

УДК: 613.11:612.6+614.87

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦИКЛА ОКСИДА АЗОТА В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ НИТРАТОВ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

В.В. Бабиенко

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Целью настоящего исследования была оценка функционирования цикла оксида азота в условиях длительного поступления субтоксических доз нитратов. Показано, что содержание креатинина в моче крыс, получавших нитраты в субтоксических дозах, сохраняется на низком уровне. Субтоксические дозы нитратов незначительно влияли на уровне протеинурии и прирост концентрации креатинина в плазме крови. Более низкие темпы выведения почками нитритов рассматриваются как результат ослабления системной продукции NO при хроническом воздействии субтоксических доз неорганических прекурсоров NO.

Ключевые слова: оксид азота, нитраты, субтоксические дозы.

Введение

Проблема токсикологической безопасности при использовании в народном хозяйстве неорганических прекурсоров оксида азота является одной из наиболее актуальных для современного этапа развития общества. Широкое применение азотных удобрений, технологических пищевых добавок, содержащих нитраты и нитриты, обуславливает риск неблагоприятного воздействия как для занятых на подобных производствах, так и для лиц, проживающих в экологически неблагоприятных условиях. В то же время нитраты и нитриты эндогенного происхождения являются непосредственными продуктами метаболизма оксида азота. Таким образом, они являются не только конечными продуктами метаболизма оксида азота в организме, но и могут повторно включаться в цикл оксида азота, выполняя тем самым функции депо и транспорта оксида азота [1-3].

По современным представлениям, большинство экзогенных и эндогенных нитратов и нитритов выводится из организма человека и животных преимущественно почками. Одновременно показано, что у здорового человека величина клиренса эндогенных нитратов составляет в среднем 20 мл / мин, что составляет 1/6 от общей анионной фильтрационной фракции. При этом пероральное введение здоровым людям нитрата натрия в пересчете 470 мкмоль/кг массы тела приводит лишь к незначительному повышению клиренса нитратов [4]. Данный феномен объясняется наличием в канальцах нефрона мощной нитрергической системы, локализованной, главным образом, в восходящей ветви петли Генле и macula densa [5, 6]. При этом наряду с системной продукцией нитритов и нитратов имеет место интратрениальный синтез данных веществ [7, 8].

Целью настоящего исследования была оценка функционирования цикла оксида азота в условиях длительного поступления субтоксических доз нитратов.

Материалы и методы

В лабораторном эксперименте на взрослых крысах одинакового возраста (5 недель) были оценены особенности влияния экзогенных нитратов и нитритов на организм в условиях дефицитного и избыточного эндогенного синтеза NO. Проведены 2 серии экспериментальных исследований. Численность животных в каждой группе - 15 самок и 15 самцов. За неделю до начала эксперимента из рациона животных исключали овощи, как потенциальный источник нитратов и нитритов, и продукты, богатые аргинином. Животные I серии получали обычную питьевую воду (контрольная серия), животные II серии

получали питьевую воду с содержанием нитрата натрия в концентрации 100 мг/л.

Функция почек крыс изучалась в условиях индуцированного диуреза. В качестве нагрузки использовали воду с 3% раствором химически чистого хлорида натрия (осмоляльность растворов составляла, соответственно, 3 и 1050 мосмоль/дм³ воды). За 12 часов до проведения функциональных проб животных ограничивали в корме при свободном доступе к воде. В каждой серии водная нагрузка осуществлялась с 8.00 до 8.30. Отстоявшуюся водопроводную воду вводили в желудок зондом из расчета 5% от массы тела. Животных размещали в специальные клетки и собирали мочу в течение 2 часов. Осмотическую нагрузку также проводили утром 0,8% и 3% растворами химически чистого хлорида натрия (осмоляльность растворов составляла, соответственно, 275 и 1050 мосмоль / кг H₂O). Раствор хлорида натрия вводили зондом в желудок из расчета 5% от массы тела, мочу собирали в течение следующих 2 часов.

Вывод животных из эксперимента осуществляли под эфирной анестезией путем декапитации. Образцы полученной крови стабилизировали гепарином. Цельную кровь не позднее чем через 30 мин. центрифугировали и отбирали плазму для дальнейших исследований.

В полученных образцах мочи и плазмы крови проводили анализ химического состава по следующим методам. Белок мочи определяли фотометрическим методом ($\lambda = 590$ нм) на "КФК-3" по методике, описанной Козловым А.В., 2008 [9]. Креатинин плазмы крови и мочи определяли фотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46 ($\lambda = 520$ нм) в реакции с пикриновой кислотой [10]. Осмоляльность мочи и плазмы крови определяли криоскопическим методом на осмометре 3D3 (Advanced Instruments, США).

Концентрацию нитратов крови и мочи определяли фотометрическим методом ($\lambda = 540$ нм) на спектрофотометре СФ-46 с использованием реактива Гриса после их восстановления до нитритов в присутствии металлического порошкового кадмия [11]. Концентрацию нитритов плазмы крови и мочи определяли фотометрическим методом [11].

Исследования проведены согласно требованиям Закона Украины № 3447IV "О защите животных от жестокого обращения" (2006 г.), решениям 1-го Национального конгресса Украины по биоэтике ("Общие этические принципы проведения экспериментов на животных", 2001 г.), методическим рекомендациям комитетов по биоэтике при президиумах НАН и НАМН Украины, Центральной биоэтической комиссии МЗ Украины, Государственно-

го фармакологического центра МЗ Украины (2006 г.).

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения Statistica 7.0 (США).

Результаты исследования

Проведенные исследования показали, что в течение первого часа после назначения животным нитратов в субтоксических дозах регистрируются четко выраженные изменения функционального состояния почек (табл. 1). При этом острая реакция почек крыс II группы на однократное введение существенно отличалась от реакций в контрольной группе. Установлено, что длительное поступление нитратов в субтоксических дозах существенно не влияло на величину диуреза по сравнению с контролем. Однако влияние неорганического прекурсора NO сопровождается снижением показателей концентрации креатинина в моче, при этом регистрируется увеличение уровня осмоляльности мочи на фоне высоких величин почками осмотической активности и снижение показателей концентрационного индекса креатинина.

По нашему мнению, следует обратить внимание на существенное (с 11 ± 1 до 19 ± 2 мг / л) повышение концентрации белка в моче крыс, получавших нитраты в субтоксических дозах. Кроме того, привлекает внимание динамика показателя клиренса креатинина - маркера изменений клубочковой фильтрации, что указывает на снижение фильтрации в группе крыс, получавших нитраты. Данный эффект подтверждается повышением концентрации креатинина в плазме крови данной группы животных. Описанные изменения были статистически значимыми ($p < 0,05$).

Таблица 1 - Особенности острой реакции почек крыс на введение нитратов

Показатели	Контроль (n=30)	NO ₃ субтокс (n=30)
Диурез мл/час/100 г. м. т.	1,7±0,1	2,3±0,1*
Креатинин мочи, мкмоль/л	1592±49	964±53*
Осмоляльность мочи, мосмоль/кг H ₂ O	101±3	92±2*
Белок мочи, мг/л	11±1	19±2*
Клиренс креатинина, мкл/мин	653±22	488±23*
Креатинин плазмы крови, мкмоль/л	63±2	93±5*
Осмоляльность плазмы крови, мосмоль/л	299±1	299±1

Примечание: * - различия между группами статистически достоверны ($p < 0,05$)

На наш взгляд, не менее важным проявлением действия нитратов на состояние водно-солевого обмена является снижение уровня осмоляльности внеклеточной жидкости организма, определенного в плазме крови крыс экспериментальной группы по сравнению с животными контрольной группы. В то же время следует отметить, что назначение нитратов в субтоксических дозах не сопровождалось выраженным ростом объема диуреза.

В ходе проведенных исследований установлено, что содержание креатинина в моче крыс, получавших нитраты в субтоксических дозах, сохраняется на низком уровне. Важным, по нашему мнению, является тот факт, что субтоксические дозы нитратов незначительно влияли на уровне протеинурии и прирост концентрации креатинина в плазме крови. Соответственно, значение осмоляльности плазмы крови в группе крысы которые получали нитраты в субтоксических дозах, статистически не отличались от аналогичного параметра в группе контрольных животных.

Экспериментальное исследование показало, что длительное введение крысам нитрата с питьевой водой в концентрации 50 мг/л сопровождается снижением кли-

ренса креатинина, экскреции белка с мочой и не приводит к увеличению концентрации нитрит-ионов в плазме крови.

В то же время обнаружено увеличение концентрации нитратов в плазме крови и усиление выведения их почками. Это позволяет предположить, что детоксикация организма при поступлении экзогенных нитратов осуществляется за счет ускоренной их экскреции с мочой, при этом восстановления, нитратов до нитритов и последующего синтеза монооксида азота не наблюдается, то есть запуска каскада реакций, характерных для цикла азота, не происходит. Учитывая то, что почки играют основную роль в регуляции активности нитрегенных систем при введении экзогенных нитратов, можно предположить, что в условиях токсической или дисметаболической нефропатии влияние нитратов в субтоксических дозах на ренальные функции может быть более выраженным.

Более низкие темпы выведения почками нитритов можно рассматривать как результат ослабления системной продукции NO. Впрочем, низкая величина экскреции почками нитритов в группе крыс, получавших нитраты в малых дозах (табл. 2), оказывается на фоне незначительных межгрупповых различий содержания нитританиона в плазме крови животных.

Таблица 2 - Особенности функционирования цикла оксида азота в острой фазе эксперимента при введении прекурсоров

Показатели	Контроль (n=30)	NO ₃ субтокс (n=30)
Диурез, мл/год/100 г	1,7±0,1	2,4±0,1
Нитрит мочи, мкмоль/л	2,3±0,2	3,0±0,3
Экскреция нитрита, мкмоль/год/100 г	$(5,9 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$(6,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$
Нитраты мочи, мкмоль/л	31,3±0,3	33,6±0,7
Экскреция нитратов, мкмоль/год/100 г	0,072±0,005	0,080±0,003
Нитрит плазмы крови, мкмоль/л	6,2±0,2	6,3±0,2
Нитраты плазмы крови, мкмоль/л	10,3±0,3	12,7±0,8

Примечание: * - различия между группами статистически достоверны ($p < 0,05$)

Это свидетельствует о правомерности концепции о цикле оксида азота и конкурентное ингибирование синтеза оксида азота из аргинина в условиях избыточного поступления нитратов. Зато высокое содержание в крови нитрат-иона является отражением прежде всего чрезмерного экзогенного поступления. Учитывая то, что максимальная дисперсия этого показателя была присуща животным, получавшим субтоксической дозы прекурсора в течение более длительного времени, возможна реализация механизма активации ренин-ангиотензиновой системы, усилению продукции NO и повышению метаболического клиренса монооксида азота и его дериватов.

По нашему мнению, именно эти механизмы могут рассматриваться как важные патогенетические факторы, приводящие к развитию при длительном экзогенном поступлении субтоксических доз нитратов дисфункции почек.

Литература

1. Реутов, В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих. / В.П. Реутов // Успехи биологических наук. 1995. - Т. 35. - С. 189-228.
2. Реутов, В. П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и нитритредуктазная активность гемсодержащих белков / В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, Л. П. Каюшин // Вопросы медицинской химии. 1994. - Т. 40, - № 6. - С. 31-35.
3. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих

при различных функциональных состояниях. / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов // Биохимия. - 2000. - Т. 65, вып. 4. - С. 485-503.

4. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций / С.Я. Проскураков, С.И. Бикетов, А.И. Иванников, В.Г. Скворцов // Иммунология. - 2000. - № 4. - С. 920.

5. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицын М.: Наука, 1997. - 165 с.

6. Birder L. Urothelial signaling. / L. Birder, K.E. Andersson // *Physiol Rev.* - 2013. - Vol. 93(2) - P. 653-680.

7. Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. / D. Sun, Y. Wang, C. Liu [et al.] //

Life Sci. - 2012. - Vol. 90(23-24) - P. 900-909.

8. Goligorsky MS. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. / M.S. Goligorsky, S.V. Brodsky, E. Noiri // *Kidney Int.* - 2002 Vol. 61(3) - P.855-61.

9. Козлов А. В. Протеинурия. Методы ее выявления / А. В. Козлов. - Тверь: ООО "Издательство "Триада", 2008. - 60 с.

10. Murray R.L. Creatinine. / Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton.* - 1984 - P. 1261-1266.

11. Гоженко, А.И. Методика определения нитрит-нитратной экологической нагрузки на организм человека / А.И. Гоженко, И.Г. Славина, С.Г. Катюжинская [и др.] // *Медицина труда и промышленная экология.* 2001. - № 3. - С. 38-39.

THE PECULIARITIES OF NITRIC OXIDE CYCLE FUNCTIONING IN THE CONDITIONS OF CHRONIC EXPOSURE OT SUBTOXIC DOSES OF NITRATES: EXPERIMENTAL STUDY

V.V. Babienko

Odessa National Medical University, Odessa

The study was aimed to evaluate nitric oxide cycle functioning in the conditions of chronic exposure to subtoxic doses of nitrates. There was shown that creatinine content in urine of rats exposed to subtoxic doses of nitrates is levelled down. Subtoxic doses of nitrates influenced non-significantly at the level of proteinuria and creatinine concentrations in blood plasma. Lower levels of nitrites renal excretion were assessed as a result of the decrease of nitric oxide production in the chronic exposure of subtoxic doses of non-organic precursors of nitric oxide.

Key words: nitric oxide, nitrates, subtoxic doses

Адрес для корреспонденции: e-mail: v_babienko@ukr.net

Поступила 23.04.2013