

Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в плазме крови крыс с ишемией-реперфузией головного мозга при введении L-аргинина и различных ингибиторов NO-синтазы

У 128 крыс с ишемией-реперфузией головного мозга (И/РГМ) изучали изменения содержания в плазме крови продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, основания Шиффа) и факторов антиоксидантной защиты (ретинола, α -токоферола, SH-групп) в условиях коррекции L-аргинин-NO системы. При введении L-аргинина, а также ингибиторов NO-синтазы: неселективного ингибитора метилового эфира N^ω-нитро-L-аргинина, селективного ингибитора нейрональной NO-синтазы - 7-нитро-индазола и селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины установлено, что изменения изучаемых показателей у крыс с И/РГМ имеют NO-зависимый характер. Установлено, что гиперактивация нейрональной NO-синтазы является причиной повышения концентрации продуктов перекисного окисления липидов и уменьшения концентрации факторов антиоксидантной защиты в плазме крови в оба периода И/РГМ. Индуцибельная NO-синтаза участвует в реализации окислительных процессов в мозге в большей степени в поздний реперфузионный период. Ключевые слова: головной мозг, ишемия-реперфузия, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, оксид азота.

N. E. Maksimovich, V.V. Zinchuk, D. A. Maslakov

Parameters of lipid peroxidation and factors of antioxidative protection in plasma of rats with brains ischemia-reperfusion and introduction l-arginine and different inhibitors of no-synthasa.

In 128 rats during the brain ischemia-reperfusion (BIR) the changes in lipid peroxidation products (conjugated dienes, malon dialdehyde, Schiff bases) and antioxidant defense factors (retinol, α -tocopherol, SH-groups) in plazma of rats blood were studied under the conditions of of modulated L-arginine-NO system. The analysis (administration of L-arginine, non-selective inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester, selective inhibitor of neuronal NO synthase 7-nitroindasole, or selective inhibitor of inducible NO synthase S-methyl-isothiourea) had shown that NO generated by different NO synthase isoenzymes had the different roles: hyperactivation of the neuronal NO synthase was associated with an oxidative stress during the both BIR periods, and the higher inducible NO-synthase activity had such association only during the later period.

Kew words: brain, ischemia-reperfusion, oxidative stress, nitric oxide.

Роль оксида азота (NO) из различных источников нитроксидагической системы мозга, а также различных изоформ NO-синтаз, участвующих в их образовании в модуляции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ) при ишемии-реперфузии головного мозга (И/РГМ), не достаточно изучена [1, 2]. Целью работы явилось исследование изменений показателей

переокисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ) в плазме крови крыс с ишемией-реперфузией головного мозга (И/РГМ) при введении L-аргинина и различных ингибиторов NO-синтаз (NOS).

Материалы и методы

Изучение показателей, характеризующих степень окислительных процессов при И/РГМ, осуществляли в плазме крови у 128 белых беспородных крыс-самцов массой 220-250 г. И/РГМ моделировали путем получасовой двухсторонней окклюзии общих сонных артерий с последующей 30 минутной (ранний период) или 24-х часовой (поздний период) реперфузией, после чего осуществляли забор крови, а полученную из нее плазму замораживали. Эксперименты выполнены в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг). Животные разделены на 8 групп (n=16), каждая из которых состояла из двух подгрупп (n=8): с изучением показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния в ранний и в поздний периоды реперфузии. Крысам первой группы (ложно оперированные крысы – контроль 1) внутривенно вводили изотонический раствор NaCl (0,5 мл). У крыс 2-8 групп моделировали И/РГМ. Сразу после окклюзии общих сонных артерий крысам второй группы вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl, а крысам остальных (3-8) групп - модуляторы L-аргинин-NO системы. Крысам третьей группы вводили субстрат для образования NO - L-аргинин (150 мг/кг), четвертой группы - неселективный ингибитор - метилового эфира N^ω-нитро-L-аргинина L-NAME (5 мг/кг), пятой группы - селективный ингибитор нейрональной NOS (nNOS) – 7-нитро-индазол (7-nitro-Indazole, 7-NI, 10 мг/кг), шестой группы - селективный ингибитор индуцибельной NOS (iNOS) – S-метилизотиомочевину (S-Methylisothiourea, S-MT, 1 мг/кг), седьмой группы - 7-NI и S-MT, восьмой группы – 7-NI, S-MT и L-аргинин в аналогичных дозах.

В плазме крови экспериментальных животных определяли концентрацию показателей ПОЛ: диеновые конъюгаты [ДК] - на спектрофотометре "СФ-46" (Россия) [3], малоновый диальдегид [МДА] - на спектрофотометре "Specord" (Германия) [8, 9], основания Шиффа [ОШ] - на спектрофлуориметре "F-4010" ("Hitachi", Япония) [9], а также антиоксидантной защиты (АОЗ): ретинол [Р], α -токоферол [α -Т] - на спектрофлуориметре "F-4010" ("Hitachi", Япония) [5]. Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их Обсуждение

При исследовании изменения продуктов ПОЛ показателей АОЗ в плазме крови крыс в ранний и поздний периоды И/РГМ при введении модуляторов L-аргинин-NO системы выявлено увеличение у крыс 2-й группы (И/РГМ, контроль 2) в ранний период И/РГМ [ДК], [МДА] и [ОШ] ($p < 0,001$) (табл. 1), а также снижение показателей АОЗ: [Р] ($p < 0,001$), [α -Т] ($p < 0,001$) (по сравнению с контролем 1) (табл.3). В поздний период И/РГМ выявлены более значительные изменения показателей ПОЛ (табл.2) и АОЗ. Из полученных результатов видно, что у крыс в оба периода И/РГМ происходит повышение активности окислительных процессов, причем в поздний реперфузионный период оно более значительно, чем в ранний ($p < 0,001$). В дальнейшем сравнительный анализ продуктов ПОЛ и показателей АОЗ будет осуществлен между показателями 2-й группы и аналогичными показателями в каждой из 3-8 групп, значениями показателей в ранний и поздний период, а также между показателями некоторых групп.

Введение L-аргинина привело период к достоверному уменьшению концентрации продуктов ПОЛ и увеличило концентрацию факторов АОЗ как в ранний так и в поздний периоды, что указывает на антиоксидантный эффект L-аргинина при его введении крысам с И/РГМ. Однако различия между изучаемыми показателями в данной группе в ранний и поздний период продолжали сохраняться ($p < 0,05$).

У крыс 4-й группы при введении L-NAME в ранний период И/РГМ наблюдали увеличение [ДК] ($p < 0,05$) и снижение [?-Т] ($p < 0,001$), из чего следует, что введение крысам с И/РГМ L-NAME усугубило окислительные процессы как в ранний, так и в поздний периоды И/РГМ. Необходимо отметить, что в поздний период И/РГМ изменения концентрации продуктов ПОЛ и факторов АОЗ более значительны, чем в ранний период ($p < 0,001$).

С целью выяснения роли нейрональной NOS в изменениях прооксидантно-антиоксидантного состояния проведены исследования с введением ее селективного ингибитора 7-NI (5-я группа). Введение 7-NI в ранний период привело к уменьшению [ДК] ($p < 0,05$) и [МДА] ($p < 0,001$) и увеличению [Р] ($p < 0,05$), а в поздний период - к уменьшению [ДК] ($p < 0,05$), [МДА] ($p < 0,001$) и [ОШ] ($p < 0,05$), а также увеличению [Р] ($p < 0,05$) и [?-Т] ($p < 0,001$). Характер изменения показателей ПОЛ и АОЗ в данной группе свидетельствует об участии NO, образуемого нейрональной NOS, в модуляции прооксидантно-антиоксидантного состояния как в ранний, так и в поздний периоды И/РГМ. Важно отметить, что по выраженности антиоксидантный эффект 7-NI не уступал эффекту L-аргинина.

С целью выяснения роли индуцибельной NOS в окислительных процессах при И/РГМ проведены эксперименты с введением ее ингибитора S-MT (6-я группа). В ранний период И/РГМ введение S-MT не привело к изменениям уровня продуктов ПОЛ и факторов АОЗ в плазме крови. В поздний период И/РГМ произошло уменьшение [ДК] ($p < 0,05$), [МДА] и [ОШ] ($p < 0,001$), а также увеличение концентрации [?-Т] ($p < 0,001$). Полученные при введении S-MT результаты указывают на участие iNOS в активации окислительных процессов в поздний период И/РГМ.

Совместное введение крысам 7-й группы селективных ингибиторов 7-NI и S-MT подтвердило результаты, полученные в 5-й и 6-й группах, когда селективные ингибиторы вводили изолированно. В ранний реперфузионный период значения изучаемых показателей в группе с совместным введением обоих селективных ингибиторов NOS не отличались от значений в данных группах. В поздний период наблюдали более значительное, чем в 6-й группе снижение [ДК] ($p < 0,05$), [МДА] и [ОШ] ($p < 0,001$), а также увеличение [Р] и ?-токоферола ($p < 0,001$). Полученные результаты подтверждают роль в окислительных процессах в поздний период И/РГМ гиперактивности нейрональной и индуцибельной NO-синтаз.

Совместное введение 7-NI, S-MT и L-Аргинина у крыс 8-й группы с И/РГМ вызвало наиболее выраженное снижение концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови крыс в ранний и в поздний периоды И/РГМ ($p < 0,001$). Сочетанное введение 7-NI, S-MT и L-аргинина вызвало достоверно более выраженное уменьшение активности окислительных процессов, чем и в других группах.

Важно отметить, что в этой подгруппе в ранний период изучаемые показатели не отличались от их значений в группе ложнооперированных крыс.

Из анализа полученных результатов следует, что у крыс при субтотальной И/РГМ происходит возрастание активности окислительных процессов в оба её периода, причем в поздний период степень окислительного стресса более значительна. Введение L-аргинина оказывает антиоксидантное действие в оба периода И/РГМ. Антиоксидантный эффект L-аргинина может быть связан с антиоксидантными эффектами NO.

На основании проведенных с введением селективного ингибитора nNOS 7-NI экспериментов выявлено уменьшение степени окислительного стресса в ткани мозга крыс в оба периода И/РГМ. Результаты свидетельствуют об участии NO, образуемого нейрональной NOS, в прооксидантных механизмах при реперфузионных повреждениях головного мозга. Введение неселективного ингибитора NOS - L-NAME, вопреки предположениям, усилило степень окислительного стресса в оба периода И/РГМ. Данный эффект при введении L-NAME, может быть обусловлен тем, что, в отличие от 7-NI, L-NAME необратимо ингибирует обе изоформы конституциональных NO-синтаз и вызывает обратимую ингибицию индуцибельной NOS.

Выявленный в поздний период И/РГМ антиоксидантный эффект S-MT дает основание считать, что NO, образуемый при участии индуцибельной изоформы NOS, опосредует механизмы окислительного стресса в поздний период И/РГМ. Высокие концентрации NO могут вызывать необратимые изменения ферментов дыхательной цепи, подавлять энергообразование, ингибировать синтез ДНК [6] и вести к дегенеративным изменениям нервной ткани. Прооксидантное действие NO во многом связано с образованием пероксинитрита. По последним данным источниками индуцибельной изоформы NO-синтазы в ткани мозга являются не только макрофаги лейкоцитарного и глиального происхождения, а и эндотелиальные клетки, тромбоциты нейроны. Важно отметить, что в отличие от конституциональных изоформ NOS, активность которых при ИГМ повышается немедленно, индуцибельная NO-синтаза активируется через 6-12 часов с достижением максимальной активности к 24-96 часам.

NO также может лимитировать окислительные повреждения путем модулирования клеточных и физиологических процессов: усилением перфузии ткани мозга путем NO-зависимой дилатации сосудов, уменьшению адгезии лейкоцитов. Возможно участие NO в формировании кислородсвязующих свойств крови и через этот механизм поддержание прооксидантно-антиоксидантного баланса [2, 10], очевидно, и как следствие снижения вклада факторов в антиоксидантный потенциал организма, в частности, изменения сродства гемоглобина к кислороду [10].

Таким образом комплексный анализ изолированного и сочетанного введения селективных и неселективных ингибиторов, а также L-аргинина дает основание считать, что повышенная активность нейрональной изоформы NOS обуславливает активацию окислительных процессов в мозговой ткани в оба периода И/РГМ, гиперактивность индуцибельной изоформы NOS - только в поздний период И/РГМ. Полученные результаты дают основание предположить о наличии у образуемого при участии эндотелиальной изоформы NO-синтазы антиоксидантных эффектов.

Таблица 1

Активность перекисного окисления липидов в плазме крови крыс в ранний период ишемии-реперфузии головного мозга (И/РГМ) при введении модуляторов пути “L-аргинин–NO” ($M \pm m$, $n=8$)

№ п/п	Группы животных	ДК (нМ/л)	МДА (μМ/л)	ОШ (x10 ³ ЕД/л)
1	Контроль 1	7,1±0,29	2,8±0,25	9,0±0,17
2	И/РГМ (контроль 2)	14,4 ±0,32**	5,4±0,09**	11,4±0,20**
3	И/РГМ+L-аргинин	11,4±0,46**##	3,8±0,09**#	10,0±0,12*##
4	И/РГМ+L-NAME	16,5 ±0,33**#	6,1±0,22**#	12,5±0,43**
5	И/РГМ+7-NI	12,0±0,46**#	4,5±0,09**##	10,5±0,52*
6	И/РГМ+S-MT	13,6±0,26**	5,1±0,20*	12,0±0,36**
7	И/РГМ+7-NI+S-MT	11,6±0,18**##	3,2±0,12*##	9,9±0,26*##
8	И/РГМ+7-NI+S-MT + L-аргинин	11,0±0,27**##	3,1±0,08##	9,2±0,25##

Примечание:

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ - различия между значениями ПЖ аналогичных подгрупп первой и второй серий.

- $p < 0,05$, ## - $p < 0,001$ - различия между показателями группы контроль 2 и других групп.

1. Гехт А.Б. Ишемический инсульт: вторичная профилактика и основные направления фармакотерапии в восстановительном периоде // Медицинские новости.-2004.-№1.-С.25 - 30.
2. Зинчук В. В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиологических наук. - 2003. - Т. 34, №2. - С. 33-45.
3. Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов // Вопросы мед. химии.-1984.-№ 4.-С.125-127.
4. Нечипуренко Н. И. Роль оксида азота при ишемии головного мозга // Медицинские новости. - 2004. - № 1. - С. 7-10.
5. Черняускене Р. Ч., Варшкявичене З. З., Грибаускас П. С. Одновременное флюориметрическое определение концентраций витаминов Е и А в сыворотке крови // Лабораторное дело. - 1984. – Т. 6. - С. 362 - 365.
6. Dawson T. M., Dawson V. L. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide // Ann. Neurol. - 1992. - V. 32(3). - P. 297-311.
7. Hossman K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia // Cardiovascular Resarch. - 1998. - V. 39.- P. 106-120.
8. Mihara M., Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // Anal. Biochem. - 1978. - V. 86. - 1. - P. 271-278.
9. Rice-Evans C. A., Diplock A. T., Symons M. C. R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research.- Elsevier.- 1991.- Elsevier Amsterdam-London-New York- Tokyo.- 291p.

10. Zinchuk V.V., Dorokhina L.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway // Nitric Oxide. 2002.- 6(1). – P.29-34.

Репозиторий ГРГМУ