

УДК 612.89.616.153.455.01:546.17]-003.9

УЧАСТИЕ NO-ЕРГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ В МОДУЛЯЦИИ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ НЕРВОВ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКОРАХИИ

А.Г. Чумак^{1,2}, К.М. Люзина¹, Т.В. Каравай^{1,2}, С.А. Руткевич¹

1 – Белорусский государственный университет, Минск

2 – Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

В проведенных острых опытах на наркотизированных уретаном и нембуталом крысах установлено существование зависимости процессов формирования афферентной и эфферентной симпатической импульсной активности в условиях гипергликозаемии от уровня продукции монооксида азота на периферии и в центральной нервной системе.

Ключевые слова: монооксид азота, гипергликозаемия, рецепция глюкозы, интратекальное введение.

Both afferent (in n.vagus) and efferent sympathetic fibers (pl.aortoabdominalis, n.mesentericus) impulse activity were recorded before and after glucose infusion (in duodenum and intrathecal) in anesthetized rats. It was determined that afferent and efferent fibers activity increased under hyperglycemia condition. Intrathecal administration of NO-synthase inhibitor N^o-Nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME, 160 µg/20 µl) as well as NO-donor sodium nitroprusside (SNP, 100 mM) at lower thoracic level in glucose-treated rats produced augmentation of aorto-abdominal efferent fibers tonic impulse activity. The data suggested that nitric oxide-mediated mechanisms are involved in regulation of sympathetic outflow under hyperglycemia condition.

Key words: nitric monoxide, hyperglycemia, glucose reception, intrathecal administration.

Введение

В литературе последних лет появляется все больше работ, акцентирующих внимание на альтерациях уровня глюкозы в ликворе при различных патологических состояниях, сопровождающихся мультиорганными нарушениями и неврологической симптоматикой [10, 11, 15, 16]. Так, например, есть данные о том, что воспалительные процессы в оболочках мозга, опухолевые поражения, субарахноидальные кровоизлияния сопровождаются снижением уровня глюкозы в ликворе (гипогликозаемия). В то же время, при остром энцефалите, ишемических нарушениях тканей мозга, сахарном диабете зарегистрировано увеличение содержания глюкозы в интерстиции мозга (гипергликозаемия) [14]. Установлена также взаимосвязь между повышением уровня глюкозы в крови и тяжелыми ранениями («стрессовая гипергликемия») и получены доказательства влияния «стрессовой гипергликемии» на увеличение зоны ишемического повреждения головного мозга [11, 15, 16]. Неблагоприятный прогноз протекания патологического процесса был сделан и для пациентов с инсультом, инфарктом миокарда, сепсисом [10, 11]. Имеются также данные об увеличении проницаемости гематоэнцефалического барьера в условиях гипергликемии [12, 18].

В литературе накапливается материал, свидетельствующий о вовлечении монооксида азота в процессы утилизации глюкозы клетками. Так, выявлены разнообразные влияния NO-активных препаратов на процессы, протекающие в кишечнике. Как оказалось, доноры NO усиливают чувствительность кишечных афферентных волокон к механическим и болевым стимулам, включая ишемию

тканей кишки. Напротив, ингибиторы синтазы монооксида азота (NOS) способны десенситизировать разнообразные рецепторы, но усиливать моторику органа [6] или уменьшать кровоток в кишке [9, 13]. Появились сообщения о том, что ингибиторы NOS усиливают выработку глюкозы в печени, отменяемую введением донора NO [17]. Есть указания на зависимость транспорта глюкозы в скелетных миоцитах от NO [19]. Все это может явиться основанием для предположения о том, что вклад NO-ергических нейрохимических механизмов в процессы, связанные с гипергликемией, может быть ключевым.

С целью проверки такого предположения принят электрофизиологический и фармакологический анализ участия монооксида азота в осуществлении рецепторной функции тонкой кишки и реакций, опосредованных симпатическими эфферентными волокнами, при введении глюкозы в ликворное пространство спинного мозга.

Материал и методы исследования

Эксперименты выполнены в острых опытах на наркотизированных (30 мг/кг нембутала и 500 мг/кг уретана, внутривенно) крысах массой 260-320 г с применением подходов и принципов, предусмотренных представлениями о гуманном отношении к лабораторным животным [3]. Регистрирующие биполярные подвесные электроды из хлорированного серебра располагались на ветвях брюшно-аортального сплетения, брыжеечном нерве или вентральных поддиафрагмальных ветвях блуждающего нерва и покрывались вазелиновым маслом. Электрокардиограмму регистрировали игольчатыми электродами во втором стандартном отведении.

Раствор глюкозы вводили в полость двенадцатиперстной кишки (20% раствор объемом 0,5 мл) и интратекально (0,02 мл 40% раствора). Для интратекального введения раствора глюкозы и фармакологических препаратов применяли методику, описанную в [2]. Использовались препараты «Sigma»: неселективный ингибитор NOS N-нитро-L-аргинина (L-NNA; 200 мкг/0,1 мл) и метилового эфира N-нитро-L-аргинина (L-NAME 20 мг/0,5 мл; 50 мкг/0,1 мл; 160 мкг/0,02 мл), биологического субстрата фермента L-аргинина (1,7 мкг/0,1 мл), а также химического донора NO нитропрусида натрия (SNP; 0,26 мкг/0,1 мл). Дозы заимствованы из литературы [17].

Регистрация и обработка электрических сигналов выполнялась на стандартной компьютеризированной электрофизиологической установке с использованием программы, разработанной в Институте физиологии НАН Беларуси [5]. Для оценки достоверности обнаруженных эффектов применен парный t-критерий сравнения средних Стьюдента [1]. Использован пакет Origin-программный продукт фирмы OriginLab Corporation.

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов (n=13) было установлено, что монооксид азота необходим для осуществления рецепции глюкозы афферентными окончаниями блуждающего нерва в двенадцатиперстной кишке. Оказалось, что инъекция в кишку растворов глюкозы разной концентрации сопровождается долговременным увеличением частоты и амплитуды афферентных импульсов в блуждающем нерве, как это характерно и для описанных в [4] результатов опытов, проведенных на кошках. Наиболее выраженный эффект наблюдался после введения в просвет кишки 20% раствора глюкозы.

В другой серии экспериментов после введения ингибитора NOS (20 мг в 0,5 мл 0,9 % NaCl) в полость двенадцатиперстной кишки импульсация в вагусе снижалась до $17,1 \pm 3,18$ имп/с на 25 мин (фон составлял $25,3 \pm 0,45$ имп/с) ($P < 0,05$, n=7). Проба с введением 20% глюкозы в кишечник, проведенная на 20 мин после введения ингибитора, была отрицательна (рис. 1). Если без использования фармакологии после внутрикишечной инфузии глюкозы частота импульсации вырастала до $42,18 \pm 3,37$ имп/с ($P < 0,05$, n=13), то на фоне действия ингибитора NOS афференты вагуса не реагировали на введение глюкозы. Однако наблюдаемое ингибирование глюкорцепторов было обратимым. Через 45 мин после инъекции ингибитора глюкорцепторы реагировали на внутрикишечное введение глюкозы, что выражалось в усилении импульсации в вагусе (рис. 1).

Введение раствора глюкозы 40% (20 мкл) в ликвор спинного мозга вызывало угнетение импульсации в афферентах вагуса, свидетельствующее о десенситизации глюкорцепторов кишки. В вагусе происходило постепенное снижение частоты

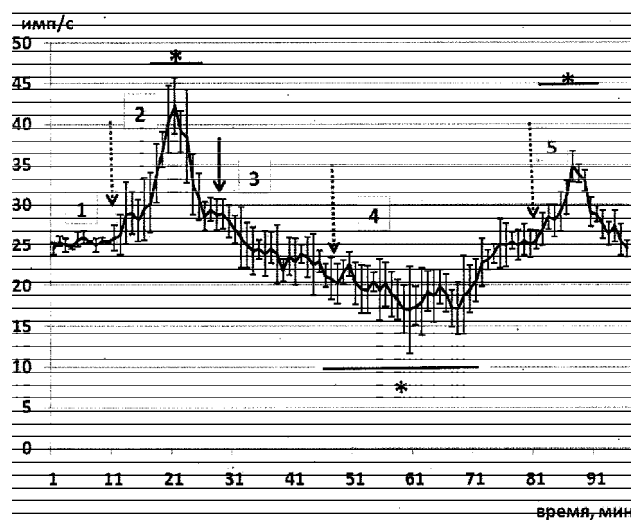


Рисунок 1 – Изменение афферентной импульсации в поддиафрагмальной вентральной ветви вагуса. Обозначения: 1 – фон, 2, 4, 5 – внутрикишечное введение глюкозы 20%, 3 – введение в кишку ингибитора NOS 20 мг/0,5 мл. * – достоверное изменение, по отношению к фону ($P < 0,05$, n=7)

импульсации (фон $25,5 \pm 0,95$ имп/с), с минимумом на 28–32 мин, которое составляло $10,77 \pm 3,39$ имп/с ($P < 0,05$, n=5). Введение раствора 20% глюкозы в двенадцатиперстную кишку через 15 минут после интратекального введения раствора 40% глюкозы также не приводило к изменениям импульсной активности в афферентах вагуса. В 3 экспериментах из 7 через 50 минут обнаружено восстановление частоты импульсации к фоновому уровню.

Для анализа вклада сегментарных NO-ергических процессов в эффекты, вызываемые в симпатической нервной системе гипергликокорихией, было протестировано действие NO-активных препаратов, вводимых под оболочки спинного мозга после предварительной инъекции глюкозы в ликвор.

В отдельной серии опытов (n=6) было установлено, что интратекальное введение контрольного раствора (доза вещества и объем соответствовали таковым активного препарата) инактивированного нитропрусида натрия или искусственной спинномозговой жидкости не приводило к заметным изменениям тонической эфферентной активности брюшно-аортального нерва.

В серии опытов (n=6) с интратекальным введением только ингибитора NOS L-NAME (50 мкг в 0,1 мл искусственного ликвора) к Th8–Th10 сегментам спинного мозга и регистрацией импульсной активности в общем брыжеечном нерве, уже к 10 минуте после инъекции выявлено значительное ослабление тонической эфферентной импульсации. Эффект был максимальным к 20 минуте и выражался в снижении частоты импульсации до $23,4 \pm 2,3$ имп/с при уровне фона $34,2 \pm 3,5$ имп/с ($P < 0,05$; n=6) и продолжался (был статистически значимым) в течение часа (рис. 2, кривая 2).

Введение L-аргинина (1,7 мкг в 0,1 мл искусственного ликвора; n=12) в ликвороносное простран-

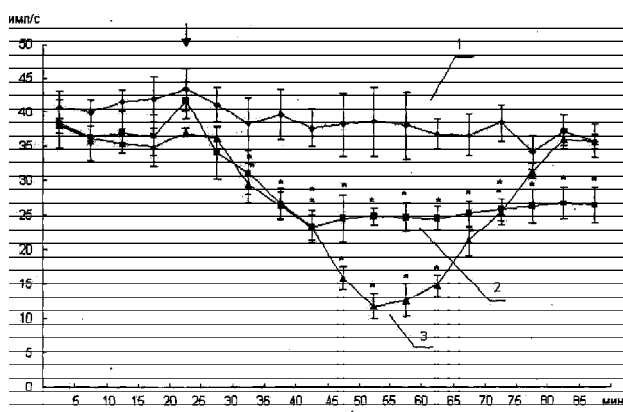


Рисунок 2 – Изменение частоты симпатической эфферентной активности брыжеечного нерва после введения в ликвор спинного мозга искусственной спинномозговой жидкости (1), растворов L-аргинина (1,7 мкг/0,1 мл; n=12) (3) и L-NAME (50 мкг/0,1 мл; n=6) (2).

* – достоверное ($P < 0,05$) изменение анализируемого показателя, по сравнению с (1)

ство спинного мозга также сопровождалось падением частоты импульсации в эфферентных волокнах симпатического нерва (рис. 2, кривая 3). Развитие реакции начиналось с 5-10 минуты, достигало максимума к 25-35 минуте (до $11,8 \pm 0,25$ имп/с при фоновом значении $36,7 \pm 1,5$ имп/с, $P < 0,05$) и возвращалось к уровню фона в течение 40-60-ти мин.

Инtrateкальное введение только ингибитора NOS N-нитро-L-аргинина (L-NNA; 200 мкг в 0,1 мл искусственного ликвора; n=5) сопровождалось угнетением тонической эфферентной импульсации и в брюшно-аортальных нервных волокнах. В течение первого часа наблюдения активность эфферентных симпатических волокон плавно снижалась и через 40 минут составила $12,3 \pm 2,8$, а через 70 минут – $8,2 \pm 1,9$ имп/с от уровня фона ($24,5 \pm 3,5$ имп/с, $P < 0,05$).

Введение 40 % раствора глюкозы объемом 20 мкл (n=5) под оболочки спинного мозга сопровож-

далось ростом частоты симпатической эфферентной импульсации в нервах брюшно-аортального сплетения. Симпатоактивирующий эффект начался с 5-6-й минуты после введения, был статистически достоверным, начиная с 20-й минуты (от $24,4 \pm 3,3$ имп/с до $30,9 \pm 2,8$ имп/с, $P < 0,05$), и обратимым (рис.3, а). Выявлялась также сопутствующая тахикардия. Частота сердечных сокращений (ЧСС) возросла от 311 ± 12 до 346 ± 17 уд/мин ($P < 0,05$) к 20-й минуте после введения моносахарида в ликвор.

Далее в опытах изучалось влияние NO-активных препаратов, также вводимых инtrateкально, на эффект активации симпатической нервной системы, спровоцированной увеличением концентрации глюкозы в ликворе. Нитропруссид натрия (0,26 мкг в 0,1 мл) и L-NAME (160 мкг в 0,02 мл) вводили через 20 минут после инъекции глюкозы.

Инфузия донора NO в ликвор (n=5) сопровождалась на 2-3-й минуте кратковременной (2 минуты) фазы роста частоты импульсации в эфферентных волокнах брюшноаортального нерва (от $30,9 \pm 2,8$ имп/с до $39,2 \pm 2,0$ имп/с; $P < 0,05$) После введения SNP зарегистрировано снижение ЧСС со 2 по 10 минуту после инъекции от 345 ± 14 до 300 ± 20 уд/мин (рис. 2 б).

Инtrateкальная инъекция L-NAME (n=6) также приводила к дополнительному росту частоты импульсации в центробежных проводниках нерва к 40 минуте до $42,3 \pm 2,8$ имп/с ($P < 0,05$). Симпатоактивирующий эффект проявлялся и в развитии тахикардии (ЧСС от 380 ± 12 до 410 ± 16 уд/мин) на протяжении двух часов.

Заключение

Полученные в проведенных экспериментах данные указывают, с одной стороны, на существование зависимости процессов рецепции глюкозы в кишечнике от продукции монооксида азота, поскольку внутривисцеральное введение ингибиторов в эффективных дозах вызывало десенситизацию афферентов вагуса, обладающих в норме способ-

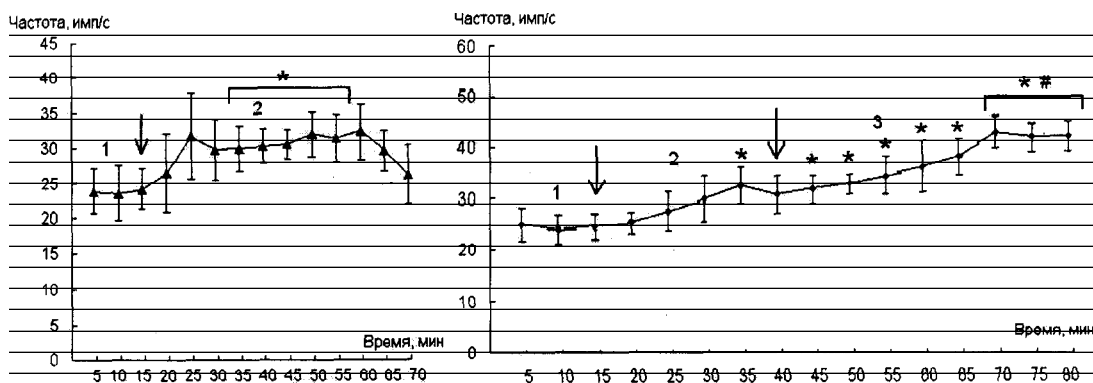


Рисунок 3 – Изменение частоты эфферентных разрядов в брюшноаортальных проводниках после инtrateкального введения глюкозы (а, n=5) и L-NAME (160 мкг в 0,02 мл искусственного ликвора) на фоне увеличения концентрации глюкозы в ликворе (б, n=6). Обозначения: 1 – фон, 2 – после введения глюкозы, 3 – после введения L-NAME. Стрелками отмечен момент инъекции глюкозы и ингибитора фермента.

* – достоверное изменение частоты эфферентной импульсации ($P < 0,05$), по сравнению с фоном (1), после введения раствора моносахарида (2); # – достоверное ($P < 0,05$) изменение частоты осцилляций после введения L-NAME (3), по сравнению с анализируемым показателем после введения глюкозы (2)

ностью рецептировать в кишке глюкозу. С другой стороны, установлена взаимосвязь между функционированием популяций тех сегментарных нейронов, активность которых эффективно меняется при гипергликемии, и изменением содержания монооксида азота в ликворе.

Выявлено, что интратекальная инфузия только ингибиторов NO-синтазы приводила к угнетению активности симпатических преганглионарных нейронов, что выражалось в падении частоты их эфферентных разрядов, регистрируемых в висцеральных нервах (брыжеечном и брюшноаортальном). Это не противоречит наблюдениям, описанным в литературе [7,8].

Эффекты чрезмерного повышения концентрации глюкозы в ликворе были симпатизирующими по направленности. Полученные данные соответствуют представлениям о том, что гипергликемия, как и другие отклонения показателей гомеостаза от их оптимальных значений, активирует симпатическую нервную систему, приводя, в частности, к значительному подъему артериального давления [9, 11, 15]. При этом обнаружено сходное влияние глюкозы и ингибиторов NO-синтазы на течение гипергликемической гипертензии [9], что подтверждают приведенные в статье результаты исследования эффектов интратекального введения ингибитора NO-синтазы на фоне смоделированной гипергликемии. Тем не менее, было выявлено, что влияния ингибиторов NO-синтазы на активность симпатических преганглионарных нейронов на фоне гипергликемии отличаются от эффектов, полученных на фоне нормального уровня глюкозы. Полученные результаты можно интерпретировать как возможную перестройку внутриспинальных механизмов, связанных с синтезом и продукцией монооксида азота, в ответ на увеличение концентрации глюкозы. Однако возможна и иная трактовка этих результатов. Разнонаправленные эффекты могут отражать изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера в условиях гипергликемии и активацию симпатических влияний, вызванных подавлением образования монооксида азота в эндотелии пилальных сосудов.

Литература

1. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. – М.: Физматлит, 2006. – С. 393.
2. Руткевич С.А., Поленов С.А. Чумак, А.Г., Кульничский В.А. Особенности импульсации симпатических эфферентных волокон

брюшно-аортального нерва после интратекального введения субстрата и ингибитора NO-синтазы // Журн. «Бюл. эксперим. биол. и медицина». – 2009. – Т. 147, № 3. – С.249-254.

3. Руткевич С.А., Шухно Т.П. Методологические подходы к изучению механизмов боли и соблюдение принципов биоэтики при работе с экспериментальными животными // Сборник трудов научно-практического семинара «Гуманное обучение специалистов медико-биологического профиля». – Минск, 2006. – С.76–77.
4. Солтанов В.В. Механизмы саморегуляции вегетативных функций в норме и патологии. – Минск, 1994.
5. Солтанов В.В., Бурко В.Е. Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных. // Новости медико-биологических наук. – 2005. – № 1. – С.90-96.
6. Солтанов В.В., Чумак А.Г., Левковец В.С. Нервные и гуморальные механизмы нарушений вегетативных функций при ишемии-реперфузии тонкой кишки // Теория и практика медицины: Сб. науч. тр. Вып. 2. – Минск: Белорусский центр научной медицинской информации МЗ РБ, 2000. – С. 239-241.
7. Brack K.E., Watkins N., Pyner S., Coote J.H. A physiological role for nitric oxide in the centrally mediated sympathetic and somatomotor ejaculatory response in anesthetized male // Neuroscience. – 2007. – Vol. 150, № 2. – P.487-497.
8. Carmen G.M., Celuch S.M., Adler-Graschinsky E.L. Possible participation of spinal nitric oxide in the control of the blood pressure in anesthetized rats // Brain Res. – 1997. – Vol. 764, № 1-2. – P. 67-74.
9. Claxton C.R., Michael W. B. Nitric Oxide Opposes Glucose-Induced Hypertension by Suppressing Sympathetic Activity // Hypertension. – 2003. – Vol. 41. – P. 274–278.
10. Deitch E.A., Vincent J.L., Windsor A. Sepsis and multiple organ dysfunction: a multidisciplinary approach. – 2002.
11. Gore D.C., Chikes D., Heggors J., et al. Associated of hyperglycemia mortality after severe burn injury // Trauma. – 2001. – № 51. – P. 5400-5404.
12. Huber J.D. Diabetes, cognitive function, and the blood-brain barrier // Curr. Pharm. Des. – 2008. –Vol. 16, № 14. – P. 1594-1600.
13. Jansson L., Carlsson P.O., Bodin B., Andersson A., Kallskog O. Neuronal nitric oxide synthase and splanchnic blood flow in anaesthetized rats // Acta Physiol. Scand. – 2005. – Vol. 183, № 3. – P. 257–262.
14. Klepper J., Voit E. T. Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain – a review // Eur. J. Pediatr. – 2002. – Vol. 161. – P. 295–304.
15. Lewis K., Kane S., Bobek M. et al. Intensive insulin therapy for critically ill patients // Annals of Pharmacotherapy. –2004. – Vol. 37, № 38. – P. 1243-1251.
16. Montory V.M., Basu A., Erwin P.J. et al. Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature // Diabetic Care. – 2002. – № 25. – P. 583-593.
17. Moore M.C., Dicostanzo C.A., Smith M.S., Farmer B., Rodewald T.D., Neal D.W., Williams P.E., Cherrington A.D. Hepatic portal venous delivery of a nitric oxide synthase inhibitor enhances net hepatic glucose uptake // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 294, № 4. – P. 768–777.
18. Qutub A.A., Hunt C.A. Glucose transport to the brain: a systems model // Brain Res. Rev. – 2005. – Vol. 3, № 49. – P. 595-617.
19. Ross R.M., Wadley G.D., Clark M.G., Rattigan S., McConell G.K. Local Nitric Oxide Synthase Inhibition Reduces Skeletal Muscle Glucose Uptake but Not Capillary Blood Flow During In Situ Muscle Contraction in Rats. // Diabetes. – 2007. – Vol. 56. – P. 2885–2892.

Поступила 08.04.09