

УДК: 546.17: 616.831-005.4]-092.9.

## АНТИГИПОКСИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ КРЫС С ИШЕМИЕЙ-РЕПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ МОДУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ L-АРГИНИН-NO

*Н. Е. Максимович, канд. мед. наук, доцент*

Кафедра патофизиологии ГГМУ

*В экспериментах исследовали устойчивость крыс с ишемией-реперфузией головного мозга к гипоксии и концентрацию стабильных продуктов оксида азота [NO<sub>x</sub>] в плазме крови в условиях модуляции L-аргинин-NO системы. Установлено, что на фоне снижения [NO<sub>x</sub>] в плазме крови L-аргинин и селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы - 7-нитро-индазол увеличивают антигипоксическую резистентность крыс как в ранний, так и в поздний периоды ишемии-реперфузии головного мозга, в то время как селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиоуреа снижает ее только в поздний период ишемии-реперфузии головного мозга. Неселективный ингибитор NO-синтазы - метиловый эфир Nω-нитро-L-аргинина снижает антигипоксическую резистентность крыс в ранний период на фоне уменьшения снижения [NO<sub>x</sub>], а в поздний период реперфузии - без изменения [NO<sub>x</sub>] в плазме крови.*

**Ключевые слова:** *головной мозг, ишемия-реперфузия, гипоксия, оксид азота, L-аргинин, 7-нитро-индазол, S-метилизотиоуреа, метиловый эфир Nω-нитро-L-аргинина.*

*Correlation between tolerance of rats with brain ischemia-reperfusion to hypoxia and nitric oxide concentration [NO<sub>x</sub>] in rat plasma was studied experiment ally. L-arginine and selective inhibitor of nNOS- 7-nitro-Indazole decreased [NO<sub>x</sub>] in rat plasma and increased resistance to hypoxia in both early and late periods of brain ischemia-reperfusion, while selective inhibitor of iNOS - S-Methylisothiourea reduced [NO<sub>x</sub>] and tolerance to hypoxia only in the late period of brain ischemia-reperfusion. Nonselective inhibitor of NOS - Nω-nitro-L-Arginine methyl ether decreased [NO<sub>x</sub>] and resistance to hypoxia in the early period of brain ischemia-reperfusion, while in the late period only resistance to hypoxia decreased.*

**Key words:** *brain, ischemia-reperfusion, nitric oxide, hypoxia, L-Arginine, 7-nitro-Indazole, S-Methylisothiourea, Nω-nitro-L-Arginine methyl ether.*

**Введение.** По данным массовых эпидемиологических исследований ВОЗ, инсульт стоит на втором месте среди причин смертности. В Республике Беларусь смертность от инсульта в 3,5-4 раза превышает смертность от инфаркта миокарда [1, 4]. Несмотря на кажущийся на первый взгляд благополучный исход транзиторных ишемических атак, они в 25% случаев имеют тенденцию к повторению. С другой стороны, вызываемое проводимой терапией при инсульте быстрое восстановление кровотока, как правило, также приводит к реперфузионному повреждению головного мозга. Уже доказано, что реперфузионные повреждения тканей различных органов чаще бывают более выраженными, чем повреждения, вызванные собственно ишемией [5, 12].

Согласно существующим представлениям патогенез реперфузионных повреждений связан с окислительным стрессом [5], а при реоксигенации ишемизированной ткани для этого создаются наиболее благоприятные условия [12]. С другой стороны, оксид азота (NO), как вещество со свойствами свободного радикала, обладает в ткани мозга разнообразными биологическими эффектами [5]. До настоящего времени его роль в патогенезе реперфузионных повреждений головного мозга изу-

чена недостаточно. Имеются сообщения как о снижении суммарной активности всех NO-синтаз (NOS) в реперфузируемой ткани мозга, так и о повышении NO-синтазной активности мозговых структур, ответственных за выработку NO [5]. В некоторых работах предполагается участие в патогенезе реперфузионных повреждений головного мозга нейрональной NOS [9, 13] и индуцибельной NOS [8]. Однако сведения о роли nNOS и iNOS при реперфузионном синдроме до конца не детализированы. В литературе недостаточно информации и об эффектах эндотелиальной NOS (eNOS) в патогенезе повреждений головного мозга и адаптации организма к гипоксии в условиях реоксигенации. Незученным остается вопрос об изменениях резистентности к гипоксии крыс с реперфузионными повреждениями головного мозга в условиях модуляции L-аргинин-NO системы. Выявлены лишь единичные работы по исследованию значимости оксида азота в механизмах адаптации организма к гипоксии [12]. Незученным остается и вопрос о роли отдельных изоформ NO-синтаз и образуемого при их участии NO в развитии постшемического реперфузионного синдрома, обеспечении устойчивости крыс к гипоксической гипоксии и в формировании концентрации оксида азота

в системном кровотоке в различные периоды реперфузионных повреждений головного мозга. В связи с вышеизложенным целью работы явилось исследование роли нейрональной, макрофагальной и эндотелиальной NOS в формировании уровня оксида азота в плазме крови и антигипоксической резистентности у крыс в ранние и поздние периоды ишемии-реперфузии головного мозга (И/РГМ).

**Материалы и методы.** Исследования выполнены на 288 белых беспородных крысах-самцах массой 220 – 250 г (8 групп). У животных первых двух подгрупп (по 8 крыс в каждой) изучали резистентность крыс к гипоксии в ранний и в поздний реперфузионные периоды, а у животных следующих двух подгрупп (n=12) определяли  $[NO_x]$  в плазме крови в аналогичные периоды.

У крыс первой группы окклюзию общих сонных артерий не производили (ложнооперированные крысы – контроль 1) и внутривенно вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl. Исследования проводили через 30 минут и 24 часа после оперативного вмешательства.

У крыс 2-8-ой групп моделировали И/РГМ путем получасовой двухсторонней окклюзии общих сонных артерий с последующей 30-ти минутной (ранний период) или 24-х часовой (поздний период) реперфузией [10]. У крыс второй группы (контроль 2) осуществляли моделирование И/РГМ с внутривенным введением 0,5 мл изотонического раствора NaCl. Животные 3-8-х групп с И/РГМ непосредственно после окклюзии общих сонных артерий внутривенно получали модуляторы пути «L-аргинин – NO»: третья группа – субстрат NOS - L-аргинин (150 мг/кг), четвертая группа - неселективный ингибитор NOS - N $\omega$ -nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME, 5 мг/кг), пятая группа - селективный ингибитор nNOS - 7-нитро-индазол (7-nitro-Indazole, 7-NI, 10 мг/кг), шестая группа - селективный ингибитор iNOS – S-метил-изотиоуреа (S-Methyl-isothiourea, S-MT, 1 мг/кг), седьмая группа – 7-NI и S-MT, восьмая группа совместно с 7-NI и S-MT получала L-аргинин в аналогичных дозах. Моделирование И/РГМ проводили в условиях эфирного либо внутривенного тиопенталового наркоза (40-60 мг/кг).

В качестве интегрального показателя оценки степени повреждения головного мозга и антигипоксической резистентности организма использовали изучение продолжительности жизни животных (ПЖ) при гипобарической гипоксии в гипоксическом тесте (ГТ) [2]. ГТ проводили в барокамере ПБК-53 («подъем» крыс на «высоту» 11000 м осуществляли со скоростью 20 м/сек).

Об изменении гомеостаза оксида азота в организме судили по концентрации стабильных метаболитов NO – нитритов и нитратов  $[NO_x]$  в плазме периферической крови, определяемых общепринятым методом спектрофотометрии («Specord M-40», Германия) с использованием реактива Грисса [6]. Важно отметить, что существует высокая степень положительной корреляционной зависимости между активностью NOS в мозге и  $[NO_x]$  в плазме крови [6].

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** У крыс 2-ой группы с И/РГМ в ранний реперфузионный период  $[NO_x]$  в плазме крови увеличилась с  $7,4 \pm 0,36 \mu\text{M/g}$  (1 группа или контроль 1) до  $13,2 \pm 0,45 \mu\text{M/g}$  ( $p < 0,001$ ), а в поздний реперфузионный период с  $7,2 \pm 0,45 \mu\text{M/g}$  до  $15,0 \pm 0,73 \mu\text{M/g}$  ( $p < 0,001$ ) (табл.). При помещении крыс данной группы в барокамеру установлено, что ПЖ крыс в условиях стандартного ГТ по сравнению с животными 1-ой группы уменьшилась в ранний реперфузионный период с  $63 \pm 2,4$  мин. до  $35 \pm 1,5$  мин. ( $p < 0,001$ ), а в поздний реперфузионный период с  $62 \pm 2,2$  мин. до  $6 \pm 0,7$  мин. ( $p < 0,001$ ).

В дальнейшем сравнительный анализ будет проведен между изменениями  $[NO_x]$  в плазме крови и ПЖ крыс с И/РГМ в условиях ГТ в каждой из 3-8-ой групп с аналогичными показателями раннего и позднего периодов у крыс 2-ой группы. При введении L-аргинина крысам 3-ей группы  $[NO_x]$  в плазме крови в ранний реперфузионный период уменьшилась до  $9,6 \pm 0,45 \mu\text{M/g}$  ( $p < 0,001$ ), а в поздний период реперфузии - до  $10,7 \pm 0,63 \mu\text{M/g}$  ( $p < 0,001$ ), в то время как ПЖ крыс в барокамере увеличилась до  $45 \pm 1,7$  мин. ( $p < 0,05$ ) в ранний и до  $14 \pm 1,3$  мин. ( $p < 0,001$ ) - в поздний реперфузионные периоды.

**Таблица.** Степень гидратации мозга (ГМ) (%) и активность миелопероксидазы (МП) в ткани мозга у крыс с ишемией-реперфузией головного мозга (И/РГМ) при введении модуляторов пути «L-Аргинин – NO» при (M $\pm$ m, n=8)

Группы животных	ГМ (%)		МП (А/мгРГ/мин.)	
	ранний период	поздний период	ранний период	поздний период
Контроль	70,2 $\pm$ 0,20	70,1 $\pm$ 0,22	62 $\pm$ 1,9	67 $\pm$ 6,9
И/РГМ	71,9 $\pm$ 0,19**	72,6 $\pm$ 0,19**	143 $\pm$ 9,0**	207 $\pm$ 8,7**
И/РГМ+L-Аргинин	70,8 $\pm$ 0,31*	71,1 $\pm$ 0,37*	108 $\pm$ 8,6***	181 $\pm$ 7,7***
И/РГМ+L-NAME	71,3 $\pm$ 0,37**	73,0 $\pm$ 0,22**	174 $\pm$ 6,8***	245 $\pm$ 9,2***
И/РГМ+7-NI	70,6 $\pm$ 0,38*	71,8 $\pm$ 0,22**	108 $\pm$ 9,0**	206 $\pm$ 6,1**
И/РГМ+S-MT	71,3 $\pm$ 0,35	71,6 $\pm$ 0,27*	138 $\pm$ 2,4**	168 $\pm$ 6,7***
И/РГМ+7-NI+S-MT	70,6 $\pm$ 0,38*	70,8 $\pm$ 0,30*	110 $\pm$ 5,3***	146 $\pm$ 12,8***
И/РГМ+7-NI+S-T+L-Аргинин	70,1 $\pm$ 0,27**	70,4 $\pm$ 0,26**	91 $\pm$ 9,3**	134 $\pm$ 5,4***

Примечание: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,001$  - различия между показателями контрольной группы и других групп

# -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,001$  - различия между показателями группы И/РГМ и других групп

Таким образом, снижение  $[NO_x]$  в плазме крови крыс с И/РГМ при введении L-Аргинина сопровождалось увеличением антигипоксической резистентности крыс в оба реперфузионные периоды.

Введение неселективного ингибитора NOS - L-NAME животным 4-ой группы привело к снижению  $[NO_x]$  в плазме крови в ранний реперфузионный период до  $7,0 \pm 0,59 \mu M/g$  ( $p < 0,001$ ) и не влияло на  $[NO_x]$  в поздний реперфузионный период ( $15,6 \pm 0,86 \mu M/g$ ,  $p > 0,05$ ). Предполагается, что причиной отсутствия снижения  $[NO_x]$  при введении данного ингибитора в поздний период И/РГМ является обратимость ингибирующего эффекта L-NAME в отношении iNOS. ПЖ крыс в барокамере у крыс этой группы при проведении ГТ в ранний реперфузионный период уменьшилась до  $10 \pm 0,95$  мин. ( $p < 0,001$ ), а в поздний реперфузионный период - до  $1 \pm 0,5$  мин. ( $p < 0,001$ ). Из анализа результатов, полученных при введении L-NAME, следует, что вызываемая им блокада eNOS и nNOS неблагоприятно сказывается на антигипоксической резистентности крыс с И/РГМ, а снижение  $[NO_x]$ , в отличие от предыдущей группы, сопровождается не увеличением, а уменьшением резистентности крыс к гипоксической гипоксии.

Введение крысам с И/РГМ селективного ингибитора нейрональной NOS 7-NI (5-я группа) привело к снижению  $[NO_x]$  в ранний ( $9,3 \pm 0,43 \mu M/g$ ,  $p < 0,001$ ) и в поздний ( $13,2 \pm 0,62 \mu M/g$ ,  $p < 0,001$ ) реперфузионные периоды, а также увеличению ПЖ крыс в условиях гипоксической гипоксии (до  $46 \pm 1,6$  мин.,  $p < 0,001$ ) в ранний (до  $16 \pm 0,6$  мин.,  $p < 0,001$ ) и в поздний реперфузионные периоды. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли NO, образованного при участии nNOS, в повышении  $[NO_x]$  в плазме крови и уменьшении антигипоксической резистентности в оба периода И/РГМ. Сопоставление результатов, полученных при введении 7-NI, со значениями  $[NO_x]$  и ПЖ у крыс во 2-ой группе (L-аргинин) не выявило различий в ранний реперфузионный период, но в поздний реперфузионный период в группе с введением L-аргинина значения изучаемых показателей были достоверно выше.

Комплексный анализ результатов, полученных при введении L-NAME (4-я группа) и селективного ингибитора nNOS 7-NI (5-я группа), дают основания предполагать участие эндотелиальной NOS (eNOS) в повышении  $[NO_x]$  в плазме крови и увеличении резистентности крыс к гипоксии в ранний период И/РГМ.

Введение крысам 6-ой группы селективного ингибитора iNOS – S-MT только в поздний реперфузионный период привело к снижению  $[NO_x]$  в плазме крови (до  $9,0 \pm 0,48 \mu M/g$ ,  $p < 0,001$ ) и существенно повысило их ПЖ ( $22 \pm 1,0$  мин.,  $p < 0,001$ ).

Однако в ранний реперфузионный период  $[NO_x]$  оставалась стабильной ( $12,6 \pm 0,78 \mu M/g$ ,  $p > 0,05$ ), изменений ПЖ крыс в барокамере также не происходило ( $36 \pm 1,2$  мин.,  $p > 0,05$ ). Полученные с введением S-MT результаты показали участие NO, образованного iNOS, и в уменьшении резистентности крыс к гипоксии, которое сочеталось с увеличением  $[NO_x]$  только в поздний реперфузионный период.

Сочетанное введение животным 7-ой группы селективных ингибиторов 7-NI и S-MT в ранний реперфузионный период привело к снижению  $[NO_x]$  в плазме крови до  $9,3 \pm 0,38 \mu M/g$  ( $p < 0,001$ ) и увеличило их ПЖ до  $46 \pm 1,2$  мин. ( $p < 0,001$ ). При этом  $[NO_x]$  не отличалась от  $[NO_x]$  в группе с введением 7-NI. В поздний реперфузионный период также выявлено снижение  $[NO_x]$  до  $7,4 \pm 0,53 \mu M/g$  ( $p < 0,001$ ) и увеличение ПЖ до  $30 \pm 1,1$  мин. ( $p < 0,05$ ). При этом изменения изучаемых показателей были значительнее, чем при изолированном введении S-MT ( $p < 0,05$ ). Это подтверждает участие в изменениях изучаемых показателей в поздний реперфузионный период NO, образованного при участии обеих NOS.

Совместное введение 7-NI, S-MT и L-аргинина животным 8-ой группы привело к снижению  $[NO_x]$  в плазме крови крыс как в ранний ( $8,5 \pm 0,37 \mu M/g$ ,  $p < 0,001$ ), так и в поздний ( $7,2 \pm 0,47 \mu M/g$ ,  $p < 0,001$ ) реперфузионные периоды. Уменьшение  $[NO_x]$  было более существенным, чем в группе с введением L-аргинина ( $p < 0,05$ ). ПЖ в барокамере при проведении ГТ у животных данной группы составила  $49 \pm 1,5$  мин. ( $p < 0,05$ ) в ранний реперфузионный период и  $35 \pm 1,0$  мин. ( $p < 0,001$ ) - в поздний период И/РГМ. В поздний период И/РГМ ПЖ была больше, чем в группе с введением L-аргинина ( $p < 0,001$ ) и в группе с введением 7-NI и S-MT ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, анализ результатов, полученных при введении различных модуляторов L-аргинин-NO системы, позволил определить значимость различных изоформ NO-синтаз в формировании  $[NO_x]$  в системном кровотоке и в обеспечении антигипоксической резистентности крыс с И/РГМ. На основании полученных в работе результатов можно сделать следующие выводы.

Снижение резистентности крыс с И/РГМ имеет NO-зависимый характер, причем в различные периоды состояние антигипоксической резистентности определяется активностью различных изоформ NOS.

Проведенные с использованием L-аргинина эксперименты показали наличие у него свойств, повышающих антигипоксическую резистентность крыс, которая сочеталась с уменьшением концентрации в плазме крови стабильных метаболитов оксида азота – нитритов и нитратов. Комплексный анализ результатов изолированного и сочетанного

введения L-аргинина с 7-NI и S-MT дает основание говорить о положительной зависимости антигипоксических эффектов L-аргинина у крыс с И/РГМ от активности eNOS.

Проведенные с использованием селективного ингибитора nNOS 7-NI и селективного ингибитора iNOS S-MT эксперименты свидетельствуют о неблагоприятном влиянии на резистентность крыс к гипоксической гипоксии повышения активности nNOS в оба реперфузионные периода и iNOS - в поздний период И/РГМ. Сочетанное введение 7-NI и S-MT указывают на участие в патогенезе снижения антигипоксической резистентности крыс в поздний период обеих изоформ NOS - нейрональной и индуцибельной.

Введение неселективного ингибитора NOS L-NAME, вызывающего необратимое ингибирование эндотелиальной и нейрональной NO-синтаз, уменьшает антигипоксическую резистентность крыс как в ранний, так и в поздний периоды И/РГМ. Предполагается, что снижение резистентности крыс к гипоксии может быть связано с его угнетающим действием в отношении эндотелиальной NOS.

Разработка коррекции резистентность организма при реперфузионных повреждениях головного мозга должна быть основана на выявленной неоднозначности эффектов различных изоформ NO-синтаз. Проведенные эксперименты показали, что наиболее выраженное антигипоксическое действие оказывает сочетанное введение селективных ингибиторов 7-NI, S-MT и L-аргинина.

Изучение изменений концентрации стабильных метаболитов NO и сопоставление этих изменений с характером антигипоксической резистентности крыс к гипоксической гипоксии продемонстрировали отсутствие зависимости изменения этих показателей, в связи с чем показатель  $[NO_x]$ , как отражающий суммарный вклад всех изоформ NOS, не может быть использован для прогнозирования состояния резистентности крыс к гипоксии.

#### Литература

- Гехт А. Б. Ишемический инсульт: вторичная профилактика и основные направления фармакотерапии в восстановительном периоде // Мед. новости. - 2004. - №1. - С. 25 - 30.
- Лукиянова Л. Д. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. - М.: 1990. - 18с.
- Максимович Н. Е. Понятие о нитроксидазной системе мозга. Роль нейрональных источников // Журнал ГрГМУ. - 2003. - №4. - С. 7-11.
- Нечипуренко Н. И. Роль оксида азота при ишемии головного мозга // Мед. новости. - 2004. - № 1 - С. 7-10.
- Официальный статистический сборник за 2002г. Здравоохранение в Республике Беларусь. - Мн.: ГУРНМБ, 2003. - 356 с.
- Forman L. J., Liu P., Nagele R. G. Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat // Neurochem. Res. - 1998. - Vol. 23 (2). - P. 141 - 148.
- Granger D. L., Taintor R. R., Boockvar K. S. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction // Methods in Enzymology. - 1996. - Vol. 268. - P. 142 - 151.
- Griffith O. W., Kilbourn R. G. Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids // Methods in Enzymology. - 1996. - Vol. 268. - P. 375 - 392.
- Heneka M. T., Feinstein D. L. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons // J. Neuroimmunol. - 2001. - V.1. - №. 114 (1-2). - P. 8 - 18.
- Huang Z., Huang P. L., Panahian N. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase // Science. - 1994. - Vol. 23. - P. 1883 - 1885.
- Hossman K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia // Cardiovascular Resarch. - 1998. - V. 39. - P. 106 - 120.
- Manukhina E. B., Mashina S. Yu., Smirin B. V. Role of nitric oxide in adaptation to hypoxia and adaptive defense // Physiol. Res. - 2000. - V.49 (1). - P.89 - 97.
- Nagashima T., Wu S., Ikeda K. The role of nitric oxide in reoxygenation injury of brain microvascular endothelial cells // Acta Neurochir. Suppl. - 2000. - V. 76. - P. 471-473.
- Reif D. W., McCarthy D. J., Cregan E. Discovery and development of neuronal nitric oxide synthase inhibitors // Free Radic. Biol. Med. - 2000. - V.15. - №28 (10). - 1470 -1477.

#### Resume

#### TOLERANCE TO HYPOXIA IN RATS WITH BRAIN ISCHEMIA-REPERFUSION AND MODULATION OF «L-ARGININE – NO» PATHWAY

N. E. Maksimovich

Assistant professor of the dep. of Pathophysiology, GrSMU

Correlation between tolerance of rats with brain ischemia-reperfusion to hypoxia and nitric oxide concentration  $[NO_x]$  in rat plasma was studied experimentally. We observed decreased tolerance to hypoxia as well as increased  $[NO_x]$  in rat plasma in both periods of subtotal brain ischemia-reperfusion, especially in the late period of ischemia-reperfusion. L-Arginine and selective inhibitor of nNOS - 7-nitro-Indazole decreased  $[NO_x]$  in rat plasma and increased tolerance to hypoxia in both periods of brain ischemia-reperfusion, while selective inhibitor of iNOS - S-Methyl-isothiourrea reduced  $[NO_x]$  and tolerance to hypoxia only in the late period of brain ischemia-reperfusion. Nonselective inhibitor of NOS - N $\omega$ -nitro-L-Arginine methyl ester decreased  $[NO_x]$  and tolerance to hypoxia in both periods of brain ischemia-reperfusion, while in the late period only tolerance to hypoxia decreased.