

## **ФИЗИОЛОГИЯ**

### **ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА И БЛОКАТОРОВ NO-СИНТАЗЫ И ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ НА ВЫРАБОТКУ УСЛОВНОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА АВЕРЗИИ НА ПИЩУ У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ**

**Л.Н. Муранова, Т.Х. Богодвид, В.В. Андрианов, Х.Л. Гайнутдинов**

**Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУВПО Казанского (Приволжский) федерального университета (директор – проф. А.П. Киясов)**

Экспериментально показано, что блокирование NO-синтазы неспецифическим блокатором нейрональной NO-синтазы L-NAME перед выработкой условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу замедляет скорость обучения виноградных улиток. Экзогенные доноры оксида азота (NO) нитропруссид натрия и динитрозильный комплекс железа, наоборот, ускоряют обучение. Хроническое введение специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ также ускоряет обучение. Полученные результаты свидетельствуют, что в исследованном нами виде обучения NO модулирует процесс формирования условного рефлекса.

**Muranova L.N., Bogodvid T.Kh., Andrianov V.V., Gainutdinov Kh.L.**

Experimentally it was shown that the inhibition of NO-synthase by nonspecific inhibitor of neuronal NO- synthase L-NAME before the elaboration of defensive reflex of food averse conditioning slows down the speed of learning of snails. Exogenous donors of nitric oxide (NO) sodium nitroprusside and dinitrosyl iron complex, on the contrary, accelerates the elaboration of defensive reflex of food averse conditioning in snails. Chronic injection of specific inhibitor of soluble granulate cyclase – ODQ also accelerates the learning. The received results show that in the investigated form of training NO modulated the process of elaboration of the conditioned reflex.

**Ключевые слова:** оксид азота, нитропруссид натрия, динитрозильный комплекс железа, L-NAME, аверзия к пище.

**Адрес для корреспонденции:** kh\_gainutdinov@mail.ru Гайнутдинов Х.Л.

В организме человека и животных практически во всех органах и тканях ферментативным путем непрерывно продуцируется простейшее химическое соединение - оксид азота (NO). NO является естественным регулятором артериального тонуса, и содержащие его соединения широко используются в современной кардиологической клинике. В качестве лекарственных средств, оказывающих гипотензивное действие, часто используют препараты-доноры NO на основе органических нитратов (нитроглицерин, нитропруссид и др. аналоги), которые быстро метаболизируются в организме с выделением

NO. Однако при длительном их использовании развивается привыкание и, как следствие, толерантность к определенной дозе, а вынужденное повышение дозы вводимого препарата может вызывать гиперпродуцирование NO и приводить к неблагоприятным последствиям. В связи с этим, в настоящее время активно изучаются свойства и возможности применения в клинической практике также других препаратов – доноров NO. К таким препаратам можно отнести динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с различными тиол-содержащими лигандами (цистеин, глутатион, тиосульфат) (Vanin, 2009). Известно, что такие комплексы оказывают длительный гипотензивный эффект (Lakomkin et al. 2007), они способны подавлять накопление высоких концентраций пероксинитрита (Лобышева и др., 1999), а также перехватывать супероксидные радикалы (Shumakov et al., 2008). ДНКЖ, как природная форма депонирования NO, обладает эффективным и безопасным действием, как донор NO и кардиопротектор.

В различных ганглиях виноградной улитки *Helix lucorum* гистохимическим методом были выявлены NADPHd-позитивные нейроны синтезирующие NO. Деполяризующее действие на NADPHd-позитивные нейроны оказывают доноры оксида азота (Zsombok A. et al., 2000; Kerschbaum H.H., 2000). Они снижают пороги возбуждения, усиливают ответы на стимуляцию и потенцируют возбуждающее действие глутамата. NO контролирует пластические свойства этих нейронов: блокатор NO-синтазы способствует развитию привыкания, а доноры оксида азота дают эффект сенситизации. Различные доноры NO оказывают на серотониновые нейроны такое же действие, как и серотонин. Они вызывают деполяризацию, повышение импульсной и синаптической активности. Их действие обратимо и воспроизводится при повторном применении. Серотонин и доноры NO взаимно усиливают эффекты друг друга (Дьяконова Т.Л., 2000).

NO является одним из наиболее важных посредников, который участвует в функционировании разнообразных систем организма. У моллюсков, как и у млекопитающих, NO играет роль межклеточного мессенджера и сигнальной молекулы в различных отделах нервной системы, кроме того, недавно стало известно, что NO необходим как для обучения, так и для стирания памяти. Участие NO в синаптической пластичности наиболее ярко проявляется в таких процессах, как долговременная потенция и депрессия. С долговременной синаптической потенцией, прежде всего, в гиппокампе, связывают пластичность межнейронных связей, лежащих в основе памяти (Huang S. et al., 1998; Zsombok A. et al., 2000; Susswein A.J. et al., 2004; Yabumoto T. et al., 2008; Балабан П.М. и др., 2011, Korshunova T.A., Balaban P.M., 2014). Универсальной мишенью для NO во многих клетках является фермент растворимая гуанилатциклаза (Wang, 2004).

Поэтому было интересно посмотреть влияние NO на разные формы обучения. В данной работе мы выбрали форму обучения, ведущую к формированию процедурной памяти (условный оборонительный рефлекс аверзии на пищу). Были исследованы воздействия экзогенного источника или донора NO нитропруссид натрия, донора NO ДНКЖ, неспецифического блокатора нейрональной NO-синтазы L-NAME, специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ на выработку условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у виноградной улитки.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты проводились на наземном брюхоногом легочном моллюске *Helix lucorum*, (*Gastropoda*, *Pulmonata*) крымской популяции. Эти животные обладают относительно простой нервной системой при достаточно разнообразном поведении. Перед началом экспериментов моллюски не менее 2-х недель находились в активном состоянии во влажной атмосфере, при комнатной температуре (18-22<sup>0</sup>С) и избытке пищи. Для экспериментов отбирались животные примерно одного веса (около 20-25 г).

В работе были использованы растворы фармакологических препаратов: L-NAME (L-N<sup>G</sup>-nitro L-arginine methyl ester, Sigma, USA) в дозе 100 мг/кг веса животного, нитропруссид натрия (sodium nitroprusside, Sigma, USA) в дозе 500 мкг/кг веса, ДНКЖ в дозе 20 мг/кг, ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one, Sigma, USA) в дозе 2 мг/кг веса животного. Блокатор NO-синтазы L-NAME, доноры NO нитропруссид натрия и ДНКЖ, ODQ (растворенных в физиологическом растворе – ФР) вводили виноградным улиткам ежедневно за 30 мин до начала сеанса выработки рефлекса (в объеме 0,1 мл) в область синусного узла. Контролем служили улитки, которым вводили ФР (0.1 мл) в те же сроки, что и в опытных сериях. число улиток активного контроля (n=8), число улиток, обучавшихся после инъекций донора оксида азота нитропруссид натрия (n=6), донора оксида азота ДНКЖ (n=6), блокатора гуанилатциклазы ODQ (n=6), блокатора NO-синтазы L-NAME (n=6).

Для выработки условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу в качестве условного стимула предъявлялся кусочек огурца, безусловным стимулом служил электрический ток. До и во время эксперимента данный вид пищи не использовался для кормления животных. Кусочек огурца на металлическом стержне подносили к оральной области улитки и в момент первого жевательного движения через стержень пропускали ток величиной в 1 мА частотой 50 Гц в течение 0,5 с. Другой электрод прикладывали к ноге улитки. Использованный нами ток не вызывал повреждений кожи животных, которые возникают в виде пигментированных участков при более значительной величине тока. Сочетания пищи и тока предъявляли с интервалами в 10-15 мин. Рефлекс считался

выработанным после того, как улитка 10 раз подряд, избегала пищевой стимул, либо проявляла оборонительную реакцию в ответ на предъявление пищи, не дожидаясь подкрепления. Пища до сочетаний с током не приводила к оборонительной реакции.

Результаты были статистически обработаны. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента и U- критерию Манна-Уитни.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### ***воздействие доноров оксида азота нитропруссид натрия и ДНКЖ на выработку условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у виноградной улитки***

В ходе экспериментов было найдено, что хроническое введение экзогенного донора NO нитропруссид натрия ускоряет выработку условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у виноградных улиток по сравнению с животными, которым вводили ФР. Улитки после введения нитропруссид натрия полностью обучились за  $45,2 \pm 1,5$  ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ) сочетаний, контрольная группа животных обучилась за  $73,3 \pm 2,7$  ( $n=8$ ) сочетаний условного и безусловного стимулов (рис. 1; 3). Хроническое введение ДНКЖ также ускоряет выработку условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у виноградных улиток по сравнению с животными, которым вводили ФР. Улитки после введения ДНКЖ полностью обучились за  $53 \pm 2$  ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ) сочетаний, контрольная группа животных обучилась за  $73,3 \pm 2,7$  ( $n=8$ ) сочетаний условного и безусловного стимулов (рис. 1; 3).

### ***воздействие неспецифического блокатора NO-синтазы L-NAME на выработку условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у виноградной улитки***

Ежедневное блокирование NO-синтазы L-NAME перед формированием условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу, наоборот, замедляло обучение виноградных улиток по сравнению с контрольной группой. Улитки, получавшие инъекции L-NAME, обучились за  $89,3 \pm 0,8$  ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ) сочетаний условного и безусловного стимулов (рис. 2; 3).

### ***воздействие ODQ на выработку условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у виноградной улитки***

В данной серии экспериментов было показано, что хроническое введение специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ ускоряет выработку условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у виноградных улиток по сравнению с животными, которым вводили ФР. Улитки после введения ODQ полностью обучились за  $48,5 \pm 2,4$  ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ) сочетаний, контрольная группа животных обучилась за  $73,3 \pm 2,7$  ( $n=8$ ) сочетаний условного и безусловного стимулов (рис. 2; 3).

Таким образом, неспецифический блокатор NO-синтазы L-NAME замедляет формирование долговременной памяти на условный оборонительный рефлекс аверзии на

пищу у виноградной улитки. Экзогенные доноры NO нитропруссид натрия и ДНКЖ, наоборот, ускоряют выработку условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у виноградной улитки по сравнению с контрольными животными. Так же ускоряет выработку условного оборонительного рефлекса ингибирование растворимой гуанилатциклазы блокатором ODQ.

Литературные данные свидетельствуют о том, что в нервной системе улитки серотонин и NO однонаправлено регулируют функцию серотонинергической системы. Доноры NO, как и серотонин, блокируют привыкание на уровне электровозбудимой мембраны и снижают пороги возбуждения нейронов (Дьяконова Т.Л., Реутов В.П., 1998). Было выдвинуто предположение, что NO тонически участвует в формировании фоновой активности серотониновых нейронов (блокирование синтеза NO снижает уровень фоновой активности). NO опосредует или усиливает возбуждающее действие серотонина на серотониновых нейронах (блокирование синтеза NO уменьшает это действие серотонина). И, наконец, NO участвует, по-видимому, в механизме синаптической передачи от общего пачечного входа или причастен к генерации эндогенной пачечной активности пресинаптическим нейроном (блокирование синтеза NO включает синхронную пачечную активность и подавляет ее активацию серотонином, а добавление экзогенного оксида азота восстанавливает эту активность). Имеются литературные данные, которые указывают на то, что NO участвует в процессах обучения (Teyke T., 1996, Susswein A.J. et al., 2004; Балабан П.М. и др., 2011, Korshunova T.A., Valaban P.M., 2014). Возможно, NO является вторичным посредником при возбуждающем действии серотонина (Дьяконова Т.Л., 2000). Наши результаты свидетельствуют, что в исследованном нами виде обучения NO модулирует процесс формирования условного рефлекса.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержке РФФИ (грант № 15-04-05487).

Муранова Людмила Николаевна (Muranova L.N.)

Богодвид Татьяна Халиловна (Bogodvid T.Kh.)

Андрианов Вячеслав Вадимович (Andrianov V.V.)

Гайнутдинов Халил Латыпович (Gainutdinov Kh.L.)

Адрес для переписки: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский  
(Приволжский) федеральный университет

Гайнутдинов Халил Латыпович

раб. тел. (8-843)231-90-77; E-mail: kh\_gainutdinov@mail.ru

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балабан П. М., Роцин М. В., Коршунова Т. А.. Двуликий оксид азота необходим и для стирания памяти и для формирования памяти // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2011. Т. 61. № 3. С. 274-280.
2. Дьяконова Т.Л., В.П. Реутов Влияние нитрита на возбудимость нейронов мозга виноградной улитки // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 1998. Т. 84. № 11. С. 1264-1272.
3. Дьяконова Т.Л. Взаимодействие серотонина и оксида азота (NO) в активации серотонинергической системы у виноградной улитки // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2000. Т. 86. № 9. С. 1210-1219.
4. Лобышева И.И., Серезенков В.А., Ванин А.Ф. Взаимодействие динитрозильных тиолсодержащих комплексов железа с пероксинигритом и перекисью водорода. //Биохимия. 1999. Т.64. № 2. С. 194 - 200.
5. Huang S., Kershbaum H.H., Engel E., Hermann A. Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia* // J. Neurochem. 1998. V. 69. P. 2516-2528.
6. Kerschbaum H.H. NADPH-diaphorase activity and nitric oxide synthase activity in the kidney of clawed frog, *Xenopus laevis* / H.H. Kerschbaum, S. Huang, M. Xie, A. Hermann // Cell Tissue Res. 2000. V. 301. № 3. P. 405-411.
7. Korshunova T.A., Balaban P.M. Nitric oxide is necessary for long-term facilitation of synaptic responses and for development of context memory in terrestrial snails // Neuroscience. 2014. № 01. V. 266. P. 127–135.
8. Lakomkin V.L., Vanin A.F., Timoshin A.A., Kapelko V.I., Chazov E.I. Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl-iron complexes with thiol- containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats. // Nitric Oxide: Biology and Chemistry. 2007. V.16. № 4. P. 413-418.
9. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress // Methods in Enzymology. 2008. V.436, Part A. P.445 – 461
10. Susswein A.J., Katzoff A., Miller N., Hurwitz. I. Nitric Oxide and Memory // Neuroscientist. 2004. T.10. №2. P. 153-162.
11. Teyke T. Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail *Helix pomatia* / T. Teyke // Neurosci. Lett. 1996. V. 206. P. 29-32
12. Vanin A.F. Dinitrosyl-iron complexes with thiolate ligands: Physico-chemistry,

- biochemistry and physiology // Nitric Oxide: Biology and chemistry. 2009. V.21. P.1-13.
13. Wang, R. Signal Transduction and the Gasotransmitters. NO, CO and H<sub>2</sub>S in Biology and Medicine // Totowa: Humana Press, 2004. P. 377.
  14. Yabumoto T., Takanashi F., Kirino Y., Watanabe S. Nitric oxide is involved in appetitive but not aversive olfactory learning in the land mollusk *Limax valentianus* // Learn. Mem. 2008. V. 15. P.229-232
  15. Zsombok A., Schrofner S., Hermann A., Kerschbaum H.H. Nitric oxide increases excitability by depressing a calcium activated potassium current in snail neurons // Neurosci. Lett. – 2000. V.295. №3. P.85-88

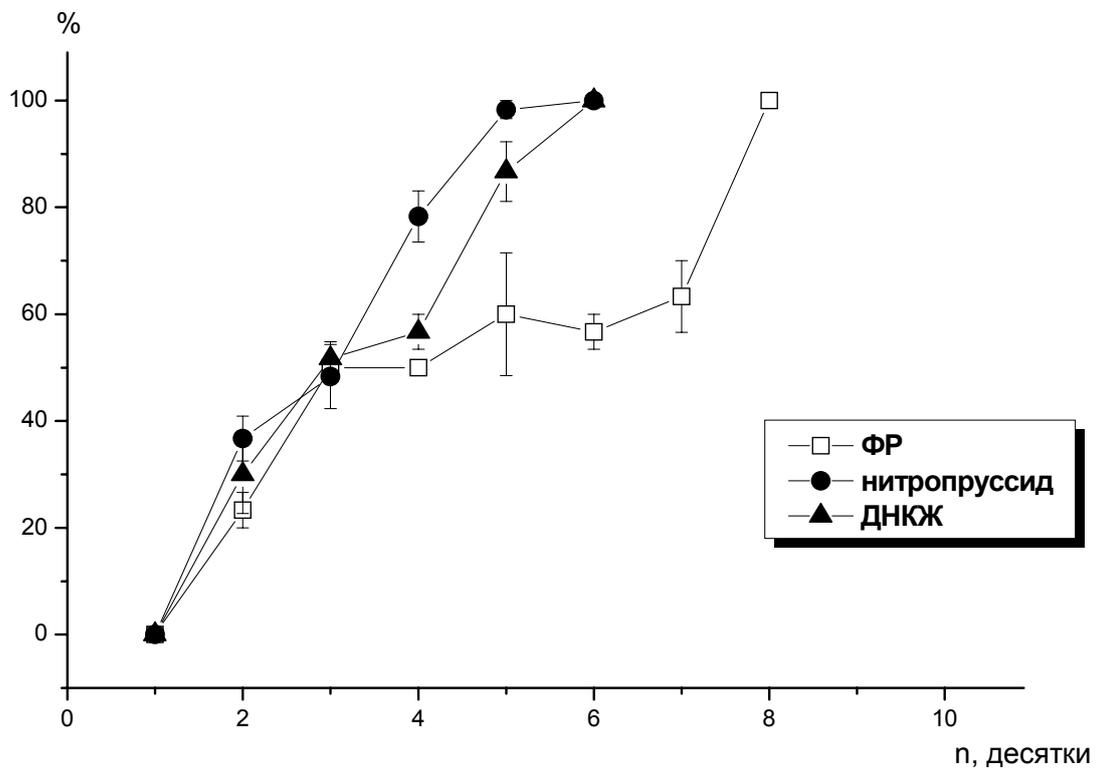


Рис.1. Динамика выработки условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у групп после инъекций доноров NO нитропруссид натрия (нитропруссид), динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ), и физиологического раствора (ФР). n – число сочетаний условного и безусловного стимулов. % - количество положительных (вырабатываемых) ответов в каждом десятке сочетаний.

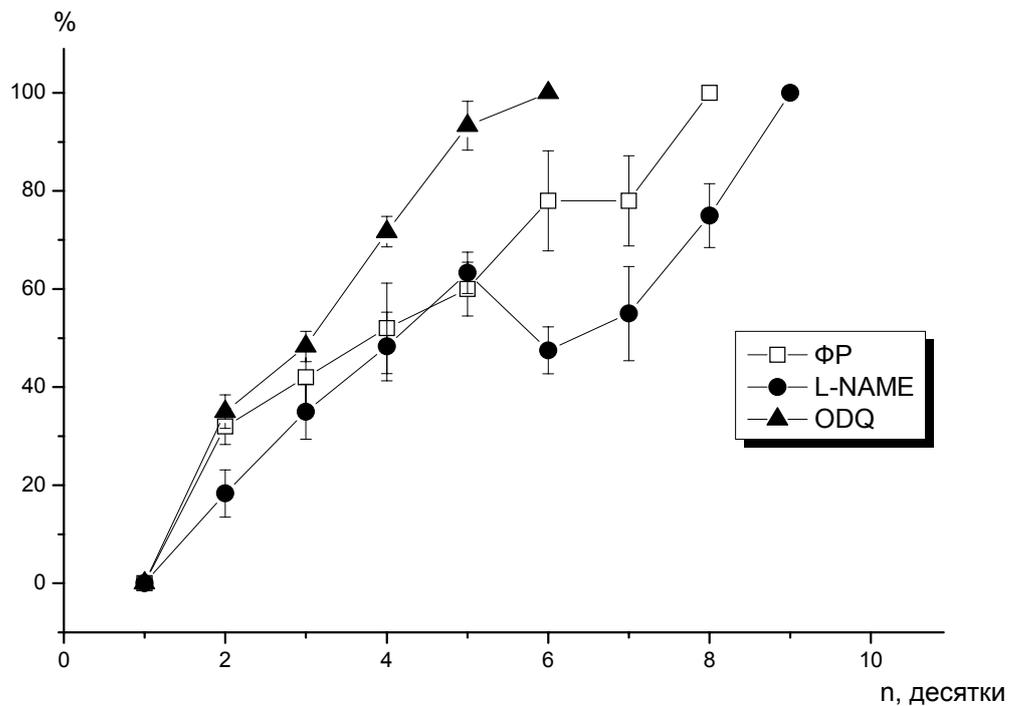


Рис.2. Динамика выработки условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у групп после инъекций блокатора NO-синтазы L-NAME (L-NAME), специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ (ODQ), и физиологического раствора (ФР). n – число сочетаний условного и безусловного стимулов. % - количество положительных (вырабатываемых) ответов в каждом десятке сочетаний.

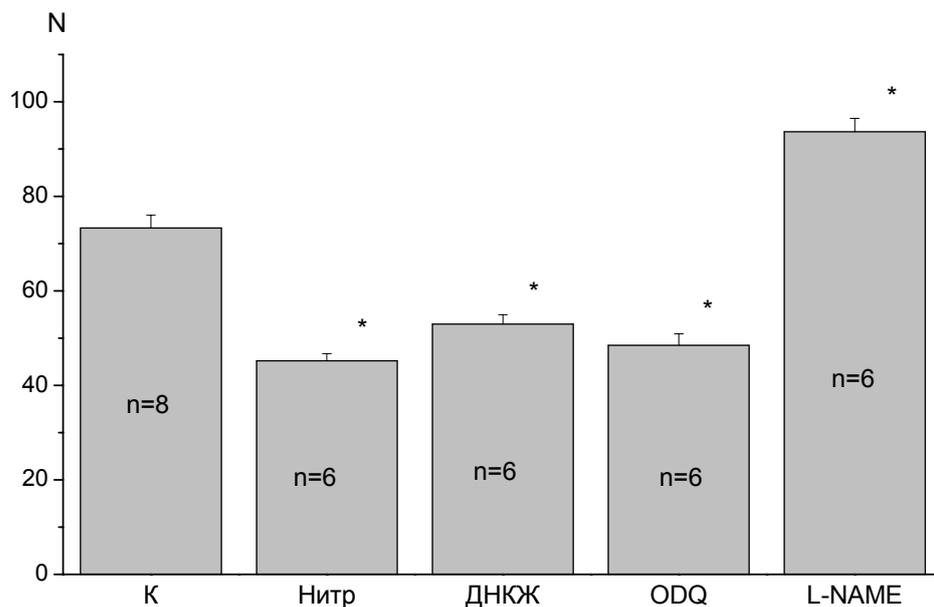


Рис.3. Количество сочетаний условного и безусловного стимулов, необходимых для выработки условного оборонительного рефлекса аверсии на пищу у групп после инъекций блокатора NO-синтазы L-NAME (L-NAME), специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ (ODQ), физиологического раствора (К) и доноров NO нитропруссид натрия (Нитр) и динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ). n – количество животных в группе. N - количество сочетаний условного и безусловного стимулов необходимых для достижения состояния животного, при котором в ответ на десять предъявляемых подряд условных стимулов наблюдается положительный ответ (такой же, как в ответ на безусловный стимул).

### **Подпись к рисункам в статье**

Рис.1. Динамика выработки условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у групп после инъекций доноров NO нитропруссид натрия (нитропруссид), динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ), и физиологического раствора (ФР).  $n$  – число сочетаний условного и безусловного стимулов. % - количество положительных (вырабатываемых) ответов в каждом десятке сочетаний.

Рис.2. Динамика выработки условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у групп после инъекций блокатора NO-синтазы L-NAME (L-NAME), специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ (ODQ), и физиологического раствора (ФР).  $n$  – число сочетаний условного и безусловного стимулов. % - количество положительных (вырабатываемых) ответов в каждом десятке сочетаний

Рис.3. Количество сочетаний условного и безусловного стимулов необходимых для выработки условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу у групп после инъекций блокатора NO-синтазы L-NAME (L-NAME), специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ (ODQ), физиологического раствора (К) и доноров NO нитропруссид натрия (Нитр) и динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ).  $n$  – количество животных в группе.  $N$  - количество сочетаний условного и безусловного стимулов необходимых для достижения состояния животного, при котором в ответ на десять предъявляемых подряд условных стимулов наблюдается положительный ответ (такой же, как в ответ на безусловный стимул).