

УДК 612.821.6

НИТРАТ НАТРИЯ СНИЖАЕТ РАЗВИТИЕ СТРЕССОРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО—МОЛОДКИНОЙ

А.Л. Крушинский, В.С. Кузенков, В.П. Реутов, В.Б. Кошелев, Е.Г. Сорокина

*(кафедра высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ;
кафедра физиологии человека и животных биологического факультета МГУ;
кафедра нормальной и патологической физиологии факультета фундаментальной медицины МГУ;
e-mail: kouzenkov@mail.ru)*

Оксид азота (NO) является важным регулятором физиологических функций у человека и животных в норме и патологии (Moncada et al., 1992; Марков, 1996; Реутов и др., 1997; Ванин 2000; Каменский, Савельева, 2002). В настоящее время опубликовано значительное число работ, посвященных различным биологическим эффектам этого соединения (Башкатова, Раевский, 1998; Дьяконова, Реутов, 1998; Раевский и др., 2000; Каменский, Савельева, 2002). Интерес к NO в большой степени обусловлен разнообразием его физиологических функций. Оксид азота участвует в синаптической передаче, выполняет роль активного вазодиллятора и способствует выделению нейромедиаторов (Radomski M.W., 1987; Марков, 1996; Гурин, 1997; Дьяконова, Реутов, 1998; Каменский, Савельева, 2002; Ситдикова, Зефиоров, 2006). 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 (Реутов и др., 1997, 2003). Поэтому NO может образовываться не только из L-аргинина, но и из ионов NO_2^- , которые восстанавливаются в NO при участии гемсодержащих белков (Реутов, Сорокина, 1998). Ионы NO_2^- в свою очередь могут образовываться путем восстановления ионов NO_3^- под действием нитратредуктаз (Реутов и др., 1997). Особенно интенсивно такой ряд трансформации $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ протекает в условиях дефицита кислорода (Millar et al., 1997; Martin et al., 2004; Gladvin, 2005).

Цель настоящей работы — изучение влияния нитрата натрия (NaNO_3) на устойчивость животных к действию стрессирующего фактора, приводящего к сердечно-сосудистым нарушениям и внутрочерепным кровоизлияниям. Удобным объектом для этого исследования явились крысы линии Крушинского—Молодкиной (КМ), генетически предрасположенные к аудиогенным судорожным припадкам. У этих животных в результате длительного акустического воздействия происходит резкое возбуждение мозга, которое сопровождается судорожными припадками, двигательными и вегетативными нарушениями, внутрочерепными кровоизлияниями,

в ряде случаев заканчивающихся смертью (Крушинский, 1960; Ничков, Кривицкая, 1969; Крушинский и др., 1989). Ранее нами было показано, что воздействие относительно низких доз NO-генерирующего соединения — нитрита натрия (0,5 мг/100 г), не вызывающего увеличения содержания метгемоглобина, приводит к повышению устойчивости крыс линии Крушинского—Молодкиной к акустическому стрессу (Реутов и др., 2002). Исходя из этого, мы предположили, что сходный защитный эффект может быть получен при применении нитрата натрия.

Материалы и методы исследований

Эксперименты выполнены на 96 крысах линии КМ (самцы в возрасте 4,5—5 мес, весом 240—310 г). Опытным животным ($n = 49$) вводили нитрат натрия внутривентриально в дозе 0,5 мг/100 г, 5 мг/100 г, 50 мг/100 г. Контрольным животным ($n = 47$) вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Акустическое воздействие проводили по ранее разработанной схеме (Крушинский, 1960). После полутораминутного действия сильного электрического звонка (110—115 дБ) подавали серию сильных и слабых акустических сигналов длительностью 10 сек с десятисекундными интервалами между ними. Через 15 мин такого воздействия делали трехминутный перерыв, затем снова включали сильный звук на 1 мин. Во время акустического воздействия у опытных и контрольных крыс определяли параметры, характеризующие возбудимость центральной нервной системы: длительность латентного периода, интенсивность и характер судорожного припадка. Также оценивали выраженность нарушений движений и смертность животных во время акустической экспозиции. Выделяли нарушения трех степеней: легкие нарушения (незначительные нарушения мышечного тонуса, не ограничивающие передвижения животного); средние нарушения (парез конечностей, чаще задних, затрудняющий передвижение); тяжелые нарушения (животное практически теряет способность к передвижению). Сразу после окончания экспериментов животных декапитировали, мозг фиксировали в 10%-м растворе формалина. Площадь субдураль-

ных и видимых субарахноидальных кровоизлияний определяли с помощью бинокляр-микрометра. Наличие или отсутствие внутрижелудочковых кровоизлияний определяли на поперечных срезах мозга толщиной 1–2 мм.

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

Результаты исследований и их обсуждение

Влияние NaNO₃ в дозе 0,5 мг/100 г на развитие стрессорных повреждений

Нитрат натрия в дозе 0,5 мг/100 г не оказывал достоверного влияния на устойчивость крыс линии КМ в условиях акустической экспозиции (таблица).

Влияние NaNO₃ в дозе 5 мг/100 г на развитие стрессорных повреждений

Нитрат натрия в дозе 5 мг/100 г оказывал значительный протекторный эффект на крыс линии КМ в условиях акустической экспозиции. В опытной группе существенно снижена доля животных с тяжелыми нарушениями движений по сравнению с контролем (30,4 и 78,3% соответственно, $p < 0,01$) и увеличена доля животных с легкими нарушениями (26,1 и 0% соответственно, $p < 0,01$) (рис. 1). Площадь субдуральных и видимых субарахноидальных кровоизлияний у опытных животных была в 1,7 раза меньше, чем у контрольных ($p < 0,05$) (рис. 3). Внутрижелудочковые кровоизлияния у опытных крыс встречались значительно реже, чем в контроле (47,8 и 91,3% соответственно, $p < 0,01$). Наблюдалось увеличение латентного периода судорожного припадка в опытной группе животных по сравнению с контролем ($2,2 \pm 0,1$ сек и $4,0 \pm 0,2$ сек соответственно, $p < 0,01$).

Влияние NaNO₃ в дозе 50 мг/100 г на развитие стрессорных повреждений

Нитрат натрия в дозе 50 мг/100 г также оказывал выраженный протекторный эффект на разви-

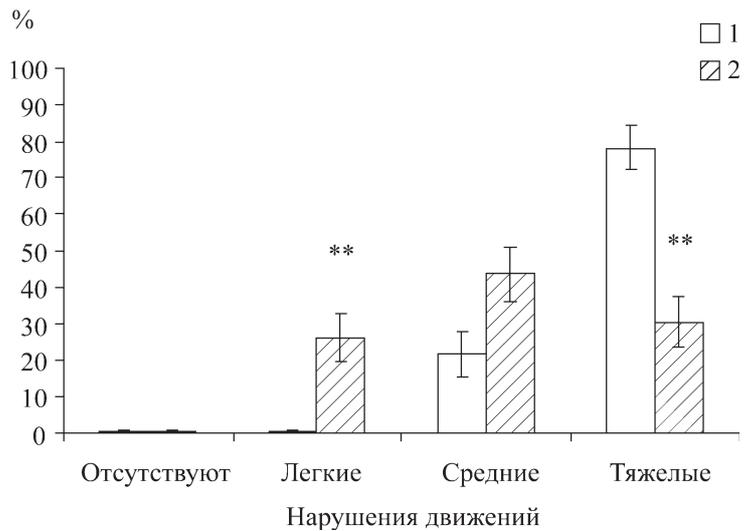


Рис. 1. Влияние нитрата натрия (NaNO₃) в дозе 5 мг/100 г на нарушения движений у крыс линии КМ в условиях акустического стресса. 1 — контроль, n = 23; 2 — NaNO₃ 5 мг/100 г, n = 23, ** — $p < 0,01$

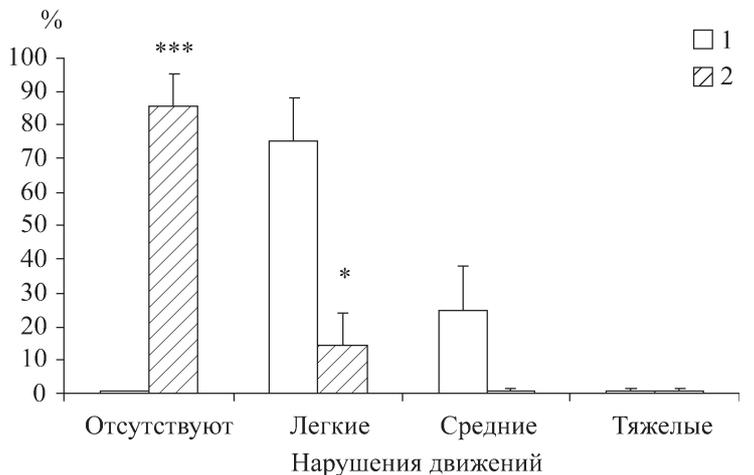


Рис. 2. Влияние нитрата натрия (NaNO₃) в дозе 50 мг/100 г на нарушения движений у крыс линии КМ в условиях акустического стресса. 1 — контроль, n = 12; 2 — NaNO₃ 50 мг/100 г, n = 14, * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$

тие стрессорных повреждений у крыс линии КМ. В опытной группе преобладают животные без нарушений движений в отличие от контроля (85,7 и 0% соответственно, $p < 0,001$) (рис. 2). Площадь субдуральных и видимых субарахноидальных кро-

	Частота нарушений движений, %				Смертность, %	Латентный период, сек	Субдуральные и видимые субарахноидальные кровоизлияния, мм ²	Частота внутрижелудочковых кровоизлияний, %
	отсутствуют	легкие	средние	тяжелые				
Контроль, n = 12	0	8,3 ± 8,3	41,7 ± 14,9	50,0 ± 15,1	16,7 ± 11,2	2,5 ± 0,3	12,6 ± 4,4	25,0 ± 13,1
NaNO ₃ , n = 12	0	33,3 ± 14,9	25,0 ± 13,1	41,7 ± 14,9	8,3 ± 8,3	3,2 ± 0,2	7,8 ± 3,7	25,0 ± 13,1
Достоверность различий	н.д	н.д	н.д	н.д	н.д	н.д	н.д	н.д

Примечание: н.д — различия статистически недостоверны.

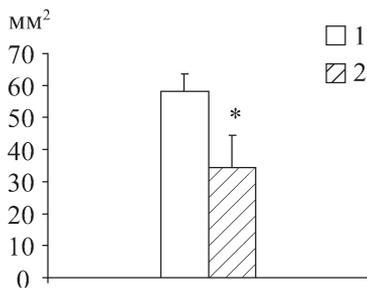


Рис. 3. Влияние нитрата натрия (NaNO_3) в дозе 5 мг/100 г на развитие субдуральных и субарахноидальных кровоизлияний у крыс линии КМ в условиях акустического стресса.

1 — контроль, $n = 23$; 2 — NaNO_3 5 мг/100 г, $n = 23$, * — $p < 0,05$

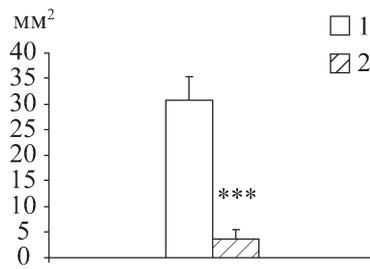


Рис. 4. Влияние нитрата натрия (NaNO_3) в дозе 50 мг/100 г на развитие субдуральных и субарахноидальных кровоизлияний у крыс линии КМ в условиях акустического стресса.

1 — контроль, $n = 23$; 2 — NaNO_3 5 мг/100 г, $n = 23$, *** — $p < 0,001$

воизлияний у опытных животных была в 8,5 раза меньше, чем у контрольных ($p < 0,01$) (рис. 4). Внутрижелудочковые кровоизлияния у опытных крыс встречались значительно реже, чем в контроле (33 и 0% соответственно, $p < 0,05$). Наблюдалось увеличение латентного периода судорожного припадка в опытной группе животных по сравнению с контролем ($19,1 \pm 2,4$ сек и $7,3 \pm 1,2$ сек соответственно, $p < 0,01$).

Таким образом, полученные результаты подтвердили предположение о возможном протекторном действии нитратов на развитие стрессорных нарушений у крыс линии КМ. Мы показали, что при введении нитрата уменьшается тяжесть двигательных нарушений, средние площади и частоты внутричерепных кровоизлияний.

Предполагаемый механизм защитного действия нитрата натрия реализуется в связи с тем, что в организме ионы NO_3^- могут восстанавливаться в оксид азота (NO) по цепи трансформаций $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ (Реутов и др., 1997). Ранее нами было показано, что воздействие относительно низких доз (0,5 мг/100 г) NO-генерирующего соединения — нитрита натрия — уменьшает развитие стрессорных нарушений у крыс линии КМ (Крушинский и др., 1989; Реутов и др., 2002). Сходное про-

текторное действие оказывал предшественник оксида азота L-аргинин в дозе 20 мг/100 г. Являясь активным вазодилататором (Марков, 1996; Реутов и др., 1997; Реутов, Сорокина, 1998), оксид азота способен увеличивать скорость кровотока в мозге (Каменский, Савельева, 2002; Zhang, Iadecola, 1993). Кроме того, NO обладает способностью ингибировать агрегацию тромбоцитов (Марков, 1996; Radomski et al., 1987). Поэтому оксид азота может уменьшать гипоксию и ишемию мозга, возникающие в результате судорожного припадка и снижать вероятность возникновения внутричерепных кровоизлияний. Установлено, что гипоксия мозга является одним из критических факторов при развитии внутричерепных кровоизлияний (Кошелев, 1990).

Умеренное повышение содержания NO и продуктов его метаболизма индуцирует пространственное перераспределение белков из растворимого в мембранно-связанное состояние. При таком перераспределении белков может значительно увеличиваться как стабильность этих белков, так и стабильность мембран, а также могут активироваться многие ферментные системы, в том числе и ферменты гликолиза, участвующие в синтезе АТФ (Реутов и др., 1997), что в свою очередь может снижать последствия ишемии и гипоксии мозга, развивающиеся в результате судорожного припадка.

Некоторое снижение возбудимости центральной нервной системы у опытных животных под действием нитрата натрия, проявившееся в увеличении латентного периода судорожного припадка, также может вносить положительный вклад, уменьшая развитие стрессорных повреждений.

В заключение отметим, что протекторный эффект нитрата натрия на развитие стрессорных повреждений у крыс линии КМ проявляется в дозах, во много раз превышающих защитную дозу нитрита натрия. Это связано с тем, что большая часть нитратных ионов выводится из организма (Реутов и др., 1997), а меньшее количество восстанавливается до нитритов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Башкатова В.Г., Раевский К.С. 1998. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата // Биохимия. **63**. № 7. 1020—1028.

Березовский В.А., Назаренко А.И. 1964. Энергетические показатели состояния коры головного мозга собаки при экспериментальном судорожном припадке // Теплообразование в организме. Киев. С. 32—33.

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

Гурин А.В. 1997. Функциональная роль оксида азота в центральной нервной системе // Усп. физиол. наук. **28**. № 1. 53—60.

Дьяконова Т.Л., Реутов В.П. 1998. Влияние нитрита на возбудимость нейронов мозга виноградной улитки // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. **84**. № 11. 1264—1272.

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

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

Крушинский Л.В. 1960. Формирование поведения животных в норме и патологии. М.

Крушинский А.Л., Рясина Т.В., Кошелев В.Б., Сотская М.Н., Бебинов Е.М., Белых А.Г., Стрелков Р.Б., Коршунова Т.С., Ларский Э.Г. 1989. Протекторное действие разных видов и режимов адаптации к гипоксии на развитие стрессорных повреждений у крыс линии КМ // Физиол. журн. СССР. **75**. № 11. 1576—1584.

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

Ничков С., Кривицкая Г.Н. 1969. Акустический стресс и церебровисцеральные нарушения. М.

Раевский К.С., Башкатова В.Г., Ваннин А.Ф. 2000. Роль оксида азота в глутаматергической патологии мозга // Вестн. РАМН. № 4. 11—15.

Реутов В.П., Сорокина Е.Г. 1998. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. **63**. № 7. 1029—1040.

Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицин Н.С., Охотин В.Е. 2003. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности. М.

Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. 1997. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.

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. 2002. Развитие

стрессорных повреждений у крыс линии Крушинско-Молодкиной, генетически предрасположенных к судорожным припадкам, при действии NO-генерирующего соединения // Вести НАН Белоруссии. Сер. мед.-биол. наук. № 1. С. 5—10.

Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. 2006. Газообразные посредники в нервной системе // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. **92**. № 7. 872—882.

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

Martin H.M., Hancock J.T., Salisbury V., Harrison R. 2004. Role of Xantine oxidoreductase as an antimicrobial agent // Infection and Immunity. **72**. N 9. 4933—4939.

Millar T. M., Stevens C. R., Blake D.R. 1997. Xantine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ishaemia // Biochem. Soc. Trans. **25**. N 3. 528—531.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. 1992. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // Pharmacol. Rev. **43**. 109—142.

Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. 1987. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor // Nature. **327**. 524—527.

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

Поступила в редакцию
20.12.07

SODIUM NITRATE DECREASES DEVELOPMENT OF ACUSTIC STRESS-INDUCED DISORDERS IN RATS OF KRUSHINSKY—MOLODKINA STRAIN

A.L. Krushinsky, V.S. Kuzenkov, V.P. Reutov, V.B. Koshelev, E.G. Sorokina

Effects of NaNO₃ on the development of stress-induced disorders were studied on a model of acoustic stress in Krushinsky—Molodkina rats genetically predisposed to audiogenic seizures. NaNO₃ at 5 mg/100 g and 50 mg/100 g body weight caused a decrease in severity of motor disorders and areas of subdural and subarahnoid hemorrhages. NaNO₃ at 0,5 mg/100 g had no effect.