

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

УДК 546.17:616.831-005.4]-092.9

**МАКСИМОВИЧ Наталия Евгеньевна**

**РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА  
В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКИХ И РЕПЕРФУЗИОННЫХ  
ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ОБОСНОВАНИЕ ПУТЕЙ  
ИХ КОРРЕКЦИИ  
(экспериментальное исследование)**

14.00.16 – патологическая физиология

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Минск, 2005

Работа выполнена в УО «Гродненский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Республики Беларусь

**НАУЧНЫЙ  
КОНСУЛЬТАНТ:**

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Беларусь  
**Маслаков Д. А.** (УО «Гродненский государственный медицинский университет», профессор кафедры патологической физиологии)

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор, чл.-корреспондент НАН Беларуси  
**Висмонт Ф. И.** (УО «Белорусский государственный медицинский университет», заведующий кафедрой патологической физиологии)

доктор медицинских наук, профессор,  
**Нечипуренко Н. И.** (ГУ «Научно-исследовательский институт неврологии, нейрохирургии и физиотерапии», заведующая лабораторией клинической и экспериментальной патологической физиологии)

доктор биологических наук  
**Чумак А. Г.** («Белорусский государственный университет», заведующий кафедрой физиологии человека и животных)

**Оппонирующая  
организация:**

**ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Защита состоится «17» июня 2005 г. в 12<sup>00</sup> часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.36.01 при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, тел. 284-18-47, факс 284-16-30), e-mail: [biblio@fizio.bas-net.by](mailto:biblio@fizio.bas-net.by)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»

Автореферат разослан «    » мая 2005 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций  
кандидат биологических наук

В. М. Рубахова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Цереброваскулярные заболевания продолжают оставаться одной из лидирующих причин инвалидности и смертности населения как во всем мире, так и в Республике Беларусь (Devuyst G., 2002; Гусев Е. И., 2003, Гехт А. Б., 2004). Летальность от нарушений мозгового кровообращения составляет 11 %, а около 85 % больных, перенесших инсульт, остаются инвалидами. В настоящее время отмечается рост этой патологии. Более двух третей всех нарушений мозгового кровообращения приходится на расстройства ишемического характера, а у 25,5 % пациентов инсульт развивается повторно.

Недостаточная эффективность терапевтических воздействий и длительная реабилитация указанной категории больных свидетельствуют о несовершенстве представлений о патогенезе данной патологии. В связи с этим одной из важнейших проблем экспериментальной и клинической медицины является выяснение и детализация механизмов ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга.

По мнению многих исследователей разработка новых способов терапии цереброваскулярных заболеваний в значительной степени должна базироваться на использовании современных знаний о роли оксида азота в процессах функционирования головного мозга как в норме, так и при патологических процессах (Григлевский Р., 2000, Гурин А. В., 2004; Нечипуренко Н. И., 2004).

К настоящему времени сформулировано представление о нитрэргической системе мозга, как структурно-функциональном комплексе (нейроциты, эндотелиоциты, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты и тромбоциты), в клетках которого оксид азота образуется нейрональной, эндотелиальной и индуцируемой изоформами NO-синтазы (Fung M. L., 2001).

Широко изучаются процессы образования оксида азота в механизмах повреждения головного мозга при его ишемии как постоянного, так и преходящего характера (ишемии-реперфузии) (Dobrucki L.W. et al., 2002; Чумак А. Г., 2003; Нечипуренко Н. И., 2001, 2004). Однако, несмотря на наличие большого количества работ, сведения об изменениях образования оксида азота и его роли при отмеченной патологии носят разрозненный и противоречивый характер (Jiang K., et al., 1996, Fung P.C., 2001). Существуют данные, свидетельствующие, что при ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга имеет место как повышение (Fung P. C., 2001), так и снижение образования оксида азота (Jiang K., 1996). Наряду с прооксидантными свойствами оксида азота (Radi R., 1991) обнаружено наличие у него антиоксидантных свойств (Wink D. A. et al., 1995; Calabrese V., 2000). Выявлена способность оксида азота стимулировать воспалительные реакции (Gidday J. M., 1998) и оказывать противовоспалительное действие (Batteur S., 2000; Campanella M. et al., 2002).

Анализ литературы показал, что возможной причиной существующих противоречий может быть отсутствие комплексных исследований по выяснению роли оксида азота, продуцирующегося нейрональной, эндотелиальной и

индуцируемой изоформами NO-синтазы, на различных этапах ишемических и реперфузионных повреждений. До настоящего времени не исследована роль оксида азота, образующегося различными изоформами NO-синтазы, в реализации окислительного стресса, воспаления, в формировании нарушений вазоактивных свойств эндотелия кровеносных сосудов и агрегационных свойств тромбоцитов, а также устойчивости организма к гипоксии в различные периоды повреждений головного мозга при его ишемии и ишемии-реперфузии. Изучение вклада оксида азота, образующегося нейрональными и экстранейрональными источниками оксида азота при участии каждой из трех известных изоформ NO-синтазы в реализации вышеназванных процессов при ишемических и реперфузионных повреждениях головного мозга, на наш взгляд, является крайне важным. Как известно, окислительные процессы участвуют в генезе вторичных повреждений головного мозга при его ишемии (Калуев А. В., 1996; Love S., 1999), и, в особенности, при ишемии-реперфузии (Kim G. W., 2002; Solenski N. J., 2002). Предполагается, что оксид азота, как молекула со свойствами радикала, может оказывать влияние на их активность.

Не менее важную роль оксид азота играет в механизмах воспалительных реакций. Это определяется способностью оксида азота модулировать адгезивные свойства лейкоцитов и изменять проницаемость сосудистой стенки [BattEUR S., 2002]. Известно, что развитие отека головного мозга у больных с ишемическим инсультом очень часто является непосредственной причиной летального исхода. В связи с этим важно выяснение роли оксида азота в развитии воспалительного отека и других воспалительных реакций при нарушениях мозгового кровообращения ишемического и реперфузионного характера.

Для реализации компенсаторных реакций при повреждениях головного мозга, вызванных ишемическими и реперфузионными процессами, важное значение имеет состояние механизмов ауторегуляции мозгового кровотока и агрегационных свойств тромбоцитов. Как известно, при участии оксида азота осуществляются механизмы эндотелийзависимой регуляции тонуса кровеносных сосудов (Furchgott R., 1980) и агрегации тромбоцитов (Mehta J. L., 1995; Radomski M. W., 1996;). Нарушение зависимой от эндотелия и оксида азота регуляции тонуса кровеносных сосудов, а также повышение степени агрегации тромбоцитов может усугубить повреждение головного мозга при возникновении нарушений мозгового кровообращения ишемического либо реперфузионного характера.

Предполагается, что оксид азота, образующийся каждой из трех известных изоформ NO-синтазы, играет неоднозначную роль в реализации вышечисленных механизмов ишемических и реперфузионных процессов в головном мозге. Решение этих вопросов, на наш взгляд, является актуальным и может быть реализованным на основании изучения основных процессов повреждения головного мозга в условиях действия модуляторов активности нитрэргической системы в организме с ишемией либо ишемией-реперфузией головного

мозга.

Имеющиеся сведения об эффектах селективных и неселективных ингибиторов NO-синтазы, а также ее стимуляторов не позволяют патогенетически обоснованно и аргументированно подойти к разработке лекарственных препаратов и терапевтических мероприятий с их использованием при ишемических и реперфузионных процессах в головном мозге.

Таким образом, выяснение роли оксида азота, образующегося каждой из известных вышеназванных изоформ NO-синтазы, в повреждении головного мозга при его ишемии и ишемии-реперфузии, является актуальным и своевременным и может послужить основой для обоснования и разработки новых способов патогенетической коррекции ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга в клинической практике.

**Связь работы с крупными научными программами, темами.** Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательской работы, проводимой на кафедре патологической физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» научно-исследовательской работы и является составной частью тем: «Экспериментальная разработка путей профилактики и терапии постишемического реперфузионного синдрома» (2001-2003 гг., № госрегистрации 20012239), «Разработка новых путей патогенетической терапии реперфузионных повреждений и коррекции защитных реакций при алкоголизме» (2003-2005 гг., № госрегистрации 20033230).

**Цель и задачи исследования.** Целью исследования явилось выяснение роли оксида азота, образующегося нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы, в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и обоснование коррекции данной патологии путем избирательного влияния на активность изоформ NO-синтазы.

Для достижения поставленной цели определены следующие **задачи**:

1. Изучить устойчивость организма к гипоксии, агрегационные свойства тромбоцитов, а также направленность и выраженность изменения показателей, характеризующих процессы образования оксида азота, перекисного окисления липидов, воспаления, десквамации эндотелия кровеносных сосудов, а также состояние эндотелийзависимой вазодилатации в различные периоды ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга.
2. Выяснить значимость образования оксида азота нейрональной изоформой NO-синтазы в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга крыс на основании результатов, полученных в опытах с введением селективного ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы - 7-нитро-индазола.
3. Исследовать роль оксида азота, образующегося индуцируемой изоформой NO-синтазы, в механизмах развития ишемических и реперфузионных по-

вреждений головного мозга, исходя из изменений изучаемых показателей в условиях действия в организме животных селективного ингибитора этой изоформы NO-синтазы - S-метилизотиомочевина.

4. Изучить особенности влияния и провести сравнительный анализ эффектов селективных ингибиторов нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы на состояние исследуемых процессов у крыс с ишемическими и реперфузионными повреждениями головного мозга.
5. Изучить значимость процессов образования оксида азота, продуцируемого эндотелиальной изоформой NO-синтазы, в развитии ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга путем анализа эффектов:
  - неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинина;
  - L-аргинина
  - L-аргинина с селективными ингибиторами нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы.
6. Обосновать новые направления патогенетической коррекции ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга путем использования модуляторов активности нитрэргической системы мозга.

**Объект и предмет исследования.** Объект исследования – белые беспородные крысы (1152); изолированные из организма экспериментальных животных головной мозг, кольца аорты, тромбоциты, эндотелиоциты, а также плазма крови.

Предмет исследования – процессы образования оксида азота; перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты и воспаления в мозге; десквамация эндотелия и эндотелийзависимая дилатация кровеносных сосудов; агрегационные свойства тромбоцитов и устойчивость организма к гипоксии при ишемических и реперфузионных повреждениях головного мозга в условиях модуляции активности нитрэргической системы мозга.

**Гипотеза.** Исходя из известных сведений об особенностях функционирования различных изоформ NO-синтазы предполагается, что роль оксида азота, образующегося нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы, в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга не является однозначной. Поэтому избирательная модуляция активности различных изоформ NO-синтазы может рассматриваться в качестве перспективного подхода к ограничению выраженности повреждения головного мозга в зависимости от стадии ишемии и ишемии-реперфузии.

**Методология и методы проведения исследования.** Методологической основой планирования, выполнения работы и анализа полученных результатов, а также формулировки заключения работы явились следующие способы науч-

ного исследования: эксперимент, наблюдение, медико-биологическое моделирование, статистическая обработка полученных результатов.

В работе использованы общепринятые экспериментальные модели субтотального ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга, гипоксической гипоксии, способы изменения активности нитрэргической системы мозга, а также методы исследований: физиологические (гипоксический тест, фотоколориметрический метод определения степени агрегации тромбоцитов, изометрический метод изучения эндотелийзависимой вазодилатации кровеносных сосудов), биохимические (спектрофотометрическое определение нитритов и нитратов в плазме крови, продуктов перекисного окисления липидов и факторов антиоксидантной защиты в головном мозге и в плазме крови), морфологические (гистологическое исследование головного мозга, определение количества циркулирующих эндотелиальных клеток в плазме крови) и статистические (вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента и корреляционного анализа).

**Научная новизна и теоретическая значимость полученных результатов.** Впервые проведено комплексное исследование перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты, образования оксида азота, воспаления в мозге, морфофункционального состояния сосудистой стенки, агрегационных свойств тромбоцитов в условиях действия в организме крыс с ишемическими и реперфузионными процессами головного мозга модуляторов активности нитрэргической системы: субстрата NO-синтазы L-аргинина, селективного ингибитора ее нейрональной изоформы 7-нитро-индазола, селективного ингибитора индуцируемой изоформы NO-синтазы S-метилизотиомочевины и неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинина. Выполненные исследования выявили неоднозначную роль оксида азота, образующегося нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы, в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга на различных этапах изучаемой патологии.

Установлено, что развитие ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга в ранний период связано с оксидом азота, образующимся нейрональной изоформой NO-синтазы, а на поздних этапах – преимущественно с образованием оксида азота индуцируемой изоформой NO-синтазы. Выявлено, что оксид азота, образующийся эндотелиальной изоформой NO-синтазы, оказывает защитное действие, препятствующее ишемическому и реперфузионному повреждению головного мозга.

Показано, что патогенное действие оксида азота, образующегося нейрональной и индуцируемой изоформами NO-синтазы, реализуется через активацию в головном мозге перекисного окисления липидов, воспаления (кроме раннего периода ишемии), агрегационных свойств тромбоцитов, повреждение эн-

дотелия кровеносных сосудов и нарушение его вазоактивных свойств, а также снижение антиоксидантной защиты и устойчивости организма к гипоксии.

Компенсаторная роль оксида азота, образующегося эндотелиальной изоформой NO-синтазы, у крыс с ишемией и ишемией-реперфузией головного мозга реализуется через ингибирование процессов перекисного окисления липидов и воспаления в головном мозге крыс, повышение его антиоксидантной защиты, улучшение эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса и снижение десквамации эндотелия кровеносных сосудов, а также уменьшение агрегационных свойств тромбоцитов и повышение устойчивости организма к гипоксии.

Впервые показано, что субстрат NO-синтазы L-аргинин может быть использован в качестве эффективного средства для коррекции ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга при его одновременном введении с селективными ингибиторами нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы.

**Практическая значимость полученных результатов.** На основании проведенного комплексного исследования, включающего изучение состояния процесса образования оксида азота, окислительного и воспалительного процессов в мозге, десквамации эндотелия кровеносных сосудов, эндотелийзависимой вазодилатации, степени агрегации тромбоцитов, а также устойчивости организма к гипоксии установлена роль оксида азота, образующегося различными изоформами NO-синтазы, в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга, что позволило определить новые пути патогенетической коррекции данной патологии.

Выявлены неизвестные ранее особенности и закономерности изменения показателей, характеризующие механизмы повреждений головного мозга ишемического и реперфузионного характера, в условиях действия в организме ингибиторов NO-синтазы и L-аргинина и аргументирована их практическая значимость.

Результаты исследования, свидетельствующие о неоднозначной роли оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга имеют важное значение для понимания механизмов развития целого ряда состояний, сопровождающихся расстройствами церебральной гемодинамики и обоснования необходимости поиска и химического синтеза новых фармакологических препаратов со свойствами селективного угнетения нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы и поддержания адекватной активности эндотелиальной изоформы этого фермента. Как известно, Республиканское унитарное предприятие «Гродненский завод медицинских препаратов» уже приступил к производству аминокислоты L-аргинин, которая, может быть применена для лечения ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга, но для этого необходимы ее клинические испытания. Целесообразность



применения L-аргинина при цереброваскулярных заболеваниях, в том числе при нарушениях мозгового кровообращения ишемического характера подтверждена патентом на изобретение «Средство для коррекции ишемического инсульта».

Прикладное значение работы подтверждено внедрением результатов работы в НИР и учебный процесс в виде методических рекомендаций «Функциональные пробы, применяемые в диагностике дисфункции эндотелия», утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь (2001 г), а также рационализаторских предложений, касающихся диагностики, коррекции и профилактики ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга в условиях эксперимента.

Основные результаты исследований и выводы, сделанные на их основе, используются в учебном процессе на кафедре патологической физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», а также могут быть применены в научно-исследовательской работе и учебном процессе других ВУЗов медико-биологического профиля.

Полученные результаты имеют прикладное значение для практической медицины, так как обосновывают правомочность использования модуляторов активности нитрэргической системы мозга для коррекции нарушений мозгового кровообращения ишемического и реперфузионного характера. Предполагается, что внедрение результатов исследований в клиническую практику повысит эффективность лечения больных с ишемическими и реперфузионными повреждениями головного мозга, приведет к уменьшению смертности и инвалидности больных с данной патологией и позволит получить значительный экономический эффект за счет улучшения результатов лечения и снижения расходов по инвалидности. Внедрение результатов работы в клиническую практику также будет иметь и социальное значение вследствие повышения шансов на выздоровление и улучшение качества жизни больных с такой патологией в постинсультный период.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. В патогенезе повреждений головного мозга при его субтотальной ишемии и ишемии-реперфузии ведущая роль принадлежит оксиду азота, образующемуся в нитрэргической системе нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы. Оксид азота, образующийся нейрональной изоформой NO-синтазы, определяет повреждения головного мозга преимущественно в ранние периоды, что подтверждается их меньшей выраженностью в условиях действия селективного ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы (7-нитро-индазола).
2. Оксид азота, образующийся индуцируемой изоформой NO-синтазы, участвует в механизмах повреждения головного мозга только в поздние периоды его ишемии и ишемии-реперфузии. Повреждающий эффект оксида азота

этого происхождения ослабляется после введения в организм селективного ингибитора индуцируемой изоформы NO-синтазы (S-метилизотиомочевины).

3. Оксид азота, продуцируемый эндотелиальной изоформой NO-синтазы, оказывает защитное действие при ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга, а ее угнетение неселективным ингибитором NO-синтазы (метилловый эфир N<sub>ω</sub>-нитро-L-аргинина) усугубляет повреждения, вызванные ишемическим либо реперфузионным процессами.
4. Коррекция ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга должна быть основана на установленной неоднозначной роли оксида азота, образующегося каждой из изоформ NO-синтазы в их патогенезе, и включать препараты, ингибирующие активность нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы и поддерживающие активность эндотелиальной изоформы этого фермента.

**Личный вклад соискателя.** Определение цели исследования, постановка задач и разработка методических подходов проводились соискателем совместно с научным консультантом.

Автор принимала непосредственное участие в выполнении работы по всем разделам диссертации, включая организацию и проведение экспериментов, физиологических и биохимических исследований, самостоятельно осуществляла статистическую обработку полученных данных, обобщение и анализ результатов и написание всех разделов работы. Соавторы публикаций оказывали методическую и консультативную помощь в проведении морфологических и биохимических исследований.

**Апробация результатов диссертации.** Основные результаты исследований, включенные в диссертацию, обсуждены на конференции, посвященной 35-летию открытия ГГМИ (Гродно, 1993); III съезде иммунологов и аллергологов "Экологические проблемы иммунологии и аллергологии" (Гродно, 1995); симпозиуме «Кислород и свободные радикалы» (Гродно, 1996); 2-й международной конференции «Клиническая аллергология и иммунология, иммунодиагностика и иммунореабилитация» (Минск, 1998); конференции, посвященной 40-летию ГГМИ (Гродно, 1998); международной конференции "Монооксид азота в процессах жизнедеятельности» (Минск, 1998); научной конференции «История и современные проблемы лекарственного обеспечения населения» (Гродно, 2000); научно-практической конференции «Актуальные вопросы клинической медицины» (Гродно, 2000); I-й республиканской научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования» (Витебск, 2000); X съезде Белорусского общества физиологов (Минск, 2001); конференции с международным участием «Функциональная роль монооксида азота и пуринов» (Минск, 2001); 5-th Congress of the European

Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics «Pharmacology. Toxicology» (Odense, Denmark, 2001); 7-th World Congress for Microcirculation (Sydney, Australia, 2001); 6-й международной конференции «Биоантиоксиданты» (Москва, 2002); 2-й международной конференции «Дисфункция эндотелия» (Витебск, 2002); 10<sup>th</sup> Symposium of Jagiellonian Medical research Centre «Pharmacological correction of endothelial dysfunction» (Krakow, Poland 2002); 6<sup>th</sup> International Symposium on «Global Risk Of Coronary Heart Disease and Stroke: Assesment, Prevention, and Treatment» (Florence, Italy, 2002); международном симпозиуме «Ультразвук в биологии и медицине» (Гродно, 2003); III международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия» (Витебск, 2004); конференции с международным участием «Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине» (Минск, 2004); II Съезде Белорусской Ассоциации аллергологов и клинических иммунологов (Витебск, 2004).

**Опубликованность результатов.** По материалам диссертации опубликовано 47 печатных работ: из них 1 монография, 1 описание к патенту, 32 статьи, из них - в журналах – 20 (в странах СНГ – 5, единолично – 14), в сборниках – 13 (единолично – 6), 12 тезисов (в странах СНГ – 1, за рубежом - 4, единолично – 6), 1 методические рекомендации, утвержденные Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Общее количество страниц опубликованных материалов – 294 (единолично – 240).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, двух глав, содержащих результаты экспериментальных исследований, анализа и обобщения полученных результатов, заключения, списка использованных источников и приложения. Работа изложена на 230 страницах машинописи, иллюстрирована 39 таблицами, 24 рисунками. Список использованных источников литературы включает 440 наименований (120 - на русском и 320 - на иностранном языках).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Исследования выполнены на 1152 белых беспородных крысах-самцах массой 220-250 г в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также требованиями мирового сообщества "Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей" (Страсбург, 1986).

У всех животных (за исключением группы крыс с исследованием антигипоксической устойчивости) оперативные вмешательства, взятие органов и крови осуществляли в условиях внутривенного наркоза (тиопентал натрия, 60 мг/кг). Для проведения исследований по изучению устойчивости животных к гипоксии оперативные вмешательства осуществляли в условиях эфирного наркоза.

В работе использовали экспериментальные модели субтотальной ишемии головного мозга (серия I) и ишемии-реперфузии головного мозга (серия II) (Hossman K.A., 1998). Моделирование субтотальной ишемии головного мозга осуществляли у крыс перевязыванием обеих общих сонных артерий с помощью хлопчатобумажных нитей открытым хирургическим способом, после чего рану ушивали. Перед накладыванием лигатур производили отделение артерий от окружающей соединительной ткани и нерва. Исследования у крыс I-й серии осуществляли спустя 30 минут (ранний период) и 24 часа (поздний период) после окклюзии общих сонных артерий.

Моделирование ишемии-реперфузии головного мозга осуществляли путем временного (в течение 30 минут) наложения атравматических металлических клипс на правую и левую общие сонные артерии и 30-ти минутной (ранний период) или 24-х часовой (поздний период) реперфузией с последующим ушиванием раны. Визуально следили за отсутствием кровотока в период ишемии и его возобновлением по общим сонным артериям в период реперфузии.

С целью выяснения роли оксида азота, образующегося нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы, в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга крысам внутривенно вводили модуляторы нитрэргической системы головного мозга («Sigma», USA): субстрат NO-синтазы L-аргинин в дозе 150 мг/кг, неселективный ингибитор NO-синтазы N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинина метиловый эфир, в дозе 5 мг/кг, селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы 7-нитроиндазол в дозе 10 мг/кг, селективный ингибитор индуцируемой NO-синтазы S-метилизотиомочевину в дозе 1 мг/кг.

Каждая серия состояла из 8 групп, разделенных на 2 подгруппы: в первых подгруппах исследования проводили в ранние, а во вторых подгруппах - в поздние периоды ишемии либо ишемии-реперфузии головного мозга. Крысам первой группы обеих серий окклюзию общих сонных артерий не производили - ложнооперированные крысы (контроль 1) и внутривенно вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl. Крысам второй группы (контроль 2) обеих серий моделировали субтотальную ишемию либо ишемию-реперфузию головного мозга и внутривенно вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl.

Животным 3-8 групп первой и второй серий непосредственно после окклюзии общих сонных артерий внутривенно вводили модуляторы нитрэргической системы головного мозга (в 0,5 мл изотонического раствора NaCl): в третьей группе - L-аргинин, в четвертой - метиловый эфир N<sup>ω</sup>-нитро-L-

аргинина, в пятой – 7-нитро-индазол, в шестой - S-метилизотиомочевину, в седьмой - 7-нитро-индазол и S-метилизотиомочевину, в восьмой – одновременно L-аргинин, 7-нитро-индазол и S-метилизотиомочевину.

Для исследований использовали передний отдел головного мозга, грудной отдел аорты, циркулирующие эндотелиальные клетки, тромбоциты и плазму крови. Взятие крови осуществляли из общей сонной артерии, а взятие органов и тканей - после декапитации животных.

Образование оксида азота в организме оценивали по концентрации нитритов и нитратов в плазме крови  $[NO_x]$  общепринятым спектрофотометрическим методом («Specord», Германия) с использованием кадмия и реактива Грисса (Granger D. L. et. al., 1996).

Активность окислительных процессов в головном мозге оценивали по содержанию в гомогенатах головного мозга и в плазме крови продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, оснований Шиффа) и факторов антиоксидантной защиты (ретинола,  $\alpha$ -токоферола и SH-групп).

Концентрацию диеновых конъюгатов оценивали по интенсивности УФ-поглощения конъюгированными диеновыми структурами гидроперекисей липидов на спектрофотометре «СФ-46» (Россия) при длине волны 232-234 нм методом Костюка В. А. и др. (1984). Концентрацию малонового диальдегида определяли по концентрации его комплексов с тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре «Specord» (Германия) по методу Mihara M., Uchiyama M. (1978). Концентрацию оснований Шиффа определяли по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта исследуемого образца на спектрофлуориметре «F-4010» ("Hitachi", Япония) при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 нм и 440 нм, соответственно (Fletcher B. L., 1973).

Содержание ретинола в мозге и в плазме крови измеряли по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта исследуемого образца при длинах волн возбуждения и флуоресценции 335 нм и 460 нм, а содержание  $\alpha$ -токоферола - при длинах волн 292 нм и 325 нм на спектрофлуориметре "F-4010" ("Hitachi", Япония) (Черняускене Р. Ч., 1984). Содержание SH-групп определяли с использованием реактива Элмана на спектрофотометре «Specord» (Германия) по методу Sedlak J., Lindsay R. H. (1968).

Развитие воспалительного процесса в головном мозге крыс определяли по степени гидратации головного мозга гравиметрически (Pearse M. L., 1965), морфологически (Лилли Р., 1969) и по активности миелопероксидазы спектрофотометрически (Bradley P. P., 1982).

Состояние механизмов регуляции сосудистого тонуса оценивали по эндотелийзависимой вазодилатации общепринятым методом с использованием миографа типа «organ bath» на основании изучения изометрического напряжения колец аорты в ответ на ацетилхолин ( $A\alpha X$ ,  $10^{-5}$  М) (Chlopicki S., Gryglewski R. J., 2002). Выраженность десквамации эндотелия кровеносных сосудов оценива-

ли по количеству циркулирующих эндотелиальных клеток в 1 мл плазмы крови методом микроскопии (Власов Т. Д., 1998).

Определение степени агрегации тромбоцитов осуществляли на компьютерном анализаторе агрегации тромбоцитов (AP 21103АО "Солар", Беларусь) с помощью индуктора агрегации тромбоцитов АДФ («Sigma», USA) в концентрации 2,5 мкМ (Самаль А. Б. и др., 1990).

В качестве интегрального показателя оценки степени повреждения головного мозга использовали продолжительность жизни крыс в барокамере (ПБК-53) в условиях гипоксического теста ("подъем" на высоту 11000 м, скорость «подъема» 20 м/сек) (Лукьянова Л. Д., 1990).

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента и метода корреляционных матриц при помощи пакета программ «STATISTIKA» (6.0.) и «Microsoft Exel» 2002 (10.2701.2625).

## **ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС С ИШЕМИЧЕСКИМИ И РЕПЕРФУЗИОННЫМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ГОЛОВНОЙ МОЗГА**

Субтотальная ишемия и ишемия-реперфузия головного мозга у крыс в ранние и поздние периоды приводит, по сравнению с показателями в группе контроль 1, к повышению концентрации нитритов и нитратов в плазме крови, продуктов перекисного окисления липидов и снижению содержания факторов антиоксидантной защиты в головном мозге и плазме крови, развитию воспалительного процесса в мозге, усилению агрегационных свойств тромбоцитов, процессов десквамации эндотелия кровеносных сосудов, а также к снижению эндотелийзависимой вазодилатации и устойчивости организма к гипоксии.

У крыс с ишемией головного мозга (ИГМ) продолжительность жизни (ПЖ) животных в барокамере в условиях гипоксического теста в ранний период, по сравнению с животными группы контроль 1, достоверно уменьшилась в 2,1 раза, а у крыс с ишемией-реперфузией головного мозга (И/РГМ) – в 1,4 раза. В поздний ишемический период она сократилась в 30 раз, а в поздний реперфузионный период – в 10 раз (рис. 1).

Уменьшение устойчивости крыс к гипоксии в ранний период происходило на фоне увеличения в плазме крови нитритов и нитратов у животных с ИГМ на 28 % ( $p < 0,001$ ), а у крыс с И/РГМ - на 78 % ( $p < 0,001$ ) (рис. 2). В поздние периоды отмечено увеличение  $[NO_x]$  на 62 % ( $p < 0,001$ ) и на 108 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Наряду с повышением образования оксида азота (NO) и уменьшением устойчивости крыс к гипоксии отмечалось увеличение в головном мозге активности перекисного окисления липидов и уменьшение его антиоксидантной защиты.

Репозиторий ГРГМУ

Репозиторий ГРГМУ



В ранний ишемический период в головном мозге имело место увеличение концентрации диеновых конъюгатов (ДК) на 10 % ( $p < 0,001$ ), оснований Шиффа (ОШ) - на 24 % ( $p < 0,001$ ), а в аналогичный период И/РГМ отмечено увеличение [ДК] на 47 % ( $p < 0,001$ ), малонового диальдегида (МДА) - на 68 % ( $p < 0,001$ ), [ОШ] - на 16 % ( $p < 0,001$ ).

На поздних этапах ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга активность окислительных процессов была выше, чем на ранних. При ИГМ в головном мозге концентрация диеновых конъюгатов (ДК) увеличилась на 10 % ( $p < 0,001$ ), малонового диальдегида (МДА) - на 46 % ( $p < 0,05$ ), оснований Шиффа (ОШ) - на 24 % ( $p < 0,001$ ), а при И/РГМ произошло увеличение [ДК] на 40 % ( $p < 0,001$ ), [МДА] - на 97 % ( $p < 0,001$ ) и [ОШ] - на 81 % ( $p < 0,001$ ).

Снижение антиоксидантной защиты головного мозга крыс в ранний период ИГМ проявлялось уменьшением в головном мозге содержания факторов антиоксидантной защиты (АОЗ): ретинола (Р) - на 27 % ( $p < 0,001$ ),  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha$ -Т) - на 41 % ( $p < 0,001$ ) и SH-групп (SH-) - на 11 % ( $p < 0,001$ ), а в аналогичный период И/РГМ - уменьшением [Р] на 27 % ( $p < 0,001$ ), [ $\alpha$ -Т] на 20% ( $p < 0,001$ ) и [SH-] на 19 % ( $p < 0,001$ ). В поздний период ИГМ эти изменения были более существенными, а именно: [Р] уменьшилась на 32 % ( $p < 0,001$ ), [ $\alpha$ -Т] - на 45 % ( $p < 0,001$ ) и [SH-] - на 14 % ( $p < 0,001$ ), а в поздний период И/РГМ - на 32 % ( $p < 0,001$ ), 30 % ( $p < 0,001$ ) и 19 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Активация окислительных процессов при нарушениях мозгового кровообращения ишемического характера обусловлена снижением поступления в нейроны молекулярного кислорода и повышением уровня восстановленности компонентов дыхательной цепи, что приводит к восстановлению кислорода по одноэлектронному пути с образованием радикалов кислорода и оксидантов нерадикальной природы (Pearlstein D., 2002, Sims N. R., 2002).

Известно, что более высокой активности окислительных процессов в головном мозге в реперфузионный период способствует реоксигенация, а также изменения, происходящие в дореперфузионный период (снижение активности ферментных и неферментных антиокислительных систем, возрастание количества метаболитов-инициаторов, активация систем, продуцирующих активные формы кислорода) (Knight J.T., 1997, Bagenholm R., 1998). Наличие большого количества липидов и высокая степень кислородного насыщения делают головной мозг чувствительным к действию активных форм кислорода (Болдырев А. А., 2003).

Повышение активности перекисного окисления липидов выступает как один из факторов альтерации головного мозга, способствующих развитию воспаления. Действительно, в поздний период ИГМ происходило увеличение содержания воды в головном мозге на 1,4 % ( $p < 0,05$ ) и его миелопероксидазной активности - на 94 % ( $p < 0,001$ ).

При И/РГМ уже в раннем периоде установлено увеличение гидратации головного мозга (ГМ) на 1,98 % ( $p < 0,001$ ) и активности миелопероксидазы

(АМП) в мозге - на 131 % ( $p < 0,001$ ). В поздний реперфузионный период отмечено более значительное увеличение содержания воды в головном мозге (на 3,3 %,  $p < 0,001$ ), а его миелопероксидазная активность увеличилась на 209 % ( $p < 0,001$ ). Увеличение этих показателей свидетельствуют о развитии воспалительных реакций: экссудации и эмиграции лейкоцитов (за исключением раннего периода ИГМ). Мигрирующие в головной мозг лейкоциты наряду с нейrocитами и глией становятся источниками активных форм кислорода, усугубляя таким образом его повреждение (Wu S., 1997).

Гистологические исследования головного мозга подопытных животных показали наличие выраженных изменений его цитоархитектоники преимущественно в поздний период ишемии-реперфузии. При 24-х часовой субтотальной ИГМ отмечали признаки дистрофии пирамидных клеток коры головного мозга. При 30-ти минутной ишемии с последующей 24-х часовой реперфузией в гистологических препаратах наблюдали дистрофию и гибель ганглиозных клеток с гидратацией вещества головного мозга. Большая выраженность реакций окислительного стресса и воспаления в поздний период ишемических и реперфузионных повреждений согласуется с общей концепцией стадийности такой патологии (Гусев Е. И., 2002).

Повышение концентрации продуктов ПОЛ в головном мозге и в плазме крови подопытных животных является возможной причиной возникновения дисфункции и десквамации эндотелия кровеносных сосудов. При сравнительном анализе изменений морфофункциональных свойств эндотелия кровеносных сосудов выявлено более значительное угнетение эндотелийзависимой вазодилатации (ЭЗВД) в ответ на АцХ у крыс в ранний реперфузионный период (на 58 %,  $p < 0,001$ ), чем в ранний период ИГМ (на 14 %,  $p < 0,001$ ).

У крыс с И/РГМ также отмечена большая выраженность десквамации эндотелия кровеносных сосудов. Количество циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в плазме крови крыс в ранний реперфузионный период увеличилось на 78 % ( $p < 0,001$ ), в то время как в ранний период ИГМ – на 33 % ( $p < 0,001$ ). На поздних этапах ЭЗВД колец аорты уменьшилась при ИГМ на 23% ( $p < 0,001$ ), а при И/РГМ – на 72 % ( $p < 0,001$ ). Количество ЦЭК увеличилось на 76 % ( $p < 0,001$ ) и на 259 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Таким образом, как ишемические, так и реперфузионные процессы приводят к развитию дисфункции эндотелия кровеносных сосудов, что препятствует адекватной реализации механизмов регуляции мозгового кровотока у крыс с повреждениями головного мозга ишемического и реперфузионного характера. В свою очередь, повреждение эндотелия может способствовать повышению агрегационных свойств тромбоцитов, как одного из факторов тромбообразования. В ранний период ИГМ степень агрегации тромбоцитов (САТ) увеличилась на 9% ( $p < 0,05$ ), а в поздний – на 17 % ( $p < 0,001$ ). При И/РГМ эти изменения оказались более значительными и составили 27 % ( $p < 0,001$ ) и 34 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Анализ показателей, характеризующих основные звенья патогенеза ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга (окислительный стресс, воспаление, устойчивость организма к гипоксии, нарушение эндотелий-зависимых механизмов регуляции сосудистого тонуса, десквамация эндотелия кровеносных сосудов, активация агрегационных свойств тромбоцитов) свидетельствует об однонаправленности изменений большинства исследуемых показателей. Однако, выраженность изменения показателей, характеризующих вышеназванные процессы, оказалась большей при И/РГМ, чем при ИГМ, а также в поздние периоды ишемических и реперфузионных повреждений, чем в ранние.

Таким образом, характер изменения уровня нитритов и нитратов в плазме крови крыс на ранних и поздних этапах ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга свидетельствует об участии оксида азота в механизмах повреждения головного мозга ишемического и реперфузионного генеза. Для решения вопроса о роли оксида азота, образующегося нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы, в генезе изучаемой цереброваскулярной патологии выполнены исследования с использованием модуляторов активности нитрэргической системы головного мозга.

### **ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОКСИДА АЗОТА, ОБРАЗУЮЩЕГОСЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ И ИНДУЦИРУЕМОЙ ИЗОФОРМАМИ NO-СИНТАЗЫ, В ПОВРЕЖДЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЕГО ИШЕМИИ И ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ**

Выяснение роли NO, образующегося нейрональной и индуцируемой изоформами NO-синтазы, в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга осуществлено на основании анализа особенностей изменений показателей, характеризующих образование оксида азота, активность в головном мозге процессов перекисного окисления липидов и воспаления, десквамации эндотелия кровеносных сосудов, состояние механизмов эндотелийзависимой вазодилатации, а также агрегационных свойств тромбоцитов у крыс в различные периоды ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга, полученных в условиях действия в организме селективного ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы (nNOS) 7-нитро-индазола (7-НИ) и селективного ингибитора индуцируемой изоформы NO-синтазы (iNOS) S-метилизотиомочевины (S-MT).

## Характеристика эффектов селективного ингибитора нейрональной NO-синтазы 7-нитро-индазола

После введения подопытным животным 7-нитро-индазола, по сравнению группой крыс с ишемией либо ишемией-реперфузией (контроль 2), отмечено изменение большинства изученных показателей. Так, продолжительность жизни крыс в условиях гипоксии увеличилась в ранний ишемический и реперфузионный периоды в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ) (рис. 1), а в поздний период ИГМ и И/РГМ – в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,7 раза ( $p < 0,001$ ), соответственно. Повышение устойчивости к гипоксии крыс с ишемическими и реперфузионными процессами отмечалось на фоне уменьшения образования оксида азота. Так,  $[NO_x]$  в плазме крови снижалось в ранние периоды ИГМ и И/РГМ - на 16 % ( $p < 0,001$ ) и на 15 % ( $p < 0,001$ ), а в поздние периоды – на 16 % ( $p < 0,001$ ) и на 9 % ( $p < 0,001$ ), соответственно (рис. 2).

Повышение переносимости крысами гипоксии и уменьшение образования оксида азота после введения 7-НИ сопровождалось снижением в головном мозге активности процессов перекисного окисления липидов и возрастанием антиоксидантной защиты мозга. В ранний период ишемии отмечалось снижение уровня диеновых конъюгатов на 5 % ( $p < 0,05$ ). На ранних этапах ишемии-реперфузии головного мозга концентрация диеновых конъюгатов уменьшилась на 19 % ( $p < 0,001$ ), малонового диальдегида - на 12 % ( $p < 0,05$ ) и оснований Шиффа - на 17 % ( $p < 0,05$ ). В поздний период ИГМ имело место только снижение содержания оснований Шиффа (на 14 %,  $p < 0,001$ ). В поздний период И/РГМ отмечалось уменьшение содержания диеновых конъюгатов - на 14 % ( $p < 0,001$ ), малонового диальдегида - на 17 % ( $p < 0,05$ ) и оснований Шиффа – также на 17 % ( $p < 0,001$ ).

Снижение активности окислительного процесса в головном мозге крыс в условиях введения 7-НИ могло быть причиной выявленного уменьшения выраженности воспалительных реакций. В раннем реперфузионном периоде гидратация головного мозга уменьшилась на 2 % ( $p < 0,05$ ) и его миелопероксидазная активность снизилась на 24 % ( $p < 0,05$ ).

В условиях введения селективного ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы отмечалось улучшение морфофункционального состояния эндотелия кровеносных сосудов. В ранний период ИГМ эндотелийзависимая дилатация колец аорты возросла на 10 % ( $p < 0,001$ ), а количество ЦЭК в плазме крови уменьшилось на 17 % ( $p < 0,001$ ). В поздний период ИГМ изменений ЭЗВД и количества ЦЭК в плазме крови не наблюдалось. В ранний реперфузионный период отмечалось повышение ЭЗВД на 16 % ( $p < 0,001$ ) и уменьшение количества ЦЭК в плазме крови на 35 % ( $p < 0,001$ ), а в поздний период И/РГМ ЭЗВД увеличилась на 58 % ( $p < 0,001$ ), а количество ЦЭК уменьшилось на 33 % ( $p < 0,001$ ).

Вероятно, что улучшение морфофункционального состояния эндотелия кровеносных сосудов способствовало уменьшению степени агрегации тромбоцитов в ранние периоды повреждений: при ИГМ и И/РГМ - на 5 % ( $p < 0,05$ ) и на 6 % ( $p < 0,05$ ), а в поздний периоды - на 4 % ( $p < 0,05$ ) и - на 7 % ( $p < 0,05$ ), соответственно.

Анализ изменений показателей изучаемых процессов у крыс с ИГМ и И/РГМ в условиях действия в организме 7-НИ свидетельствует, что оксид азота, образующийся нейрональной изоформой NO-синтазы, приводит к увеличению концентрации нитритов и нитратов в плазме крови, активирует в мозге перекисное окисление липидов, способствует уменьшению его антиоксидантной защиты, усиливает десквамацию эндотелия кровеносных сосудов и уменьшает зависимость от эндотелия вазодилатацию, повышает способность тромбоцитов к агрегации, усиливает гидратацию мозга и миграцию в его ткань лейкоцитов, что способствует уменьшению устойчивости крыс к гипоксии в ранние и поздние периоды ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга. Известно, что оксид азота, образующийся нейрональной изоформой NO-синтазы, обуславливает эффекты нейротоксичности при ишемических инсультах в результате активации глутамат-кальциевого каскада (Квривишвили Г. И., 1999).

Таким образом, результаты выполненных исследований с использованием селективного ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы 7-НИ дают основание полагать, что NO, образующийся нейрональной изоформой NO-синтазы, определяет реализацию механизмов ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга на ранних и поздних этапах, а угнетение образования оксида азота nNOS существенно ослабляет его выраженность.

### **Характеристика эффектов селективного ингибитора индуцируемой NO-синтазы S-метилизотиомочевины**

Действие в организме животных селективного ингибитора индуцируемой NO-синтазы S-метилизотиомочевины не приводило к изменению показателей изучаемых процессов в ранний период как при ИГМ, так и при И/РГМ. Однако, в поздние периоды ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга введение S-МТ оказывало корригирующее действие в отношении большинства изученных показателей.

Продолжительность жизни крыс с ИГМ в условиях гипоксии в поздний период увеличилась в 7 раз ( $p < 0,001$ ), а с И/РГМ – в 4 раза ( $p < 0,001$ ) (рис.1), что сопровождалось уменьшением  $[NO_x]$  в плазме крови на 30 % ( $p < 0,001$ ) и на 40% ( $p < 0,001$ ), соответственно (рис. 2). Как и после введения 7-НИ, эти изменения сопровождалось снижением активности перекисного окисления липидов. При ИГМ отмечалось уменьшение в мозге [ДК] на 6 % ( $p < 0,05$ ), [МДА] - на 22 % ( $p < 0,05$ ), [ОШ] - на 15 % ( $p < 0,001$ ), а при ишемии-реперфузии головного мозга

происходило уменьшение [МДА] - на 25 % ( $p < 0,05$ ) и [ОШ] - на 37 % ( $p < 0,001$ ). Уменьшение содержания продуктов ПОЛ в мозге крыс данной группы свидетельствует об участии оксида азота, образующегося индуцируемой изоформой NOS, в генезе окислительного стресса при ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга. Высокие концентрации оксида азота способствуют окислительному стрессу преимущественно через образование пероксинитрита, нитрозопероксикарбоната и нитрил-хлорида (Radi R. , 1991; Eiserich J. D., 1996).

Под их влиянием происходит подавление активности ферментов дыхательной цепи, цикла Кребса и синтеза ДНК, повреждение клеточных мембран, липидов, белка, ДНК, наблюдается активация апоптоза и некроз нейроцитов (Jacobson M. D., 1996, Szabo C., 1996; Dawson V. L., 1996, Jacobson M. D., 1996).

В условиях действия ингибитора iNOS при ишемии головного мозга отмечалось уменьшение гидратации головного мозга на 1 % ( $p < 0,05$ ) и активности в нем миелопероксидазы - на 23 % ( $p < 0,05$ ), а при И/РГМ - на 1,3 % ( $p < 0,05$ ) и на 19 % ( $p < 0,001$ ), соответственно. Считают, что образование избытка вторичных продуктов перекисного окисления липидов является причиной повышения проницаемости гемато-энцефалического барьера и отека мозга (Gartshore G., 1997, Strasser A., 1997). Имеются также сведения о возможном непосредственном участии оксида азота в увеличении проницаемости гемато-энцефалического барьера (Shilling L., 1997).

Действие S-МТ в поздние периоды ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга сопровождалось улучшением морфофункциональных свойств эндотелия кровеносных сосудов и агрегационных свойств тромбоцитов. ЭЗВД колец аорты крыс с ИГМ увеличилась на 19 % ( $p < 0,05$ ), а у крыс с И/РГМ - на 88 % ( $p < 0,001$ ). Количество ЦЭК в плазме крови уменьшилось на 20 % ( $p < 0,001$ ) и на 50 % ( $p < 0,001$ ), соответственно. Введение ингибитора iNOS в поздний период ИГМ проявлялось снижением степени агрегации тромбоцитов на 8 % ( $p < 0,001$ ), а у крыс с И/РГМ - на 13 % ( $p < 0,001$ ).

Характер изменения показателей изучаемых процессов у крыс с ишемическими и реперфузионными повреждениями в головном мозге в условиях действия S-МТ свидетельствует, что образование оксида азота iNOS только в поздние периоды способствует активации в головном мозге окислительного стресса и воспаления, ослаблению антиоксидантной защиты в мозге, повышению агрегационных свойств тромбоцитов, возникновению морфологических повреждений эндотелия кровеносных сосудов и нарушению зависимых от эндотелия механизмов регуляции сосудистого тонуса, что в результате приводит к снижению устойчивости крыс к гипоксии.

Результаты опытов обеих серий в условиях совместного действия селективных ингибиторов NO-синтазы 7-НИ и S-МТ подтверждают данные, полученные после изолированного введения одного из этих ингибиторов NO-синтазы, об участии оксида азота, образующегося нейрональной изоформой NO-синтазы, в патогенезе преимущественно ранних ишемических и реперфу-

зионных повреждений, в то время как развитие поздних повреждений головного мозга обусловлено преимущественно активностью индуцируемой изоформы NO-синтазы.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОКСИДА АЗОТА, ОБРАЗУЮЩЕГОСЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ИЗОФОРМОЙ NO-СИНТАЗЫ, В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКИХ И РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Выяснение роли NO, образующегося эндотелиальной изоформой NO-синтазы (eNOS), в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга осуществляли путем изучения эффектов: 1) неселективного ингибитора NOS – метилового эфира N<sub>ω</sub>-нитро-L-аргинина; 2) L-аргинина и его совместного применения с селективными ингибиторами нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы.

### **Характеристика эффектов метилового эфира N<sub>ω</sub>-нитро-L- аргинина**

В отличие от эффектов селективных ингибиторов 7-НИ и S-MT после введения N<sub>ω</sub>-нитро-L-аргинина метилового эфира (L-НАМЭ) наблюдали сокращение продолжительности жизни крыс в условиях гипоксии в ранний ишемический период в 3 раза ( $p < 0,001$ ), а у крыс в ранний реперфузионный период – в 3,5 раза (рис. 1). В поздний период ИГМ ПЖ крыс не изменялась ( $p > 0,05$ ), а у крыс с И/РГМ - уменьшилась в 6 раз ( $p < 0,001$ ). Снижение устойчивости крыс к гипоксии происходило на фоне уменьшения [NO<sub>x</sub>] на 21 % ( $p < 0,001$ ) в ранний ишемический период и на 47 % ( $p < 0,001$ ) в аналогичный период И/РГМ (рис. 2). В поздний период ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга изменений концентрации нитритов и нитратов в плазме крови в условиях введения L-НАМЭ не отмечали.

Наряду с этим имело место увеличение в мозге концентрации продуктов ПОЛ: в ранний период ИГМ – [ДК] на 33 % ( $p < 0,001$ ), [МДА] - на 69 % ( $p < 0,001$ ); в ранний реперфузионный период - [ДК] на 36 % ( $p < 0,001$ ), [МДА] - на 33 % ( $p < 0,001$ ) и [ОШ] - на 9 % ( $p < 0,001$ ). В поздний период ИГМ отмечено увеличение [ДК] на 33 % ( $p < 0,001$ ), [МДА] - на 38 % ( $p < 0,05$ ), [ОШ] - на 17 % ( $p < 0,001$ ), а в поздний период И/РГМ - [ДК] - на 38 % ( $p < 0,001$ ), [МДА] - на 19 % ( $p < 0,05$ ) и [ОШ] - на 11 % ( $p < 0,001$ ), соответственно. Одновременно в мозге крыс отмечали снижение содержания факторов антиоксидантной защиты.

Возрастание активности окислительных процессов в мозге крыс сопровождалось повышением в ранний период И/РГМ миелопероксидазной активности головного мозга на 22 % ( $p < 0,05$ ), а в поздний период: на 38 % ( $p < 0,05$ ) - при ИГМ и на 22 % ( $p < 0,05$ ) - при И/РГМ.

Повышение активности окислительных процессов и миграции лейкоцитов в головной мозг после введения L-НАМЭ способствовало нарушению механизмов регуляции сосудистого тонуса, что проявлялось в ранние периоды уменьшением ЭЗВД у крыс с ИГМ на 99 % ( $p < 0,001$ ), а у крыс с И/РГМ – на 95 % ( $p < 0,001$ ). Одновременно происходило повышение десквамации эндотелия. Количество циркулирующих эндотелиальных клеток в крови в ранний ишемический период увеличилось на 22 % ( $p < 0,001$ ), а в ранний реперфузионный период - на 26 % ( $p < 0,001$ ). В поздние периоды ЭЗВД уменьшилась у крыс с ИГМ на 75 % ( $p < 0,001$ ), а с И/РГМ - на 50 % ( $p < 0,001$ ), в то время как количество ЦЭК в крови крыс увеличилось на 56 % ( $p < 0,001$ ) и на 29 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Усугубление морфофункциональных нарушений эндотелия кровеносных сосудов после введения в организм подопытных крыс L-НАМЭ приводило к увеличению степени агрегации тромбоцитов в ранний период ИГМ на 12 % ( $p < 0,001$ ) и в аналогичный период И/РГМ - на 18 % ( $p < 0,001$ ). В поздние периоды САТ увеличилась на 15 % ( $p < 0,001$ ) и на 18 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Таким образом, действие неселективного ингибитора NO-синтазы L-НАМЭ в организме крыс с ИГМ и с И/РГМ, в отличие от селективных ингибиторов нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы, приводит к усилению активации окислительных и воспалительного процессов в мозге, агрегационных свойств тромбоцитов, снижению антиоксидантной защиты мозга, нарушению эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса и уменьшению устойчивости организма к гипоксии. Учитывая то, что действие селективных ингибиторов нейрональной и индуцируемой изоформ NOS при ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга оказывало корригирующее действие, причиной повреждающих эффектов L-НАМЭ может быть подавление активности эндотелиальной NOS, а оксид азота, образующийся этой изоформой NO-синтазы, оказывает защитное действие. Цитопротекторные свойства оксида азота могут быть обусловлены наличием у него антиоксидантных свойств. Как антиоксидант, NO может выступать в роли «ловушки» радикалов кислорода, обладает способностью подавлять NMDA-рецепторную активность нейронов, угнетает ксантинооксидазу, металл/пероксидные оксидативные реакции, липооксигеназный путь образования активных форм кислорода и вызывает обрыв цепи образования липидных кислородных радикалов (Yonetani M., 1996, Stagliano N. E., 1997, Wink D. A. et al., 2001).

С целью подтверждения компенсаторной роли оксида азота, образующегося эндотелиальной изоформой NO-синтазы, и поиска путей коррекции изучаемой патологии осуществлен анализ эффектов L-аргинина и эффектов его со-



вместного применения с ингибиторами нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы.

### Анализ эффектов L-аргинина

В организме крыс с ишемией и ишемией-реперфузией головного мозга введение субстрата NO-синтазы L-аргинина привело к увеличению продолжительности жизни крыс в условиях гипоксии в ранний ишемический период в 1,4 раза ( $p < 0,001$ ), у животных с И/РГМ - в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ) (рис. 2). В поздний период ишемии головного мозга ПЖ крыс увеличилась в 2,8 раза ( $p < 0,001$ ), а у животных с И/РГМ - в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ). Увеличение устойчивости крыс к гипоксии происходило на фоне уменьшения  $[NO_x]$  в плазме крови в ранние периоды ИГМ на 14 % ( $p < 0,001$ ) и И/РГМ - на 27 % ( $p < 0,001$ ), а в поздние периоды - на 24 % ( $p < 0,001$ ) и на 29 % ( $p < 0,001$ ), соответственно (рис. 2).

Наряду с уменьшением концентрации нитритов и нитратов в плазме крови после введения L-аргинина повышение устойчивости крыс к гипоксии сопровождалось уменьшением в мозге продуктов ПОЛ: в ранний период ИГМ - [ДК] на 6 % ( $p < 0,05$ ) и И/РГМ - [ДК] - на 19 % ( $p < 0,05$ ), [МДА] - на 9 % ( $p < 0,05$ ) и [ОШ] - на 10 % ( $p < 0,05$ ). В позднем периоде ИГМ отмечали уменьшение [ДК] на 5 % ( $p < 0,05$ ), [МДА] - на 24 % ( $p < 0,05$ ), [ОШ] - на 15 % ( $p < 0,001$ ), а в позднем периоде И/РГМ - на 11 % ( $p < 0,05$ ), на 13 % ( $p < 0,05$ ) и на 15 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Уменьшение активности окислительных процессов в оба периода ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга после введения L-аргинина может быть связано как непосредственно с антиоксидантными эффектами субстрата NOS, так и с антиоксидантными эффектами образующегося из L-аргинина оксида азота (Могильницкая Л. В., 1999). Известно, что относительный дефицит L-аргинина в условиях ишемии мозга приводит к активации образования в нейронах супероксид аниона, оказывающего нейротоксическое действие (Kahn R. A., 1997), что, по некоторым данным, может приводить и к активации iNOS (Hiroaki K., 2004).

Действие L-аргинина в ранний реперфузионный период характеризовалось снижением выраженности воспалительного процесса в мозге крыс: уменьшением гидратации мозга на 1,5 % ( $p < 0,05$ ) и активности в нем миелопероксидазы на 24,5 % ( $p < 0,05$ ). В поздний период ишемии головного мозга отмечалось уменьшение этих показателей на 1,1 % ( $p < 0,05$ ) и на 21 % ( $p < 0,05$ ), а при ишемии-реперфузии - на 2 % ( $p < 0,05$ ) и на 13 % ( $p < 0,05$ ), соответственно.

Уменьшение выраженности воспалительных реакций и выраженности окислительных процессов после введения L-аргинина сопровождалось улучшением эндотелийзависимых механизмов регуляции сосудистого тонуса и уменьшением десквамации эндотелия кровеносных сосудов. В условиях введения L-аргинина на раннем этапе ИГМ ЭЗВД увеличилась на 12 % ( $p < 0,001$ ), количество ЦЭК в плазме крови уменьшилось на 17 % ( $p < 0,001$ ), в то время как у жи-

вотных с И/РГМ произошло аналогичное изменение этих показателей - 45 % ( $p < 0,001$ ) и на 38 % ( $p < 0,001$ ), соответственно. В поздний период ИГМ изменения показателей, характеризующих морфофункциональное состояние эндотелия кровеносных сосудов, были аналогичными по направленности, но менее выраженными, чем при И/РГМ.

Улучшение морфофункционального состояния эндотелия кровеносных сосудов в условиях действия L-аргинина у крыс с ишемическими и реперфузионными процессами головного мозга препятствовало увеличению степени агрегации тромбоцитов ( $p < 0,05$ ). Антиагрегационные эффекты L-аргинина связывают с его антиоксидантными, эндотелийпротекторными свойствами (Moncada S., 1988), а также с ингибирующим адгезию лейкоцитов действием (Higuchi H. et al., 1999).

Таким образом, введение в организм крыс с ишемией и ишемией-реперфузией головного мозга L-аргинина препятствовало нарушению эндотелийзависимых механизмов регуляции тонуса кровеносных сосудов, повышению агрегационных свойств тромбоцитов, активации окислительного стресса и повышало содержание факторов антиоксидантной защиты в мозге, оказывало противовоспалительное действие, уменьшало десквамацию эндотелия кровеносных сосудов, что способствовало увеличению устойчивости организма к гипоксии. Однако, действие L-аргинина в организме крыс корригировало повреждения, вызванные ишемическими и реперфузионными процессами головного мозга не в полной мере.

#### **Анализ результатов одновременного введения 7-нитро-индазола, S-метилизотиомочевины и L-аргинина**

Установлено, что одновременное введение 7-НИ, S-МТ и L-аргинина крысам с ИГМ и И/РГМ оказывает более выраженный корригирующий эффект, чем при иных используемых ранее способах модуляции активности нитрэргической системы мозга. Так, ПЖ крыс в условиях гипоксического теста в ранние периоды ИГМ и И/РГМ достоверно сократилась в 1,5 раза и в 1,4 раза соответственно, а в поздние периоды – в 12 раз и в 6 раз, соответственно (рис. 1). Повышение устойчивости крыс к гипоксии происходило на фоне уменьшения  $[NO_x]$  на ранних этапах ИГМ и И/РГМ на 21 % ( $p < 0,001$ ) и на 36 % ( $p < 0,001$ ), соответственно (рис. 2). Концентрация нитритов и нитратов в плазме крови в поздний ишемический период уменьшилась на 38 % ( $p < 0,001$ ), а в поздний период ишемии-реперфузии головного мозга – на 52 % ( $p < 0,001$ ) и оказалась ниже, чем в других группах ( $p < 0,05$ ).

У животных данной группы с ИГМ в ранний период в головном мозге имело место снижение [ДК] на 7 % ( $p < 0,05$ ), [ОШ] - на 6 % ( $p < 0,05$ ), в то время как в ранний реперфузионный период отмечалось уменьшение [ДК] на 26 %

( $p < 0,001$ ), [МДА] - на 27 % ( $p < 0,001$ ) и [ОШ] - на 7 % ( $p < 0,001$ ). На поздних этапах ИГМ [ДК] в мозге уменьшилась на 8 % ( $p < 0,05$ ), [МДА] - на 28 % ( $p < 0,05$ ), [ОШ] - на 41 % ( $p < 0,001$ ), а у крыс с И/РГМ - на 23 % ( $p < 0,001$ ), на 38% и на 41 % ( $p < 0,001$ ), соответственно. Уменьшение концентрации продуктов ПОЛ в головном мозге крыс данной группы сопровождалось существенным увеличением содержания факторов антиоксидантной защиты. В ранний период ИГМ [P] увеличилась на 32 % ( $p < 0,001$ ), [ $\alpha$ -T] - на 66 % ( $p < 0,001$ ), [SH-] - на 9% ( $p < 0,001$ ); а в ранний реперфузионный период: на 32 % ( $p < 0,001$ ), на 11 % ( $p < 0,05$ ) и на 20 % ( $p < 0,001$ ), соответственно. В поздний период ИГМ [P] увеличилась 47 % ( $p < 0,001$ ), [ $\alpha$ -T] - на 59 % ( $p < 0,001$ ) и [SH-] - на 9 % ( $p < 0,001$ ), а в поздний реперфузионный период - на 47 % ( $p < 0,001$ ), на 35 % ( $p < 0,001$ ) и на 17 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

У крыс обеих серий отмечали меньшую выраженность воспалительного процесса в мозге. В ранний период И/РГМ гидратация мозга была менее выраженной (на 1,94 %,  $p < 0,05$ ), а активность миелопероксидазы в мозге уменьшилась на 36 % ( $p < 0,05$ ). На поздних этапах ИГМ содержание воды в мозге и АМП также были меньше (на 1,94 %,  $p < 0,05$ ) и на 40 %,  $p < 0,05$ , соответственно). В позднем периоде И/РГМ гидратация мозга уменьшилась на 2,9 % ( $p < 0,001$ ), АМП - на 35 % ( $p < 0,001$ ).

При морфогистологическом исследовании мозга в ранние и поздние периоды ИГМ и И/РГМ у крыс данных групп грубых нарушений его цитоархитектоники не выявлено. Только на поздних этапах И/РГМ имели место некоторые слабо выраженные нарушения морфологии нейронов: единичные гиперхромные пирамидные нейроны в наружном и внутреннем пирамидных слоях.

Наряду с этим, в организме подопытных крыс введение L-аргинина, 7-НИ и S-МТ приводило к максимальной коррекции морфофункциональных нарушений эндотелия кровеносных сосудов. Увеличение эндотелийзависимой вазодилатации колец аорты наблюдали как в ранний ишемический период (на 16 %,  $p < 0,001$ ), так в ранний реперфузионный период (на 65 %,  $p < 0,001$ ). В плазме крови отмечалось уменьшение количества циркулирующих эндотелиальных клеток: в ранний ишемический период на 22 % ( $p < 0,001$ ) и в ранний реперфузионный период - на 46 % ( $p < 0,001$ ).

На поздней стадии ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга ЭЗВД колец аорты увеличилась на 23 % ( $p < 0,001$ ) и на 188 % ( $p < 0,001$ ), а количество ЦЭК в плазме крови уменьшилось на 41 % ( $p < 0,001$ ) и на 61 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Введение трех вышеназванных модуляторов активности НЭСМ максимально препятствовало активации степени агрегации тромбоцитов. В ранний период ИГМ и И/РГМ САТ уменьшилась на 8 % ( $p < 0,05$ ) и на 18 % ( $p < 0,05$ ), а в позднем периоде - на 13 % ( $p < 0,001$ ) и на 23 % ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что совместное введение животным 7-НИ, S-МТ и L-аргинина приводит к макси-

мально выраженной коррекции повреждений головного мозга при его ишемии и ишемии-реперфузии. В итоге значения многих показателей исследуемых процессов у животных не отличались от таковых в группе ложнооперированных крыс (контроль 1) ( $p > 0,05$ ). В частности, на ранней стадии ИГМ не отличались от значений у крыс группы контроль 1 следующие показатели: концентрация нитритов и нитратов в плазме крови, диеновых конъюгатов в мозге, эндотелийзависимая вазодилатация, количество циркулирующих в крови эндотелиальных клеток, степень агрегации тромбоцитов, а у крыс с И/РГМ – содержание в мозге ретинола, циркулирующих эндотелиальных клеток и степени агрегации тромбоцитов. В позднем периоде ИГМ не отличались от значений в группе контроль 1 - концентрация нитритов и нитратов в плазме крови, диеновых конъюгатов, оснований Шиффа, ретинола в мозге, эндотелийзависимая вазодилатация, количество циркулирующих эндотелиальных клеток и степень агрегации тромбоцитов, а при И/РГМ – концентрация нитритов и нитратов в плазме крови и ретинола в мозге.

Анализ направленности и выраженности изменения изучаемых показателей у крыс с ИГМ и И/РГМ в условиях действия L-аргинина, а также после его введения с 7-НИ и S-MT дает основание полагать, что корригирующие эффекты субстрата NO-синтазы L-аргинина, как при ИГМ, так и при И/РГМ обусловлены образованием NO эндотелиальной NO-синтазы. В условиях действия трех вышеназванных модуляторов нитрэргической системы мозга отмечалось уменьшение выраженности повреждения головного мозга при его ишемии и ишемии-реперфузии в результате значительного улучшения эндотелийзависимой вазодилатации, уменьшения десквамации эндотелия кровеносных сосудов, нормализации агрегационных свойств тромбоцитов, снижения активности окислительного и воспалительного процессов в мозге, а также повышения его антиоксидантной защиты.

Проведенные исследования выявили неоднозначную роль процессов образования оксида азота нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы на ранних и поздних этапах повреждения головного мозга ишемического и реперфузионного характера (см. табл.).

Установлено патогенное действие оксида азота, образующегося нейрональной изоформой NO-синтазы, в оба периода ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга и оксида азота, образующегося индуцируемой изоформой этого фермента, только на поздних этапах ИГМ и И/РГМ, а также компенсаторная роль NO, образующегося его эндотелиальной изоформой.

Принимая во внимание неоднозначную роль оксида азота, образующегося известными тремя изоформами NO-синтазы, очевидно, что целью патогенетической коррекции изучаемой патологии является необходимость поддержания адекватной активности эндотелиальной изоформы NO-синтазы (путем введения L-аргинина). Целесообразность использования L-аргинина для коррекции

ишемических повреждений головного мозга защищена патентом на изобретение.

Другим направлением коррекции изучаемой патологии является применение в максимально ранние сроки после окклюзии общих сонных артерий селективных ингибиторов нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы.

Таблица

Влияние оксида азота, образующегося нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы, на изучаемые процессы и состояние организма крыс в ранние и поздние периоды субтотальной ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга

Анализируемые процессы	Действие NO в организме крыс с ИГМ и И/РГМ, образующегося					
	nNOS		iNOS		eNOS	
	Ранний период	поздний период	ранний период	поздний период	ранний период	поздний период
Образование и деградация оксида азота	↑	↑	-	↑	↓	↓
Окислительный стресс	↑	↑	-	↑	↓	↓
Воспаление	↑	↑	-	↑	↓	↓
Эндотелийзависимая вазодилатация	↓	↓	-	↓	↑	↑
Десквамация эндотелия кровеносных сосудов	↑	↑	-	↑	↓	↓
Устойчивость организма к гипоксии	↓	↓	-	↓	↑	↑

Действительно, наиболее эффективная коррекция ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга достигается при одновременном введении непосредственно после окклюзии общих сонных артерий субстрата NO-синтазы L-аргинина, селективного ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы 7-НИ и селективного ингибитора индуцируемой изоформы NO-синтазы S-MT.

Таким образом, полученные результаты расширяют существующие представления о значимости процессов образования оксида азота различными изоформами NO-синтазы при его ишемии и ишемии-реперфузии и определяют новое направление в изучении патогенеза выявленных повреждений головного мозга, а также являются теоретическим и экспериментальным обоснованием использования фармакологических препаратов, селективно влияющих на нейрональную, индуцируемую и эндотелиальную изоформы NO-синтазы с целью

лечения изучаемой цереброваскулярной патологии. Предполагается, что внедрение новых патогенетически обоснованных терапевтических подходов в клиническую практику повысит эффективность лечения нарушений мозгового кровообращения и будет иметь важное социальное и экономическое значение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выяснена роль оксида азота, образующегося нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы, в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга, а также определены основные направления NO-зависимой коррекции выявленных нарушений путем модуляции активности нитрэргической системы мозга.

1. Активность нитрэргической системы головного мозга имеет важное значение в реализации механизмов его ишемического и реперфузионного повреждения. Отмечаемое при этих состояниях повышение образования оксида азота сопровождается активацией в головном мозге процессов перекисного окисления липидов, развитием воспаления, ослаблением его антиоксидантной защиты, а также повышением агрегационных свойств тромбоцитов, усилением десквамации эндотелия кровеносных сосудов, нарушением процессов эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса и снижением устойчивости организма к гипоксии [1, 10-14, 16-23, 30, 33-36, 47, 48].
2. Направленность и выраженность изменений показателей (уровня продуктов перекисного окисления липидов, факторов антиоксидантной защиты, гидратации мозга, миелопероксидазной активности, эндотелийзависимой вазодилатации, степени агрегации тромбоцитов, устойчивости организма к гипоксии), характеризующих механизмы развития ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и их тяжесть, на ранних (30 минут) и поздних (24 часа) этапах неоднозначны и зависят от образования оксида азота нейрональной, эндотелиальной и индуцируемой изоформами NO-синтазы [1, 10-13, 16-22, 33-36, 48].
3. Образование оксида азота нейрональной изоформой NO-синтазы преимущественно в ранние периоды ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга сопровождается активацией в головном мозге перекисного окисления липидов и снижением его антиоксидантной защиты, возникновением воспаления, а также повышением агрегационных свойств тромбоцитов, увеличением десквамации эндотелия кровеносных сосудов, нарушением его вазоактивных свойств и снижением устойчивости организма к гипоксии. Введение селективного ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы 7-нитроиндазола

ослабляет выраженность этих процессов и улучшает состояние организма [1, 6, 9-13, 16-36].

4. Образование оксида азота индуцируемой изоформой NO-синтазы только на поздних этапах ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга проявляется активацией перекисного окисления липидов, воспалительных реакций, агрегации тромбоцитов, нарушением эндотелийзависимых механизмов регуляции сосудистого тонуса, увеличением десквамации эндотелия кровеносных сосудов, а также снижением антиоксидантной защиты мозга и устойчивости организма к гипоксии. Действие в организме селективного ингибитора индуцируемой изоформы NO-синтазы S-метилизотиомочевины уменьшает выраженность патологических процессов, лежащих в основе повреждений головного мозга ишемического и реперфузионного характера на поздних этапах [1, 6, 9-13, 16-36].
5. В условиях одновременного действия в организме селективных ингибиторов нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы отмечается более выраженный терапевтический эффект на поздних этапах ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга. Это подтверждает участие нейрональной изоформы NO-синтазы в опосредовании повреждений головного мозга на ранних этапах, а индуцируемой и нейрональной изоформы этого фермента на поздних этапах изучаемой патологии и указывает на целесообразность использования двух вышеназванных селективных ингибиторов NO-синтазы для коррекции цереброваскулярной патологии ишемического и реперфузионного характера [1, 6, 9-13, 16-36].
6. Образование оксида азота эндотелиальной изоформой NO-синтазы оказывает защитное действие в условиях ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга. Это следует из эффектов неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира N<sub>ω</sub>-нитро-L-Аргинина: активации в головном мозге процессов перекисного окисления липидов, воспалительных реакций, уменьшения антиоксидантной защиты мозга, а также усиления десквамации эндотелия кровеносных сосудов, нарушения зависимых от эндотелия механизмов регуляции сосудистого тонуса, активации агрегационных свойств тромбоцитов и снижения устойчивости организма к гипоксии [1, 6, 9 –13, 16-36].
7. Применение L-аргинина уменьшает выраженность ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга вследствие ослабления окислительного и воспалительного процессов в мозге, десквамации эндотелия кровеносных сосудов, уменьшения агрегационных свойств тромбоцитов и улучшения эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса, лежащих в их основе, а одновременное введение субстрата NO-синтазы с селективными ингибиторами нейрональной изоформы NO-синтазы 7-нитроиндазолом и се-

лективным ингибитором индуцируемой изоформы фермента S-метиллизотиомочевинной минимизирует выраженность ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и повышает устойчивость организма к гипоксии как в ранний, так и в поздний периоды [1, 3, 4, 5, 10-14, 12, 16-25, 28, 30, 33-36, 41, 46, 48].

8. Предложен новый подход фармакологической коррекции ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга, предусматривающий избирательную модуляцию активности нитрэргической системы мозга: ингибирование активности нейрональной и индуцируемой изоформ NO-синтазы и сохранение функциональной активности эндотелиальной изоформы этого фермента [1-10, 21- 44, 46, 48].

Репозиторий ГРГМУ



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Монография

1. Максимович Н. Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга. - Гродно, ГрГМУ. - 2004. - 180с.

### Методические рекомендации

2. Вильчук К. У., Максимович Н. А., Максимович Н. Е. Функциональные пробы, применяемые в диагностике дисфункции эндотелия // Методические рекомендации МЗ РБ. – Гродно. - 2001. – 19 с.

### Описание к патенту

3. Патент №С1by, 5820, МПК А 61К 31/195/ Средство для коррекции ишемического инсульта / Максимович Н. Е., Маслаков Д. А. - № заявки А19991169; Заявл. 28.12.1999; Опубл. 29. 08. 2003 // Афіцыйны бюлетэнь/ Нац. Центр інтелект. уласнасці РБ. - 2003. - № 4. - С.112.

### Статьи в журналах

4. Максимович Н. Е. Функциональная активность эндотелия сосудов при экспериментальном атеросклерозе // Достижения медицинской науки Беларуси. Выпуск IV. - Мн.: БелЦН, 1999. - С. 109.
5. Маслаков Д. А., Максимович Н. Е., Эйсмонт К. А. Современные представления о биологическом действии препаратов полисахаридной природы // Медицинские новости. - 2000. - № 5. - С. 19 - 22.
6. Максимович Н. Е., Маслаков Д. А. Аминокислота L-аргинин и перспективы ее использования в клинике // Здоровоохранение. - 2003. - № 5. - С. 35 - 37.
7. Максимович Н. Е. Исследование механизмов нарушения гомеостаза оксида азота в научных и клинических лабораториях Гродненского государственного медицинского университета. Из опыта сотрудничества // Журнал ГрГМУ. - 2003. - № 4.- С. 101-102.
8. Максимович Н. Е. Понятие о нитроксидаергической системе мозга. Роль нейрональных источников // Журнал ГрГМУ. - 2003. - № 4. - С. 7 - 11.
9. Максимович Н. Е. Понятие о нитроксидаергической системе мозга. Роль экстранейрональных источников // Журнал ГрГМУ. - 2004. - № 1. - С. 3 - 5.

10. Максимович Н. Е. Роль оксида азота в генезе повреждений мозга при оксидативном стрессе // Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук. - 2004. - № 2. - С. 112 - 117.
11. Максимович Н. Е. Антигипоксическая устойчивость крыс с ишемией-реперфузией головного мозга в условиях модуляции пути «L-аргинин - NO» // Журнал ГрГМУ. - 2004. - № 2. - С. 43 - 46.
12. Максимович Н. Е. Переносимость гипоксической гипоксии при ишемии головного мозга у крыс на фоне использования модуляторов NO-синтазы // Hypoxia Medical. - 2004. - V. (1-2). - 19 - 22.
13. Maksimovich N. E. Tolerance of hypoxic hypoxia in rats with cerebral ischemia treated by NO-synthase modulators // Hypoxia medical. - 2004. - V. (1-2). - P. 20 - 23.
14. Максимович Н. Е. Роль различных изоформ NO-синтазы в повреждении эндотелия и формировании его дисфункции при ишемии головного мозга у крыс // Белорусский медицинский журнал. - 2004. - № 3. - С. 65 - 68.
15. Максимович Н. Е., Козловский В. И., Максимович Н. А. Современные экспериментальные методы оценки состояния морфо-функциональных свойств эндотелия сосудов // Журнал ГрГМУ. - 2004. - № 2. - С. 26 - 30.
16. Максимович Н. Е. Роль оксида азота нейронального и экстранейронального происхождения в повреждении эндотелия и формировании его дисфункции при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс // Региональное кровообращение и микроциркуляция. - 2004. - Т. 3. - № 2(10). - С. 63 - 68.
17. Максимович Н. Е. Особенности формирования уровня оксида азота в плазме крови крыс при ишемических и реперфузионных повреждениях головного мозга // Региональное кровообращение и микроциркуляция. - 2004. - № 3(11). - С. 55 - 60.
18. Максимович Н. Е. Возможности использования модуляторов образования оксида азота для коррекции воспалительного процесса в мозге крыс при его ишемии-реперфузии // Иммунология, аллергология, инфектология. - 2004. - № 3. - С. 14 - 17.
19. Максимович Н. Е. Степень агрегации тромбоцитов у крыс при реперфузионных повреждениях головного мозга в условиях модуляции пути «L-аргинин - NO» // Вестник фармации. - 2004. - № 1. - С. 60 - 64.
20. Максимович Н. Е., Зинчук В. В., Маслаков Д. А. 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 // Белорусский медицинский журнал. - 2004. - № 4. - С. 67 - 69.
21. Максимович Н. Е. Экспериментальное обоснование лечения отека мозга при его ишемии путем коррекции образования оксида азота // Журнал ГрГМУ. - 2004. - № 4. - С. 17 - 21.

22. Максимович Н. Е., Зинчук В. В., Маслаков Д. А. Показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния при ишемии головного мозга и введении модуляторов синтеза оксида азота // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. - 2005. - № 2. - С. 54 - 57.
23. Максимович Н. Е., Зинчук В. В., Маслаков Д. А. Степень окислительного стресса головного мозга крыс при ишемии/реперфузии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. - 2005. - Т. 91. - № 4. - С. 385 - 393.

### Статьи в сборниках

24. Максимович Н. Е., Маслаков Д. А. Изучение вазоактивных эффектов оксида азота в экссудативной фазе воспаления // Монооксид азота в процессах жизнедеятельности: Материалы межд. конф. - Мн., 1998. - С. 126 - 130.
25. Максимович Н. Е., Маслаков Д. А. Результаты использования L-аргинина при экспериментальных нарушениях мозгового кровообращения // Роль нейромедиаторов и регуляторных пептидов в процессах жизнедеятельности: Материалы межд. конф. - Мн., 1999. - С. 175 - 178.
26. Максимович Н. Е., Маслаков Д. А. Последствия использования гепарина в условиях надпочечниковой недостаточности: роль оксида азота // Роль нейромедиаторов и регуляторных пептидов в процессах жизнедеятельности: Материалы докладов конф. - Мн., 1999. - С. 173 - 174.
27. Максимович Н. Е. Стресс-индуцированная дисфункция эндотелия: патофизиологические аспекты // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: Материалы республик. науч.-практ. конференции. - Витебск, 2000. - С. 76 - 78.
28. Максимович Н. Е., Маслаков Д. А. Использование субстратной терапии аминокислотами для коррекции дисфункции эндотелия сосудов при экспериментальном атеросклерозе // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: Материалы республик. науч.-практ. конф. - Витебск, 2000. - С. 78 - 81.
29. Максимович Н. Е., Чайковская Н. А. Характер изменения мобильного пула оксида азота у крыс с ишемией мозга // Функциональная роль монооксида азота и пуринов: Сб. статей участников конф. с межд. участием. - Мн., 2001. - С. 111 - 114.
30. Максимович Н. Е. L-аргинин модифицирует переносимость гипоксической гипоксии и физической работы крысами при ишемии головного мозга, предварительно находившимися на атерогенной диете // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: Труды II-й межд. науч.-практ. конференции. - Витебск, 2002. - С. 108 - 111.
31. Максимович Н. Е. Фраксипарин и дисфункция эндотелия при синдроме ишемия-реперфузия головного мозга у крыс // Дисфункция эндотелия: экс-

периментальные и клинические исследования: Труды II-й межд. науч. - практ. конф. - Витебск, 2002. – С. 111 - 114.

32. Вильчук К. У., Максимович Н. А., Максимович Н. Е. Возможные направления внедрения неинвазивных методов диагностики дисфункции эндотелия в клиническую педиатрию // Медицинская наука практике здравоохранения: Мат. юбилейной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ЦНИЛ ВГМУ и 55-летию СНО ВГМУ. - Витебск, 2003. - С. 90 - 94.
33. Максимович Н. Е. Исследование роли оксида азота в повреждении эндотелия у крыс с ишемией-реперфузией головного мозга // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: Труды II-й межд. науч.- практ. конф. - Витебск, 2004. – С. 101 - 105.
34. Максимович Н. Е. Исследование роли оксида азота в патогенезе нарушений эндотелийзависимой дилатации аорты у крыс с реперфузионным синдромом головного мозга // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: Труды II-й межд. науч.-практ. конф. - Витебск, 2004. – С. 105 - 109.
35. Максимович Н. Е. Эффект различных ингибиторов NO-синтазы и L-аргинина в изменении уровня стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови крыс при ишемии и реперфузии головного мозга // Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине: Материалы конференции с межд. участием. – Мн.: ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. - С. 233 - 234.
36. Максимович Н. Е., Зинчук В. В., Маслаков Д. А. Системный анализ эффектов различных модуляторов L-аргинин – NO системы на состояние окислительного стресса у крыс с ишемией головного мозга // Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине: Материалы конференции с межд. участием. – Мн.: ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. - С. 231 - 232.

### Тезисы

37. Максимович Н. Е. Роль оксида азота в вазоактивных и клеточноопосредованных реакциях организма при воспалении // Мат. науч. конф., посвящ. 40-летию ГГМИ. - Гродно, 1998. - С. 76 - 77.
38. Максимович Н. Е. Различные эффекты гепаринов при постишемических повреждениях мозга // История и современные проблемы лекарственного обеспечения населения: Материалы науч. конф., посвященной 60-летию гос. аптечной службы Гродненской области. – Гродно, 2000. – С. 165 - 166.
39. Максимович Н. Е. Коррекция таурином реперфузионных повреждений мозга // История и современные проблемы лекарственного обеспечения населения: Материалы науч. конф., посвященной 60-летию государственной аптечной службы Гродненской области. – Гродно, 2000. – С. 169 - 170.

40. Максимович Н. Е. Об вазоактивных реакциях сосудов при атеросклерозе // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: Материалы науч.-практ. конф. молодых ученых. – Мн., 2000. – С. 378 - 379.
41. Максимович Н. Е. Использование аминокислоты L-аргинин для коррекции вазоактивных свойств сосудов крыс с экспериментальным атеросклерозом // Актуальные вопросы медицины и новые технологии мед. образования: Материалы науч.-практ. конф. Гомель, 2000. – С. 23 - 24.
42. Максимович Н. Е., Маслакова Н. Д. К вопросу о роли оксида в эффектах полиглюкина // История и современные проблемы лекарственного обеспечения населения: Мат. науч. конф., посвященной 60-летию государственной аптечной службы Гродненской области. – Гродно, 2000. – С. 167 - 168.
43. Максимович Н. Е., Маслаков Д. А. Патогенетическая терапия постишемических повреждений мозга (экспериментальные исследования) // Актуальные вопросы клинической медицины: Материалы научн.-практ. конф., посвящ. 40-летию кафедры пропедевтики внутренних болезней ГрГМУ. – Гродно, 2000. – С. 78 - 79.
44. Максимович Н. Е., Маслаков Д. А., Чайковская Н. А. Влияние гепарина и фраксипарина на NO-продуцирующую способность мозга // Тез. докл. X съезда Бел. общества физиологов. - Мн., 2001. - С. 97.
45. Maksimovich N. E., Maslakov D. A., Chaikovskaya N. A. Influence of Heparine and Fraxiparine on the ability to form nitric oxide in the brain // Pharmacology. Toxicology: Abstract Book 5th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. - Odense, Denmark, 2001. - V. 89. - P. 142.
46. Maksimovich N. E., Ashraf M. S. L-arginine effect in experimental ischemic stroke // Microcirculation: Abstracts of the 7-th Wold Congress. - Australia, 2001. - Poster 3-27.
47. Maksimovich N. E. Fraxiparine and dysfunction endothelium at rats with brain ischemia-reperfusion // Global Risk Of Coronary Heart Disease and stroke: Assesment, Prevention, and Treatment: Abstract Book of the 6<sup>th</sup> International Symposium. - Italy, 2002. - P. 60.
48. Maksimovich N. E. L-Arginine and life duration of rats with brain ischemia which previously taking on atherogenic diet on hypoxы test // Global Risk Of Coronary Heart Disease and stroke: Assesment, Prevention, and Treatment: Abstract Book of the 6<sup>th</sup> International Symposium. - Italy, 2002. - P. 61.

## РЕЗЮМЕ

**Максимович Наталия Евгеньевна**

**Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и обоснование путей их коррекции**

**Ключевые слова:** оксид азота, ишемия, ишемия-реперфузия, L-аргинин, ингибиторы NO-синтазы, головной мозг.

**Объект исследования:** беспородные крысы (1152), изолированные из их организма головной мозг, кольца аорты, плазма крови, тромбоциты, эндотелиоциты.

**Цель работы:** выяснение роли оксида азота, образующегося нейрональной, индуцируемой и эндотелиальной изоформами NO-синтазы, в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и обоснование путей коррекции данной патологии путем избирательного влияния на активность изоформ NO-синтазы.

**Методы исследования:** физиологические, биохимические, морфологические, фармакологические.

**Использованная аппаратура:** спектрофотометр (СФ-46), флюоресцирующий спектрофотометр F-4010 «Hitachi», система компьютерного анализа изображения «Bioscan NT», барокамера ПБК-53, изометрический миограф («Organ bath», Германия), агрегометр (АР 21103АО "Солар").

В результате использования L-аргинина и селективных ингибиторов нейрональной NO-синтазы 7-нитро-индазола и индуцируемой NO-синтазы S-метилизотиомочевины, неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира N<sub>ω</sub>-нитро-L-аргинина установлено, что в ранние и поздние периоды ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга оксид азота (NO), образующийся нейрональной изоформой NO-синтазы, снижает антигипоксическую устойчивость крыс, увеличивает уровень нитритов и нитратов в плазме крови, повышает активность процессов перекисного окисления липидов и снижает уровень ряда антиоксидантов в плазме крови и мозге, усиливает морфофункциональные повреждения эндотелия и способность тромбоцитов к агрегации, а в поздний период усиливает воспалительные реакции. В поздний период основная роль в возникновении данных патологических нарушений принадлежит оксиду азота, образующемуся индуцируемой изоформой NO-синтазы. Оксид азота, образующийся эндотелиальной изоформой NO-синтазы, уменьшает выраженность ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга.

Наиболее выраженный корригирующий эффект обусловленных оксидом азота ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга отмечен при совместном введении 7-нитро-индазола, S-метилизотиомочевины и L-аргинина.

**Область применения:** научно-исследовательские лаборатории, теоретический курс патологической физиологии и биохимии в вузах медико-биологического профиля.

**Максімовіч Наталія Яўгеньеўна**

**Роля аксіду азоту у патагенезе ішэмічных і рэперфузійных пашкод-  
жаннях галаўнога мозгу і абгрунтаванне шляхоў іх карэкцыі**

**Ключавыя словы:** аксід азоту, ішэмія-рэперфузія, L-аргінін, інгібітары сінтазы аксіду азоту, галаўны мозг.

**Аб'ект даследавання:** беспародныя пацукі (1152), ізаляваныя з іх арганізма галаўны мозг, кольца аорты, плазма крыві, трамбацыты, эндатэліяцыты.

**Мэта працы:** выяўленне ролі аксіду азоту (NO), сінтэзаванага нейранальнай, індукаванай і эндатэліяльнай ізаформамі NO-сінтазы ў патагенезе ішэмічных і рэперфузійных пашкоджанняў галаўнога мозгу і абгрунтаванне карэкцыі гэтых пашкоджанняў шляхам селектыўнага удзеяння на актыўнасць ізаформ NO-сінтазы.

**Мэтады даследавання:** фізіялагічныя, біяхімічныя, марфалагічныя, фармакалагічныя.

**Выкарыстаная апаратура:** спектрафотометр (СФ-46), спектрафлюоры-метр F-4010 «Hitachi», сістэма камп'ютэрызаванага аналізу адлюстравання «Bioscan NT», баракамера «ПБК-53», ізаметрычны міёграф («Organ bath», Германія), агрэгометр AP 2110 ЗАО «Солар».

Пры выкарыстанні L-аргініну і селектыўных інгібітараў нейранальнай NO-сінтазы 7-нітро-індазолу і індцыбельнай NO-сінтазы S-метіл-ізатіамачавіны, неселектыўнага інгібітара метылавага эфіру N $\omega$ -нітра-L-аргініну выявлена, што ў раннія і познія перыяды ішэміі і ішэміі-рэперфузіі галаўнога мозгу аксід азоту, сінтэзаваны нейранальнай ізаформай NO-сінтазы, зніжае супрацьгіпаксічную устойлівасць пацукоў, павышае узровень нітрытаў і нітратаў у плазме, павялічвае актыўнасць працэсаў акіслення ліпідаў і зніжае узровень шэрагу антыаксидантаў у плазме і мозгу, павялічвае марфалагічна-функцыянальныя пашкоджання эндатэлія і здольнасць трамбацытаў да агрэгачыі, а ў позні перыяд узмацняе рэакцыі запалення. У позні перыяд развіццё гэтых паталагічных працэсаў у асновным залежыць ад аксіду азоту, сінтэзаванага індукаванай ізаформай NO-сінтазы. Аксід азоту, сінтэзаваны эндатэліяльнай ізаформай NO-сінтазы, зніжае глыбіню ішэмічных і рэперфузійных пашкоджанняў галаўнога мозгу.

Найбольш выразны каррэгіруючы эфект залежных ад аксіду азоту ішэмічных і рэперфузійных пашкоджанняў выявлены пры сумесным выкарыстанні 7-нітро-індазолу, S-метіл-ізатіамачавіны і L-аргініну.

**Галіна прымянення:** навукова-даследчыя лабараторыі, тэарэтычны курс паталагічнай фізіялогіі і біяхіміі ў ВНУ медыка-біялагічнага профілю.

## SUMMARY

**Maksimovich Nataliya Evgenievna**

**Role of nitric oxide in pathogenesis of ischemia and reperfusion of brain and methods of their correction.**

**Key words:** nitric oxide, ischemia, ischemia-reperfusion, L-Arginine, inhibitors of NO-synthasa, brain.

**Study object:** outbred rats (1152), brain, isolated from their organism rings of aorta, plasma, platellets, endothelium.

**Aim of research.** Determine of the role of nitric oxide synthesized by neuronal, inducible and endothelial isoforms of NO-synthasae in the pathogenesis of ischemia and reperfusion of the brain substantiate methods of these damages correction.

**Methods:** physiologic, biochemical, morphologic, pharmacological.

**Devices used:** spectrophotometer (SF-46), fluorospectrophotometer F-4010 «Hitachi», Image analysis system «Bioscan NT», pressure chamber «PB-53», isometric myograph («organ bath», Germany), aggregometer (AP 2110ZAO «Solar».

Having applied L-Arginine and selective inhibitors of neuronal NO-synthase 7-nitro-Indazole and of inducible NO-synthase S-methylisothiourea as well as non-selective of NO-synthasae N $\omega$ -nitro-L-Arginine methyl ester we found out nitric oxide synthesized by neuronal isoform of NO-synthase decreases antihypoxic tolerance of rats to hypoxia, increases the level of nitrites and nitrates in blood plasma, activates oxidative processes in the brain, enhances morpho-functional injuries of endothelium and the ability of platellets to aggregate and decreases the level of antioxidants in plasma and brain in early and late stages of the brain ischemia-reperfusion and it also exacerbates inflammation of the brain. Nitric oxide synthesized by inducible isoform of NO-synthase plays the main role in this pathological injuries at later stage. Nitric oxide synthesized by endothelial isoform of NO-synthase decreases ischemia and reperfusion injuries of brain.

Maximal correcting effect on NO-dependent injuries of the brain was obtained with combined use of 7-nitro-indazole, S-methylisothiourea and L-Arginine.

**Application:** research laboratories, theoretical courses in pathological physiology and biochemistry in higher biomedical schools.