

ПИТЬЕВАЯ МОТИВАЦИЯ У КРЫС ПРИ ИНДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА И ИНГИБИРОВАНИИ NO-СИНТАЗ

А. П. Салей, М. Ю. Мещерякова

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 14.03.2011 г.

Аннотация. В работе представлены материалы о роли оксида азота в регуляции питьевого поведения крыс при дегидратации, создаваемой водной депривацией. Интраперитонеальное и интравентрикулярное (латеральный желудочек мозга) введение донора оксида азота L-аргинина и ингибиторов NO-синтаз изменяет условно-рефлекторное поведение и питьевую мотивацию у крыс.

Ключевые слова: Аминогуанидин, брюшная полость, латеральный желудочек мозга, L-аргинин, L-NAME, мотивация, оксид азота, питьевое поведение.

Abstract. The materials of a role of the nitric oxide in regulation of drinking behaviour of the rats under dehydration, created by water deprivation were done. Intraperitonealis and intraventricularis (ventriculus lateralis cerebri) injections of the nitric oxide L-arginine donor and of NO-synthase inhibitors change conditioned-reflex behaviour and drinking motivation in rats.

Keywords: Aminoguanidine, cavum abdominis, drinking behaviour, L-arginine, L-NAME, motivation, nitric oxide, ventriculus lateralis cerebri.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных биологических мотиваций является потребление воды. Питьевая мотивация возникает при нарушении водно-солевого равновесия в результате снижения (или водной депривации) поступления воды или избыточном введении в организм солей, главным образом хлористого натрия. Нарушение водно-солевого равновесия вызывает изменение объема крови (плазмы) и ее осмотического давления. Регуляция водно-солевого баланса в организме обеспечивается нервно-рефлекторными механизмами и многими БАВ [1—3].

В конце XX столетия было установлено, что в живом организме образуется оксид азота (NO), специфическим предшественником которого является L-аргинин, превращающийся в организме в эквивалентное количество NO и L-цитрулина под действием NO-синтаз [4, 5]. NO — один из биологических регуляторов физиологических и патофизиологических процессов в организме [4, 6], в том числе различных поведенческих реакций, включая питьевую, пищевую мотивации и половое поведение [7—10]. Вместе с тем, полностью механизм регуляции оксидом азота питьевой мотивации не выяснен.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Цель работы — изучение влияния донора оксида азота L-аргинина (L-AR) и ингибиторов NO-

синтаз (NOS) аминогуанидина (AG) и N^ω-нитро-L-аргинина метилового эфира (L-NAME) на условно-рефлекторное поведение (УРП) и питьевую мотивацию (ПМ) крыс массой 200—250 г. Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных ВГУ.

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Правилами гуманного обращения с лабораторными животными и методическими указаниями МЗ РФ.

Было проведено две серии исследований: изучение УРП и уровня ПМ у воднодепривированных крыс после внутрибрюшинного (18 животных) и интравентрикулярного (10 животных) введения L-аргинина, амиогуанидина и L-NAME. При интраперитонеальном введении препаратов в качестве растворителя использовался физиологический раствор в объеме 0,5 мл.

Интравентрикулярное введение L-аргинина и ингибиторов NO-синтаз в растворе, изотоничном ликвору (контроль), в объеме 2 мкл производилось микрошприцем Гамильтона через металлические канюли (диаметром 0,5 мм), вживленные в правый боковой желудочек мозга животных (AP +2 мм, L_D 3,0 мм, V 3 мм). Локализация канюль в мозге оценивалась по фронтальным срезам толщиной 100 мк с использованием замораживающего микротомы.

Для изучения УРП использовалась Колумбийская камера (КК), состоящая из 4-х отсеков: стартового, промежуточного, целевого, в котором находилась поилка с водой, и возвратного. Условным

Длительность побегов (ДП) животных к поилке с водой после интраперитонеального введения ингибиторов NO-синтазы

| Варианты | Доза, мг/кг | n | ДП, секунды | P |
|----------|-------------|---|-------------|-------|
| Контроль | — | 8 | 1,15±0,073 | — |
| L-NAME | 25 | 3 | 0,87±0,035 | >0,05 |
| L-NAME | 50 | 3 | 0,96±0,050 | >0,05 |
| AG | 50 | 4 | 1,43±0,058 | <0,05 |
| AG | 100 | 2 | 1,75±0,140 | <0,05 |

стимулом для выполнения побежки в КК предварительно дегидратированными животными (в течение 48 часов) было открытие дверцы стартового отсека; безусловным стимулом — вода. Количество воды в поилке ограничивалось и составляло 0,5 мл. Крысы для удовлетворения питьевой мотивации совершали несколько побегов из стартового отсека в целевой. В процессе перемещения животных по КК у них закреплялся условный рефлекс двигательной активности, совершенствовался процесс обучения, и вырабатывалась тактика УРП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Критерием уровня ПМ являлись длительность побегов (ДП) животных к поилке с водой, количество побегов крыс в КК за один цикл эксперимента и объем потребляемой животными воды для удовлетворения питьевой мотивации.

L-AR вводился крысам (100 или 200 мг/кг массы) внутрибрюшинно на первый и второй день водной депривации и за 2 часа до определения УРП. AG (50 или 100 мг/кг массы) и L-NAME (25 или 50 мг/кг массы) вводились крысам интраперитонеально по той же схеме. Такая схема экспериментов была выбрана исходя из того, что за 2 часа вводимые вещества всасывались из брюшной полости в кровь, а период полураспада ингибиторов NO-синтазы составляет 4 часа.

Известно, что под влиянием iNOS образуется более 100 мкмоль NO, которое может поддерживаться на этом уровне в течение нескольких часов [11].

С целью подтверждения изменений содержания NO в организме крыс определяли сумму нитрита (NO₂⁻) и нитрата (NO₃⁻) в сыворотке крови с реактивом Грисса после восстановления нитрата в нитрит насыщенным раствором VC1₃ [12]. После интраперитонеального введения животным L-аргинина сумма стабильных метаболитов NO_x в

плазме крови крыс увеличивалась на 45 % по сравнению с фоновым уровнем (3,2±0,25 мкг/мл), а при действии на организм животных аминокислотина и L-NAME — снижалась. По Н.П. Дмитриенко после внутрибрюшинного введения крысам L-AR (336 мг/кг) суммарное содержание нитритов и нитратов в сыворотке крови увеличивалось до 5,0±0,63 мкг/мл [13].

Интраперитонеальное введение L-AR (100 и 200 мг/кг) крысам вызывало достоверное снижение длительности побегов животных к поилке с водой соответственно на 34 и 40 %, тогда как интраперитонеальное введение ингибитора индуцибельной NO-синтазы AG (50 или 100 мг/кг массы) — к увеличению ДП на 24 % и 43 % (табл. 1).

Введение L-AR в боковой желудочек мозга крыс, также как при интраперитонеальной инъекции этой аминокислоты, дозозависимо снижало длительность побегов животных к поилке с водой на 39 % и 44 % (табл. 2).

Вместе с тем, при интравентрикулярном введении L-NAME в дозе 5 мкг ДП животных к поилке с водой снижалась на 29 %, а удвоенное количество ингибитора pNOS не изменяло длительность побегов животных.

Одним из критериев оценки УРП животных была регистрация побегов к поилке с водой (0,5 мл) и количества потребляемой крысами воды (мл/100 г массы тела). Было выявлено, что интраперитонеальное введение донора NO L-аргинина дозозависимо снижало потребление крысами воды на 22 и 32 %. При интравентрикулярном введении L-AR в количестве 10 мкг отличий в потреблении животными воды по сравнению с контрольной группой животных выявлено не было, а 20 мкг — достоверно снижало ПВ на 25 % (табл. 3).

Таким образом, на фоне доминирующей питьевой мотивации побегов к воде выполнялись крысами

Длительность побегов (ДП) животных к поилке с водой после интравентрикулярного введения L-аргинина и ингибиторов NO-синтаз

| Варианты | Доза, мкг | n | ДП, секунды | P |
|----------|-----------|----|-------------|-------|
| Контроль | — | 10 | 0,98±0,075 | — |
| L-AR | 10 | 4 | 0,60±0,015 | <0,05 |
| L-AR | 20 | 4 | 0,55±0,010 | <0,05 |
| L-NAME | 5 | 3 | 0,70±0,018 | <0,05 |
| L-NAME | 10 | 3 | 0,88±0,010 | >0,05 |
| AG | 10 | 3 | 0,88±0,041 | >0,05 |

быстрее при интравентрикулярном введении L-AR, но их продолжительность не изменялась под влиянием L-NAME. В тоже время с каждой последующей побеговкой в КК доминирующая питьевая мотивация у животных снижалась, что подтверждается уменьшением КП и ПВ под влиянием L-AR. L-NAME оказывало, по-видимому, тормозное влияние на УПП крыс, так как под влиянием ингибитора NO-синтаз КП и ПВ увеличивалось. Вместе с тем, следует отметить, что L-NAME оказывал более выраженное тормозное действие на УПП тех крыс, которым ингибитор вводился перед началом выполнения обучения, чем на предварительно обученных животных.

В нейронах мозга крыс содержится до 100 нмоль/г ткани L-AR [14]. Следовательно, только введение в латеральный желудочек мозга крыс

114,74 нмоль L-аргинина (20 мкг) снижало КП и потребление животными воды. Однако, после интравентрикулярного введения животным L-AR изменений в плазме крови крыс метаболитов NO_x (NO₂⁻ + NO₃⁻) выявлено не было.

Сравнение действия ингибиторов NO-синтаз при различном способе введения в организм показало, что L-NAME при интраперитонеальном (50 мг/кг) и интравентрикулярном (10 мкг) введении увеличивал потребление крысами воды, тогда как ингибитор индуцибельной NO-синтазы AG (50 мг/кг) при интраперитонеальном введении стимулировал (на 27%), а при интравентрикулярном (10 мкг) не изменял питьевую мотивацию крыс.

В ряде работ было показано, что NO модулирует питьевое поведение у крыс. Введение L-аргинина (5 и 10 мкг) в латеральный желудочек мозга крыс

Таблица 3

Количество побегов (КП), совершенных крысами для удовлетворения питьевой мотивации, и потребление воды (ПВ) после интраперитонеального и интравентрикулярного введения L-аргинина и ингибиторов NO-синтаз

| Варианты | Интраперитонеально, n=6 | | | Интравентрикулярно, n=4 | | |
|----------|-------------------------|---------|-------------------------|-------------------------|---------|-------------------------|
| | Доза, мг/кг | КП | ПВ, мл/кг ⁻¹ | Доза, мкг | КП | ПВ, мл/кг ⁻¹ |
| Контроль | — | 24±1,7 | 5,1±0,20 | — | 28±2,1 | 5,6±0,41 |
| L-AR | 100 | 19±1,5* | 4,0±0,35* | 10 | 24±2,4 | 4,8±0,44 |
| L-AR | 200 | 16±1,2* | 3,5±0,26* | 20 | 21±2,0* | 4,2±0,35* |
| L-NAME | 25 | 23±1,0 | 4,9±0,21 | 5 | 32±2,7 | 6,5±0,51 |
| L-NAME | 50 | 30±2,0* | 6,4±0,51* | 10 | 37±2,7* | 7,0±0,51* |
| AG | 50 | 29±1,4* | 6,5±0,48* | 10 | 24±2,6 | 4,6±0,48 |

* Достоверность отличий: по сравнению с контролем P<0,05.

после суточной водной депривации или стимулирования внутрижелудочковой инъекцией ангиотензина II (250 нг) вызывало дозозависимый антидиуретический эффект, но потребление воды не изменялось у обычно гидратированных животных [15, 16]. Вместе с тем, при инъекции в желудочки мозга L-аргинина (20 мкг в растворе 0,15 моль NaCl) потребление воды крысами по сравнению с контролем не изменялось, а L-NAME (40 мкг) в этих же условиях стимулировал питьевую мотивацию [17].

Известно, что в механизме формирования питьевой мотивации и регуляции потребления воды принимают участие гормоны аргинин-вазопрессин, окситоцин, натрийуретический и др. [1]. Концентрация вазопрессина в крови крыс, содержащихся в условиях нормального водного рациона, составляет 1,7—5,2 пг/мл, а при дегидратации (48 часов) — увеличивается [18]. Очевидно, что NO оказывает модулирующее влияние на ангиотензинергическую и холинергическую системы мозга [15, 16, 17, 19, 20]. В частности, было показано, что у крыс, имеющих свободный доступ к воде, интравентрикулярное введение L-AR не изменяло концентрацию вазопрессина (ВП), окситоцина (ОТ) и натрийуретического пептида (НУП) в плазме крови, а L-NAME, соответственно увеличивал их концентрацию. При стимуляции питьевой мотивации ангиотензином II донор и ингибитор NO-синтазы, напротив, снижал концентрацию ВП, ОТ и НУП в плазме крови крыс [18]. А.П. Салеем было выявлено, что интраперитонеальное введение L-AR на фоне 2-х суточной водной депривации снижало питьевую мотивацию у крыс на 34%, а L-NAME ее повышал на 43% по сравнению с контролем [21].

Проведенные исследования показали, что при интраперитонеальном введении крысам 500—1000 нмоль L-AR потребление воды снижалось, а после интавентрикулярной инъекции 50—100 нмоль — не изменялось. Таким образом, действие NO зависит от его количества. В частности, при концентрациях, не превышающих 10 мкмоль/кг ткани, оксид азота вызывал вазодилатацию и снижение артериального давления крови. Интраперитонеальное введение крысам 3 мкмоль L-AR вызывало летальный исход (L_{50}).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментальных исследований и анализ литературы показали, что оксид азота принимает участие в регуляции условнорефлекторного поведения, формирования питьевой мотивации и энграммы памяти.

Оксид азота оказывает модулирующее влияние на механизмы поведения в условиях дегидратации организма. По-видимому, активность нейрональной NO-синтазы в нейронах мозга при дегидратации организма снижена, а ингибирование в этих условиях NO-синтазы приводит к дальнейшему уменьшению синтеза NO и увеличению потребления воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Физиология водно-солевого обмена и почки / Отв. ред. Ю. В. Наточин. — СПб.: Наука, 1993. — 576 с.
2. Stricker E. M. Thirst / E. M. Stricker, A. F. Sved // Nutrition. — 2000. — Vol. 16, № 10. — P. 821—826.
3. Судаков К. В. Доминирующая мотивация // К. В. Судаков. — М.: Изд-во РА МН, 2004. — 236 с.
4. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada, R. Palmer, E. Higgs // Pharmac. Rev. — 1991. — Vol. 43, № 2. — P. 109—142.
5. Hibbs J. B. Infection and nitric oxide // J. B. Hibbs. — J. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 185, № 1. — P. 9—17.
6. Меньщикова Е. Б. 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.
7. Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour / G. Calapai [et al.] // Neuropharmacology. — 1992. — Vol. 31, № 8. — P. 761—764.
8. Effect of injection of L-NAME on drinking response / W. A. Saad [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. — 1999. — Vol. 32, № 11. — P. 1413—1416.
9. Каменский А. А. Оксид азота и поведение // А. А. Каменский, К. В. Савельева. — М., 2002. — 156 с.
10. Салей А. П. Роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения / А. П. Салей, М. И. Рецкий // Вестн. ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. — 2003. — № 1. — С. 75—80.
11. Andrew M. Enzymatic function of nitric oxide synthases / M. Andrew, B. Mayer // Cardiovasc Res. — 1999. — Vol. 43. — P. 521—531.
12. Блинецова Г. Н. Спектрофотометрический метод определения метаболитов оксида азота / Г. Н. Блинецова, Н. В. Ермакова, З. Д. Мухаммед // Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация. — 2002. — Т. 1, № 1. — С. 56—60.
13. Дмитриенко Н. П. Аргинин: биологическое действие на синтез оксида азота // Н. П. Дмитриенко, Т. О. Кишко, С. Г. Шандренко. — Украинский химиотерапевтический журнал. — 2008. — Т. 22, № 1—2. — С. 137—140.
14. Биохимия мозга / И. П. Ашмарин [и др.] — СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета, 1999. — 328 с.
15. Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour / G. Calapai [et al.] // Neuropharmacology. — 1992. — Vol. 3, № 8. — P. 761—764.

16. *Capalai G.* Nitric oxide and drinking behaviour / G. Capalai, A. Caputo // Regular paper. — 1996. — Vol. 66. — P. 117—121.

17. Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats / W. L. Reis [et al.] // Exp. Physiol. — 2007, № 5. — P. — 903—911.

18. *Dogterom J.* Vasopressin in cerebrospinal fluid and plasma in man, dog and rat / J. Dogterom, T. Wimersma Greidanus, D. De Wied // Amer. J. Physiol. — 1978. — Vol. 234, № 3. — P. E463-E467.

19. Central nitric system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressure induced by

angiotensin-II / W. L. Reis [et al.] // Behavioral and Brain Functions. — 2010. — № 6. — P. 64—72.

20. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation / F. Lauand [et al.] // Neuroscience. — 2007. — Vol. 147. — P. 247—257.

21. *Салей А. П.* Влияние доноров оксида азота и ингибиторов NO-синтаз на питьевую мотивацию дегидратированных крыс / А. П. Салей // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Поиск новых физиологически активных веществ. Часть II. — Воронеж, 2010. — С. 335—337.

Салей Анатолий Петрович — к.м.н., доцент кафедры физиологии человека и животных ВГУ; тел.: (473) 220-8450, e-mail: saley64@yandex.ru

Saley Anatoly P. — Docent, PhD (Medicine) of the Department of the Human and Animal Physiology VSU; tel.: (473) 220-8450, e-mail: saley64@yandex.ru

Мещерякова Марина Юрьевна — асс. кафедры физиологии человека и животных ВГУ; тел.: (473) 220-8450

Mescheryakova Marina U. — Ass. of the Department of the Human and Animal Physiology VSU; tel.: (473) 220-8450