

**КАРДИОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ СУБЛЕТАЛЬНЫХ И ЛЕТАЛЬНЫХ
КОНЦЕНТРАЦИЙ НИТРИТА НАТРИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ
АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА**

Лаптев Д.С., Петунов С.Г., Нечайкина О.В., Бобков Д.В.

Институт гигиены, профпатологии и экологии человека федерального медико-биологического агентства, 188 663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолковский, ст. Капитолово, корп. №93, (812) 449-61-77, gpech@fmbamail.ru

Резюме. На модели изолированного сердца крысы изучено кардиотропное действие нитрита натрия в диапазоне концентраций от 1×10^{-6} М до максимальной – $6,5 \times 10^{-2}$ М, соответствующей дозе ЛД₅₀ для целого организма. Показано, что нитрит натрия вызывает дозозависимую дилатацию коронарного русла, начиная с концентрации 1×10^{-4} М. В пороговых концентрациях (1×10^{-4} М) вазоактивное влияние нитрита натрия опосредовано NO-зависимыми механизмами и может быть купировано ингибитором растворимой гуанилатциклазы – метиленовым синим. В летальных концентрациях, соответствующих ЛД₅₀, дилатация коронарного русла обусловлена повышением содержания ионов натрия. В высоких концентрациях ($6,5 \times 10^{-2}$ М), кратных ЛД₅₀, нитрит натрия приводит к развитию отрицательного хронотропного эффекта, механизм которого не связан с активацией растворимой гуанилатциклазы и гипернатриемией.

Ключевые слова: нитрит натрия, изолированное сердце, вазодилатация, брадикардия, кардиотоксичность

**CARDIOTROPIC EFFECT OF SUBLETHAL AND LETHAL CONCENTRATIONS OF
SODIUM NITRITE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF AN ISOLATED HEART**

Laptev D.S., Petunov S.G., Nechaykina O.V., Bobkov D.V.

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology

Abstract. On the model of an isolated rat heart, the cardiotropic effect of sodium nitrite was studied in the range of concentrations from 1×10^{-6} M to the maximum – $6,5 \times 10^{-2}$ M, corresponding to the LD₅₀ dose for the whole organism. It is shown that sodium nitrite causes dose-independent dilation of the coronary bed, starting from a concentration of 1×10^{-4} M in threshold concentrations (1×10^{-4} M), the vasoactive effect of sodium nitrite is mediated by NO-dependent mechanisms and can be stopped by a soluble guanylate cyclase inhibitor-methylene blue. In lethal concentrations corresponding to LD₅₀, dilatation of the coronary bed is caused by

an increase in the content of sodium ions. In high concentrations ($6,5 \times 10^{-2}$ M), multiples of LD₅₀, sodium nitrite leads to the development of a negative chronotropic effect, the mechanism of which is not associated with the activation of soluble guanylate cyclase and hypernatremia.

Key words: sodium nitrite, isolated heart, vasodilation, bradycardia, cardiotoxicity

Введение

Влиянию нитрита натрия на сердечно-сосудистую систему человека посвящено большое количество публикаций. С физиологических позиций нитрит натрия рассматривается в качестве донора NO и, как следствие, обладает широким спектром действия на организм. В отношении сердечно-сосудистой системы показано выраженное вазодилатационное действие нитрита натрия, в том числе и на коронарные сосуды сердца. На модели изолированного сердца крысы отмечены отрицательные хронотропный и инотропный эффекты нитрита натрия [1]. На сегодняшний день проводится большое количество исследований связанных с изучением кардиопротекторного действия донора оксида азота нитрита натрия, обеспечивающего сохранение функциональной активности миокарда в условиях ишемии-реперфузии [2-3].

С точки зрения токсикологии нитрит натрия представляет собой вещество второго класса опасности (высоко опасные вещества) по ГОСТ 12.1.005-88. Предельно допустимая концентрация нитрита натрия в воздухе рабочей зоны составляет 0,1 мг/м³.

Известно, что нитриты являются сильными окислителями и способствуют образованию метгемоглобина, что, в свою очередь, ведет к развитию гемической гипоксии [4]. Ряд авторов считают нитритную гипоксию причиной значительных изменений системной и регионарной гемодинамики, проявляющихся в обратимом снижении АД и ЧСС и изменении электрокардиографических показателей [5, 6]. Приводятся данные об изменении кислотно-основного и ионного составов крови крыс, характеризующего гипоксию гемического типа с выраженной артериальной гипоксемией, декомпенсированным респираторным ацидозом и гиперкалиемией [7].

Несмотря на активное изучение, механизмы действия нитритов на миокард остаются малоизученными, а имеющиеся данные носят разрозненный характер. Обращает на себя внимание тот факт, что и в физиологических и в токсикологических исследованиях фигурируют сопоставимые дозы нитрита натрия. То есть, нет четкого представления о том, в каких концентрациях нитрит натрия оказывает вазодилатационный эффект, позволяющий бороться с гипертоническими и ишемическими состояниями, а в

каких приводит к развитию нежелательной брадикардии и снижению инотропной функции сердца.

Поскольку токсикологические эксперименты *in vivo*, в силу наличия компенсаторных регуляторных возможностей, не дают возможности в полной мере охарактеризовать кардиотропные эффекты нитрита натрия на миокард и его проводящую систему, представляется обоснованным проведение комплексной оценки влияния нитрита натрия в широком диапазоне концентраций на модели изолированного сердца крысы. Это позволит выявить минимальные начальные изменения параметров функциональной активности до появления общетоксических симптомов и оценить возможные механизмы действия.

Целью работы было изучение кардиотропных эффектов нитрита натрия в диапазоне концентраций 1×10^{-6} – $6,5 \times 10^{-2}$ М на модели изолированного сердца крысы.

Материалы и методы

Работа выполнена на изолированном сердце самцов белых крыс, полученных из питомника ФГУП Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область).

Эвтаназия животных проводилась в соответствии с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. После эвтаназии, проведенной методом первикальной дислокации, животное помещалось в препаровальную ванночку, конечности фиксировались для предотвращения сдвига при вскрытии грудной клетки. Сразу после извлечения сердца из грудной полости его помещали в физиологический раствор Кребса-Хензелейта следующего состава (в mM): NaCl – 118,99; KCl – 4,69; NaHCO₃ – 25; KH₂PO₄ – 1,18; MgSO₄×7H₂O – 1,17; CaCl₂×2 H₂O – 2,5; EDTA – 0,03; C₆H₁₂O₆ – 5,5. Аорту фиксировали к канюле перфузионной установки Langendorff System (Panlab, Испания) зажимом типа «крокодил», а затем лигатурами. Перфузию сердца осуществляли через канюлю, закрепленную в аорте, при этом перфузат ретроградно поступал в левый желудочек. В качестве перфузата использовали подогретый (37°C) раствор Кребса–Хензелейта. Для приведения его pH к физиологическому уровню (7,4) и адекватной оксигенации сердца раствор непрерывно насыщали карбогеном. Перфузат подавался в режиме постоянного протока из расчета 10 мл в минуту на один грамм сырого веса сердца. В качестве контроля адекватности перфузии служило давление (не менее 50 мм рт.ст.) в контуре «насос – аортальная канюля».

Величину давления в левом желудочке определяли катетером с полиэтиленовым баллоном. Параметры сократительной активности сердца регистрировали с помощью системы PowerLab Data acquisition system 8/30 (ADInstruments, USA) с последующей обработкой в программе «LabChartProUpgrade 7.0».

Регистрируемые показатели: давление перфузии (ДП), пульсовое давление (ПД), частота сердечных сокращений (ЧСС), конечное диастолическое давление (КДД). С помощью программного обеспечения дополнительно рассчитывались интегральный показатель минутной производительности левого желудочка сердца, соответствующий площади под кривой изменения давления в левом желудочке за одну минуту ($\text{Int}_{\text{мин}}$), максимальная скорость нарастания и снижения давления в левом желудочке ($+dP/dt$; $-dP/dt$).

Стабилизационный период, в течение которого происходит адаптация изолированного сердца к экспериментальным условиям, составляет 30 минут, после чего регистрировались показатели сократимости, которые принимались за фоновые. После окончания стабилизационного периода в перфузат добавляли нитрит натрия. Время экспозиции в каждой концентрации составляло 10 минут, что определялось скоростью формирования сосудистых реакций на действие вазоактивной субстанции. По окончании воздействия проводили «отмывание» сердца физиологическим раствором Кребса-Хензелейта с целью определения обратимости наблюдаемых эффектов.

При анализе результатов оценивали динамику параметров работы сердца по сравнению с фоновыми значениями и результатами контрольной серии экспериментов.

Статистическую обработку проводили в программе «GraphPad Prism 5.04». Для сравнения применяли Т-критерий Вилкоксона для связанных выборок, а для выявления межгрупповых различий применяли U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Изучение кардиотропного действия нитрита натрия проводили в диапазоне концентраций от 1×10^{-6} до $6,5 \times 10^{-2}$ М, что соответствует в пересчете на целый организм дозе ЛД₅₀ (таблица 1)

Таблица 1 – Перерасчет концентрации нитрита натрия, используемого в экспериментах на моделях изолированных органов, в дозы для целого организма

№ п/п	Концентрация NaNO_2 в перфузате изолированных органов, М	Доза для целого организма, рассчитанная исходя из концентрации NaNO_2 в перфузате, мг/кг
1	1×10^{-6}	$2,8 \times 10^{-3}$
2	1×10^{-5}	$2,8 \times 10^{-2}$

3	1×10^{-4}	0,28
4	1×10^{-3}	2,8
5	1×10^{-2}	28
6	$6,5 \times 10^{-2}$	180 (ЛД ₅₀)
Примечание – расчет дозы для целого организма животного произведён при 100 % биологической доступности нитрита натрия.		

В ходе экспериментальной работы выявлен существенный вазодилатационный эффект нитрита натрия на коронарное русло изолированного сердца, начиная с концентрации 1×10^{-4} М. Показано, что нитрит натрия статистически значимо снижает давление перфузии изолированного сердца в диапазоне концентраций 1×10^{-4} – $6,5 \times 10^{-2}$ М, при этом наибольшее снижение давления перфузии – на 46 % от исходного уровня – зафиксировано при использовании нитрита натрия в концентрации 1×10^{-3} М (таблица 2).

Таблица 2 – Параметры сократительной активности изолированного сердца крысы при действии нитрита натрия. Представлены относительные данные в % к фону ($M \pm SE$)

Концентрация NaNO ₂ , М	n	ДП	Int _{1мин}	ЧСС	ПД	+dP/dt	-dP/dt	КДД
Физ. раств.	20	99,3± 1,8	99,4± 2,2	98,7± 4,1	103± 4,1	100,9± 1,5	101,5± 2,9	100,1± 3,2
1×10^{-6}	7	104,5± 6,4	96,0± 2,6	95,4± 3,1	98,7± 2,1	98,9± 1,9	97,3± 1,1	90,7± 3,5
1×10^{-5}	7	100,8± 8,5	102,3± 3,6	97,1± 3,2	105,7± 3,4	102,6± 3,3	103,0± 3,3	101,0± 2,2
1×10^{-4}	7	61,6± 6,0*	107,4± 4,9	96,9± 2,1	109,6± 6,3	106,5± 2,9	104,3± 3,1	87,4± 13,1
1×10^{-3}	7	54,0± 8,3*	107,9± 6,3	97,4± 4,2	107,9± 7,4	107,5± 5,2	102,0± 4,4	98,9± 16,3
1×10^{-2}	10	69,7± 8,5*	101,2± 3,0	95,0± 2,9	108,4± 4,9	102,4± 2,7	101,2± 3,6	101,1± 8,0
$6,5 \times 10^{-2}$ (ЛД ₅₀)	10	71,7± 7,1*	82,3± 7,3*	68,7± 10,5*	106,5± 11,4	108,3± 5,8	95,7± 6,4	176,4± 22,1*
Примечание – * – статистически значимое отличие от физ. раствора при p<0,05.								

Выявленная дилатация коронарного русла может быть сопоставлена с системной реакцией на действие нитрита натрия. Подобное снижение системного давления в целом организме может привести к развитию острой формы сосудистой недостаточности – коллапсу, который характеризуется выраженным падением артериального давления, расширением вен и артерий с накоплением в них крови. Так, подкожное введение нитрита натрия крысам в дозе 1, 3 и 5 мг на 100 г массы тела вызывает брадикардию и

значительное (в два раза) снижение артериального давления в бедренной артерии до 50 мм.рт.ст. [5].

Установлено, что нитрит натрия вызывает отрицательный хронотропный эффект только в концентрации $6,5 \times 10^{-2}$ М, при этом ЧСС изолированного сердца снижается на 31,3 %, а интегральный показатель сократимости миокарда на 17,7 %. На этом фоне выявлено значительное увеличение – на 76,4 % от фонового уровня – показателя конечного диастолического давления, что может свидетельствовать о нарушении энергообеспечения расслабления миокарда, росте цитозольного содержания кальция, который в первую очередь начинает накапливаться в митохондриях и приводит к неполному расслаблению желудочков.

Нитрит натрия не оказывает статистически значимого влияния на показатели пульсового давления, скорости сокращения и расслабления левого желудочка изолированного сердца во всем диапазоне изучаемых концентраций. Также не отмечено остановок сердца, нарушений ритма сокращений, необратимых изменений основных функциональных параметров изолированного сердца.

Выше показано, что основным эффектом нитрита натрия, как донора оксида азота, на изолированном сердце крысы является дилатация коронарного русла, которая, согласно литературным данным, обусловлена увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ [8]. Для купирования вазодилатационной реакции изолированного сердца при применении нитрита натрия мы использовали метиленовый синий, как ингибитор растворимой гуанилатциклазы [9].

На модели изолированного сердца крысы установлено, что применение нитрита натрия (1×10^{-4} М) на фоне метиленового синего в концентрации 1×10^{-5} М не приводит к развитию вазодилатации коронарного русла (рисунок 1). Полученные результаты согласуются с данными литературы и позволяют объяснить вазодилатационное действие нитрита натрия в пороговых дозах.

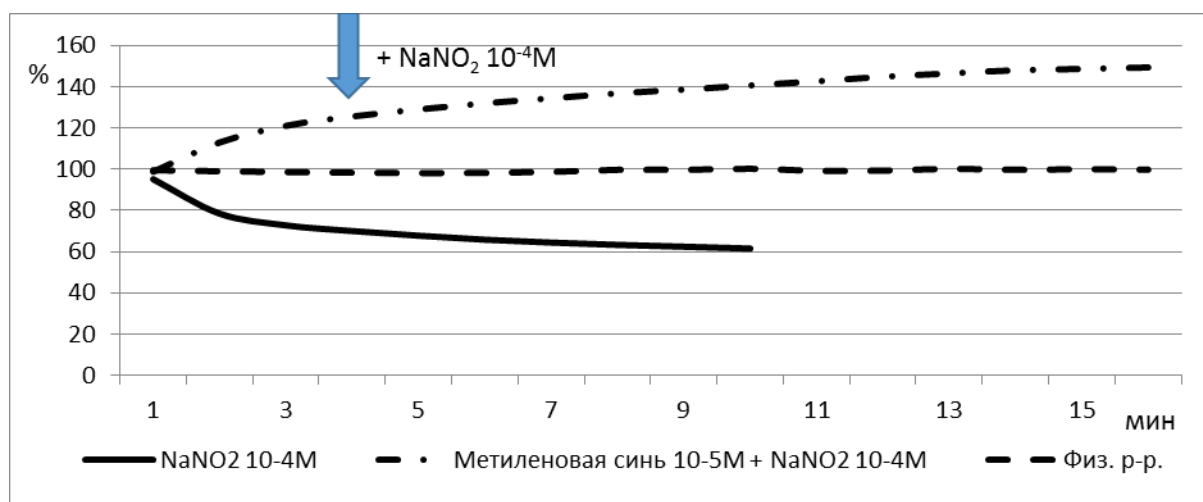


Рисунок 1 – Динамика давления перфузии изолированного сердца крысы под действием нитрита натрия в концентрации 1×10^{-4} М на фоне метиленового синего

Однако, в случае применения более высокой концентрации нитрита натрия ($6,5 \times 10^{-2}$ М), соответствующей дозе ЛД₅₀ для целого организма, предварительное введение в перфузат метиленового синего не обеспечивало купирование вазодилаторного действия нитрита натрия (рисунок 2).

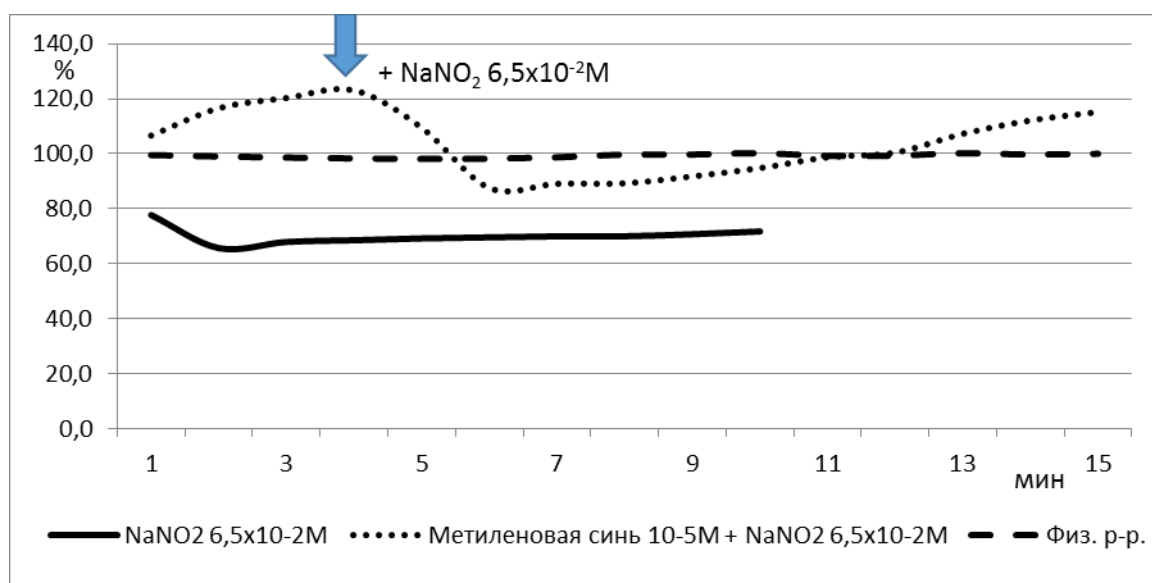


Рисунок 2 – Динамика давления перфузии изолированного сердца крысы под действием нитрита натрия в концентрации $6,5 \times 10^{-2}$ М на фоне метиленового синего

В условиях, когда концентрация метиленового синего 1×10^{-5} М является достаточной для ингибирования всего объема растворимой ГЦ, очевидно предположить, что в реализации вазодилатационных эффектов больших концентраций нитрита натрия задействованы иные механизмы, одним из которых может быть влияние изменения

ионного состава среды. При увеличении концентрации нитрита натрия до $6,5 \times 10^{-2}$ М в перфузате существенно возрастает содержание ионов натрия, которые могут оказывать на изолированное сердце собственные эффекты. Для проверки данной гипотезы была проведена серия экспериментов с использованием хлорида натрия в эквимоллярных концентрациях. В результате было показано, что хлорид натрия оказывает аналогичный вазодилатационный эффект на коронарное русло изолированного сердца, как и нитрит натрия в концентрации $6,5 \times 10^{-2}$ М (рисунок 3).

Таким образом, возможным механизмом развития вазодилатационного эффекта коронарного русла при применении высоких концентраций нитрита натрия является гипернатриемия, приводящая к высвобождению предсердного натрийуретического пептида – мощного вазодилататора.

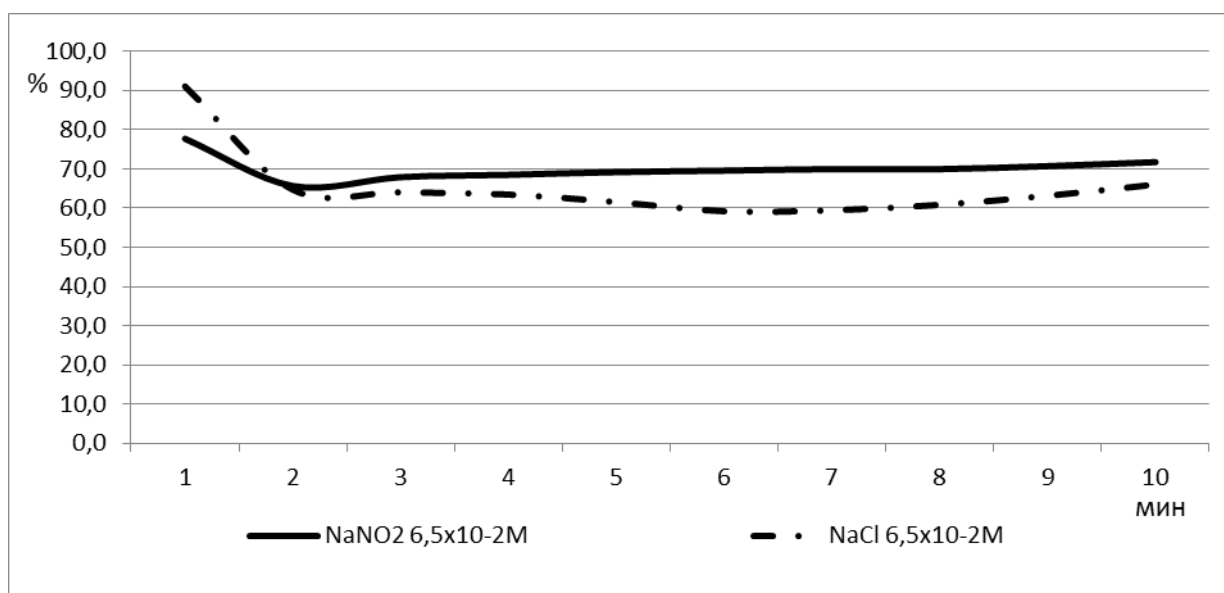


Рисунок 3 – Динамика давления перфузии изолированного сердца крысы под действием нитрита натрия и хлорида натрия в концентрации $6,5 \times 10^{-2}$ М

Кроме вазодилатационного действия, нитрит натрия в концентрациях, соответствующих уровню ЛД₅₀ для целого организма, приводит к формированию отрицательного хронотропного эффекта, который не может быть заблокирован метиленовым синим, то есть реализуется не через NO-зависимые механизмы (рисунок 4).

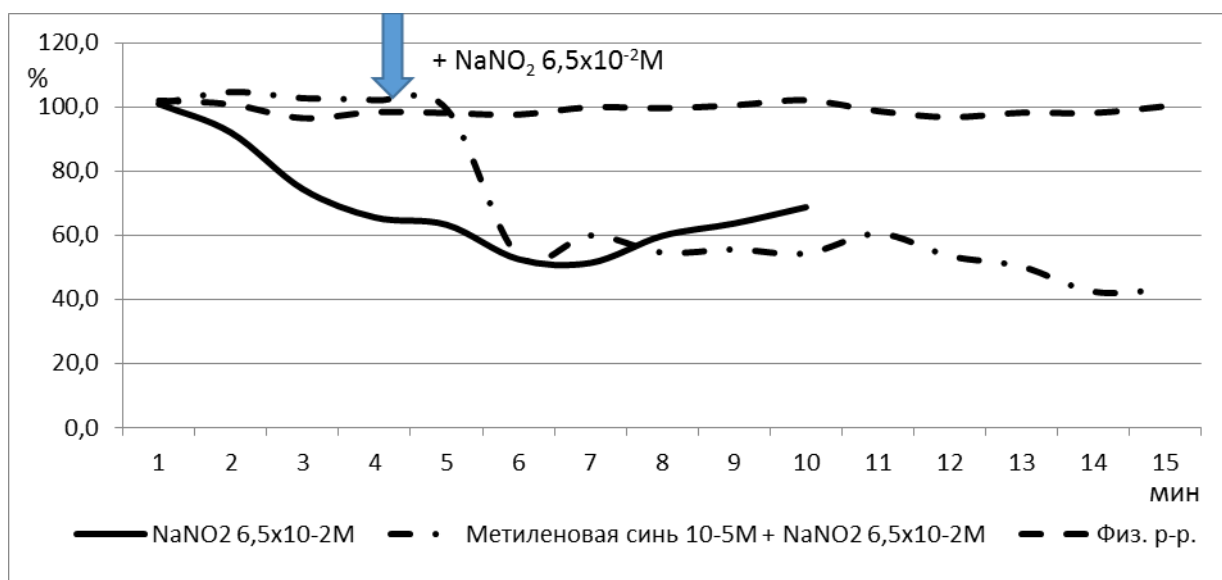


Рисунок 4 – Динамика ЧСС изолированного сердца крысы под действием нитрита натрия в концентрации $6,5 \times 10^{-2}$ М на фоне метиленового синего

В экспериментах с эквимольным количеством хлорида натрия установлено, что избыточное содержание ионов натрия в перфузате также не объясняет развития отрицательного хронотропного эффекта нитрита натрия на изолированном сердце крысы (рисунок 5), реализующегося, очевидно, через другие механизмы. В частности, оксид азота активирует работу Na^+/K^+ насоса, приводящего к развитию гиперполяризации клеточных мембран пейсмекерных клеток, что приводит к снижению ЧСС.

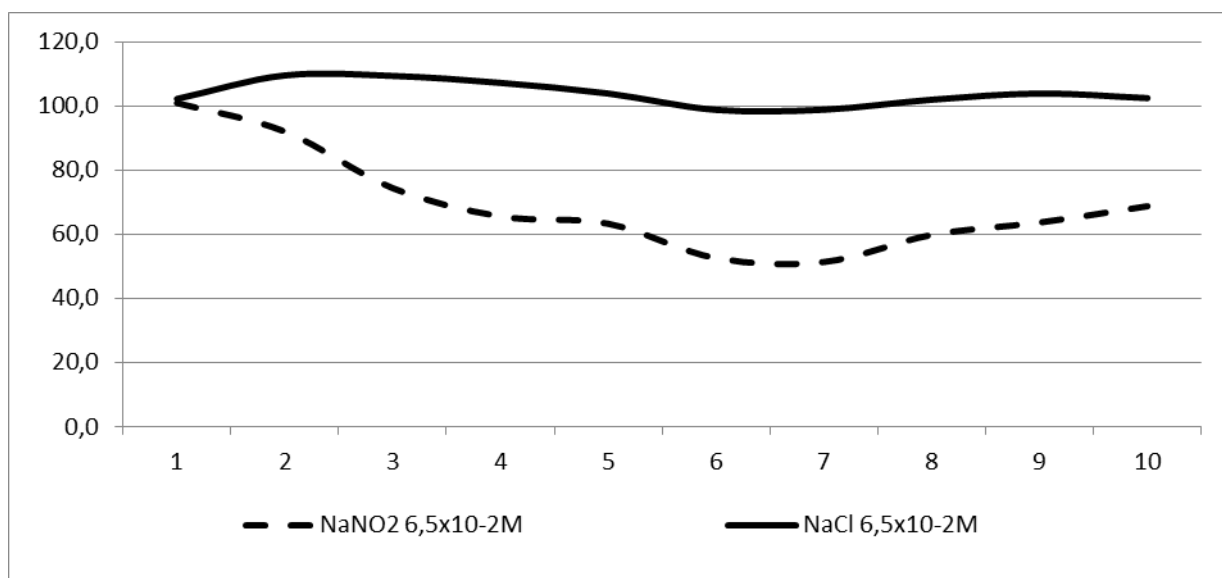


Рисунок 5 – Динамика ЧСС изолированного сердца крысы под действием нитрита натрия и хлорида натрия в концентрации $6,5 \times 10^{-2}$ М

Заключение

Таким образом, нитрит натрия оказывает сильное вазодилатирующее действие на коронарные сосуды изолированного сердца крысы в широком диапазоне концентраций $1 \times 10^{-4} - 6,5 \times 10^{-2}$ М и носит дозозависимый характер.

При интоксикации высокими дозами нитрита натрия в дополнение к антидотной терапии метиленовым синим целесообразно применение средств, способствующих выведению избытка натрия из организма.

Отрицательный хронотропный эффект нитрита натрия показан только в концентрации $6,5 \times 10^{-2}$ М кратной летальной дозе уровня ЛД₅₀ для целого организма и не связан с активацией растворимой гуанилатциклазы и гипернатриемией.

Литература

1. Петенкова А.А., Коваленко Р.И., Рубец Е.Д., Машкина Е.А., Ноздрачев А.Д. Гипоксическое preconditioning и функционирование изолированного сердца // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием (Воронеж, 18–22 сентября): Издательство Истоки (Москва), 2017. С. 2335–2337.
2. Doganci S., Yildirim V., Bolcal C., Korkusuz P., Gumusel B., Demirkilic U., Aydin A. Sodium nitrite and cardioprotective effect in pig regional myocardial ischemia-reperfusion injury model // Adv. Clin. Exp. Med. 2012. Vol. 21. № 6. P. 713–726.
3. Omar S. A., Webb A. J. Nitrite reduction and cardiovascular protect // Mol. Cell Cardiol. 2014. Vol. 76. P. 57–69.
4. Hielt K., Lund J.T., Scherling B. Methaemoglobinaemia among neonates in a neonatal intensive care unit // Acta Paediatr. 1995. № 4. P. 365–370.
5. Шумилова Т.Е., Шерешков В.И. Циркуляторные эффекты нитрита натрия у лабораторных крыс // Альманах современной науки и образования. 2009. № 5(24). С. 188–189.
6. Шумилова Т.Е., Шерешков В.И., Январева И.Н. Изменение электрокардиографических показателей крыс под влиянием нитрита натрия // Альманах современной науки и образования. 2008. № 11(18). С. 140–144.
7. Сидоряк Н.Г., Стешенко А.В. Особенности кислородтранспортной функции крови и кислотно-основного состояния у крыс при хроническом введении нитрита натрия // Загальна патологія та патологічна фізіологія. 2011. Т.6, №33. С.30–35.
8. Hofmann F., Feil R., Kleppisch T., Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion // Physiol. Rev. 2006. Vol.86. P. 1–23.

9. Tsai E.J., Kass D.A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics // *Pharmacol. Ther.* 2009. Vol.122. P. 216–238.

References

1. Petenkova A.A., Kovalenko R.I., Rubets E.D., Mashkina E.A., Nozdrachev A.D. Hypoxic preconditioning and functioning of an isolated heart // *Proceedings of the XXIII Congress of the physiological society. I.P. Pavlova with international participation (Voronezh, 18–22 sentyabrya): Izdatel'stvo Istoki (Moskva), 2017. P. 2335–2337 [In Russian].*

2. Doganci S., Yildirim V., Bolcal C., Korkusuz P., Gumusel B., Demirkilic U., Aydin A. Sodium nitrite and cardioprotective effect in pig regional myocardial ischemia-reperfusion injury model // *Adv. Clin. Exp. Med.* 2012. Vol. 21. № 6. P. 713–726.

3. Omar S. A., Webb A. J. Nitrite reduction and cardiovascular protect // *Mol. Cell Cardiol.* 2014. Vol. 76. P. 57–69.

4. Hielt K., Lund J.T., Scherling B. Methaemoglobinaemia among neonates in a neonatal intensive care unit // *Acta Paediatr.* 1995. № 4. P. 365–370.

5. Shumilova T.E., Shereshkov V.I. Circulatory effects of sodium nitrite in laboratory rats // *Almanac of modern science and education.* 2009. № 5(24). P. 188–189 [In Russian].

6. Shumilova T.E., Shereshkov V.I., Yanvareva I.N. Changing the electrocardiographic parameters of rats under the influence of sodium nitrite // *Almanac of modern science and education.* 2008. № 11(18). P. 140–144 [In Russian].

7. Sidoryak N.G., Steshenko A.V. Features of blood oxygen transport function and acid-base state in rats with chronic administration of sodium nitrite // *Zagal'na patologiya ta patologichna fiziologiya.* 2011. Vol. 6, № 33. P. 30–35 [In Russian].

8. Hofmann F., Feil R., Kleppisch T., Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion // *Physiol. Rev.* 2006. Vol.86. P. 1–23.

9. Tsai E.J., Kass D.A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics // *Pharmacol. Ther.* 2009. V.122. P. 216–238.