—3. P. 250—262.
14. Кузенков В.С., Крушинский А.Л., Реутов В.П. Влияние нитрата натрия на развитие неврологического дефицита у крыс при неполной глобальной ишемии мозга // *Вестн. Моск. ун-та.* 2011. Сер. 16. Биология. № 1. С. 3—6.
15. Bolan J.P., Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia // *Rev. Biochim. Biophys. Acta.* 1999. P. 415—436.
16. Каменский А.А., Савельева К.В. Оксид азота и поведение. М., 2002. 120 с.
17. Bryan N.S. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. Vol. 41. P. 691—701.
18. Gladwin M.T., Raat N.J., Shiva S., Dezfulian C., Hogg N., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol. 291. P. 2026—2035.
19. Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. Газообразные посредники в нервной системе // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2006. Т. 92. № 7. С. 872—882.
20. Ignarro L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview // *J. Physiol. Pharmacol.* 2002. Vol. 53. P. 503—514.
21. 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.

22. *Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* 1992. Vol. 43. P. 109—142.
23. *Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Дьяконова В.Е., Реутов В.П.* Влияние ингибиторов индуцибельной и нейрональной NO-синтазы на развитие аудиогенных стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского—Молодкиной // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2010. Т. 150. № 7. С. 38—41.
24. *Iadecola C.* Bright and dark sides of nitric oxide in ischemia brain injury // *Trend. Neurosci.* 1997. Vol. 20. P. 132—139.
25. *Jung K.H., Chu K., Ko S.Y., Lee S.T., Sinn D.I., Park D.K., Kim J.M., Song E.C., Kim M., Roh J.K.* Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury // *Stroke.* 2006. Vol. 37. P. 2744—2750.
26. *Гурин А.В.* Функциональная роль оксида азота в центральной нервной системе // *Усп. физиол. наук.* 1997. Т. 28. № 1. С. 53—60.
27. *Храмов В.А., Комарова В.И., Темкин Э.С.* Антибиотики как ингибиторы нитратредуктазы ротовой жидкости человека // *Стоматология.* 2000. № 2. С. 4—5.
28. *Hossmann K.A.* Experimental models for the investigation of brain ischemia // *Circ. Res.* 1988. Vol. 39. P. 106—120.
29. *Саркисов К.Ю., Опиц Б., Оеме П.* Влияние фрагмента субстанции Р (3—4) на течение ишемии мозга у крыс с разным типом поведения // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 1996. Т. 121. № 4. С. 399—403.
30. *Марков Х.М.* Окись азота и окись углерода — новый класс сигнальных молекул // *Усп. физиол. наук.* 1996. Т. 27. № 4. С. 30—43.
31. *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.
32. *Zhang F., Iadecola C.* Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after local ischemia // *Neuro-Report.* 1993. Vol. 4. N 5. P. 559—562.

Поступила в редакцию
28.02.12

SODIUM POTASSIUM EFFECT ON DEVELOPMENT OF NEUROLOGICAL DEFICIENCY IN EXPERIMENTAL MODEL OF BRAIN ISHEMIA

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

Effect of potassium nitrate (KNO_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. KNO_3 in dose 5 mg/1000 g incorporated for 60 minutes and before bilateral occlusion carotid artery realistically reduced gravity of the neurological breaches and death-rate of the rats.

Key words: *nitric oxide, potassium nitrate, brain ischemia.*

Сведения об авторах

Кузенков Виктор Сергеевич — канд. биол. наук, лаборант-инженер I категории кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-304-81-17; e-mail: kouzenkov@mail.ru

Крушинский Алексей Леонидович — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-238-32-81; e-mail: krushinsky@pochta.ru

Реутов Валентин Палладиевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-390-85-96; e-mail: valeninreutov@mail.ru