

УДК: 616.831-005.4:546.175)-0929: 616.152.21- 003.923

## ЗНАЧЕНИЕ КОРРИГИРОВАНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В ЛЕЧЕНИИ ОТЕКА ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Н.Е. МАКСИМОВИЧ

Кафедра патофизиологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*В экспериментах у 128 крыс с субтотальной ишемией головного мозга исследовали степень гидратации мозга и активность миелопероксидазы в условиях модуляции пути «L-Аргинин-NO».*

*При использовании L-Аргинина, а также ингибиторов NO-синтазы (NOS): неселективного ингибитора Nω-nitro-L-Arginine Methylester, селективного ингибитора нейрональной NOS 7-nitro-Indazole и селективного ингибитора индуцибельной NOS S-Methylisothiourea установлен NO-зависимый характер изменений степени отека мозга и активности миелопероксидазы в мозговой ткани у крыс с субтотальной ишемией головного мозга. В ранний период ишемии головного мозга повышение степени гидратации мозга и активности миелопероксидазы в мозговой ткани связано с образованием NO при участии нейрональной, а в поздний период – индуцибельной NO-синтазы. Nω-nitro-L-Arginine Methylester, как ингибитор всех изоформ NOS, включая эндотелиальную NOS, обладает противовоспалительными свойствами. L-Аргинин в сочетании с 7-nitro-Indazole и S-Methylisothiourea оказывает наиболее выраженный противовоспалительный эффект. Полученные данные позволяют предположить, что оксид азота, образуемый при участии эндотелиальной NO-синтазы, уменьшает воспаление при ишемии головного мозга у крыс.*

**Ключевые слова:** головной мозг, ишемия, отек мозга, миелопероксидаза, оксид азота.

*In the experiments on 128 rats with subtotal cerebral ischemia the degree of cerebral hydration and the activity of myeloperoxidase have been determined by means of the modulation of L-Arginine - NO pathway.*

*When using L-Arginine and the inhibitors of NO-synthase (NOS): nonselective inhibitor of Nω-nitro-L-Arginine Methylester, a selective inhibitor of neuronal NOS-7-nitro-Indazole and selective inhibitor of inducible NOS-S-Methylisothiourea the NO-dependent nature of changes of brain oedema severity and the activity of myeloperoxidase in the brain tissue of the rats with subtotal cerebral ischemia has been defined. In the early stage of cerebral ischemia the increase of the degree of cerebral hydration as well as the activity of myeloperoxidase in the brain tissue is due to the production of neuronal NO-synthase and in the late stage- inducible NO-synthase. Nω-nitro-L-Arginine Methylester as an inhibitor of all NO-synthase isoforms (including endothelial NO-synthase) possesses antiinflammatory properties. L-Arginine in combination with 7-nitro-Indazole and S-Methylisothiourea produces maximal antiinflammatory effect.*

*Due to the obtained data one can suppose that nitric oxide produced by endothelial NO-synthase decreases the inflammation in cerebral ischemia in rats.*

**Key words:** brain, ischemia, nitric oxide, myeloperoxidase.

Раскрытие патогенеза ишемических инсультов является актуальной проблемой современной медицины. Одним из этапов патогенеза ишемических повреждений головного мозга является воспаление [1, 3, 5, 6, 11]. Вследствие анатомических особенностей расположения мозга в ограниченном пространстве черепной коробки воспалительный процесс при ишемии головного мозга (ИГМ) часто приводит к отрицательным последствиям. В частности, отек мозга приводит к усилению альтерации мозговой ткани и становится одной из непосредственных причин смерти [6].

В связи с этим разработка путей предупреждения и лечения отека головного мозга и других неблагоприятных последствий воспалительного про-

цесса является одним из важных направлений терапии ишемических расстройств мозгового кровообращения.

В настоящее время имеются сведения об участии в воспалительном процессе оксида азота (NO), обладающего как про-, так и противовоспалительными свойствами [9, 13]. Благодаря открытию различных изоформ NO-синтаз (NOS) установлено, что NO, образованный индуцибельной NOS (iNOS), участвует в реализации воспалительных реакций, антиопухолевой защиты, а дефицит экспрессии iNOS способствует этим заболеваниям. [2]. Участие NO в воспалительном процессе связано с его способностью изменять проницаемость сосудов, уменьшать их тонус, модулировать процессы

эмиграции лейкоцитов, регулировать их цитотоксические функции (преимущественно макрофагов), а также влиять на процессы пролиферации и регенерации тканей [2, 10, 13]. Однако в литературе не выявлено сведений о роли NO, образуемого в различных структурах нитроксидергической системы головного мозга (эндотелий сосудов, нейроны, лейкоциты и др.) [2], в реализации таких реакций воспалительного процесса, как экссудация и эмиграция лейкоцитов в ранний и поздний периоды ИГМ, не определена роль различных изоформ NOS в генезе этих реакций на различных стадиях ИГМ. Как известно, степень эмиграции лейкоцитов и степень повреждения мозговой ткани может быть оценена на основании миелопероксидазной активности [16]. В связи с этим, целью работы явилось исследование влияния L-аргинина и различных ингибиторов NOS на развитие отека мозга крыс и его инфильтрации лейкоцитами у крыс с ИГМ и экспериментальное обоснование возможностей лечения отека мозга при его субтотальной ишемии путем коррекции пути «L-Аргинин-NO».

#### Материалы и методы исследований

Исследования выполнены на 128 белых беспородных крысах-самцах массой 220-250 г. ИГМ моделировали путем двухсторонней окклюзии общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг) [10]. Животные каждой из 8 групп (n=16) были разделены на 2 подгруппы (n=8): в первой подгруппе (n=8) забор ткани головного мозга для исследований производили в ранние (через 30 минут), а во второй подгруппе (n=8) - в поздние (через 24 часа) сроки ИГМ.

Крысам первой группы (ложнооперированные крысы, контроль 1) вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl. Крысам второй группы (контроль 2) вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl непосредственно после окклюзии общих сонных артерий. Исследования у крыс остальных 3-8 групп производили в условиях модуляции пути «L-Аргинин-NO». Крысам третьей группы вводили субстрат NOS L-Аргинин (150 мг/кг), крысам четвертой группы - неселективный ингибитор NOS N $\omega$ -nitro-L-Arginine (L-NAME, 5мг/кг), пятой группы - селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы (nNOS) 7-nitro-Indazole (7-NI, 10мг/кг), шестой группы - селективный ингибитор индуцибельной NOS (iNOS) S-Methylisothiourea (S-MT, 1мг/кг), седьмой группы - 7-NI и S-MT, а крысам восьмой группы совместно с 7-NI и S-MT вводили

ли L-Аргинин в аналогичных дозах. Препараты вводили внутривенно непосредственно после окклюзии общих сонных артерий.

Выраженность воспалительного процесса в ткани мозга крыс при его ишемии оценивали по степени отека головного мозга (% гидратации мозга) и по уровню активности миелопероксидазы (АМП) в тканях головного мозга. Степень гидратации мозга (ГМ) или его отека определяли гравиметрически [18]. АМП определяли в супернатанте гомогената мозга путем регистрации кинетики абсорбции в течение 30 сек. при 23°C на спектрофотометре (Beckman) и выражали как скорость абсорбции на 1 мг белка [4]. Также были проведены гистологические исследования. Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

#### Результаты исследований

Изучение степени гидратации мозга и АМП у крыс с ИГМ выявило снижение этих показателей на ранней стадии ишемического процесса во всех изучаемых группах (рис. 1, рис. 2).

У крыс 2-ой группы с субтотальной ИГМ (контроль 2) в ранний период содержание воды в ткани мозга составило  $69,8 \pm 0,30$  %, (в группе контроль 1 –  $70,2 \pm 0,20$  %  $p > 0,05$ ) (рис. 1). АМП в ткани мозга крыс в ранний ишемический период уменьшилась до  $27 \pm 3,2$  мгРт/мин. (контроль 1 –  $62 \pm 1,9$  мгРт/мин.,  $p < 0,001$ ). Изучение содержания воды в

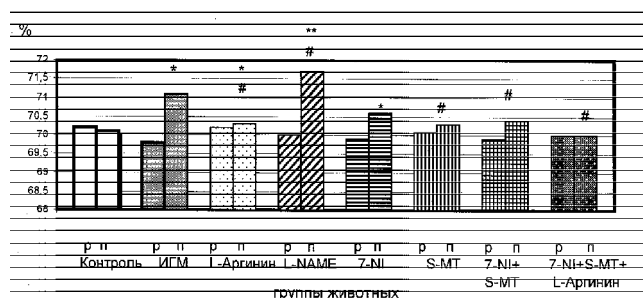


Рис. 1. Содержание воды в ткани мозга крыс с ИГМ при введении модуляторов пути «L-Аргинин - NO»

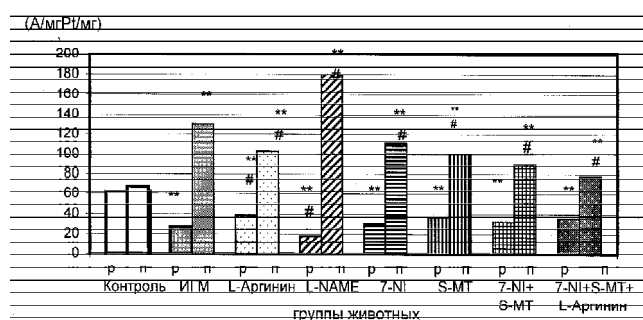


Рис. 2. Активность миелопероксидазы в ткани мозга крыс с ИГМ при введении модуляторов пути «L-Аргинин- NO»

ткани мозга крыс не выявило различий в ранний период по сравнению с группой контроля 1. Из всех вводимых препаратов только введение L-Аргинина способствовало нормализации АМП в ранний ишемический период. В дальнейшем описания будут касаться изменений в поздний период ИГМ. У крыс 2-ой группы с субтотальной ИГМ (контроль 2) в поздний период ГМ увеличилась до  $71,1 \pm 0,24$  % ( $70,2 \pm 0,24$  %,  $p < 0,05$ ). АМП в ткани мозга крыс в поздний период увеличилась до  $130 \pm 7,3$  мгPt/мин. ( $67 \pm 6,9$  мгPt/мин,  $p < 0,001$ ).

Анализ гистологических препаратов мозга подопытных животных данной серии показал, что наиболее выраженные изменения цитоархитектоники мозга формируются в поздний период его ишемии. У крыс с ИГМ наблюдали широкий спектр патологически измененных клеток коры мозга наряду с внешне нормальными клетками. Преобладали дистрофические изменения пирамидных клеток 3-го и 5-го слоев коры, проявлявшиеся в гиперхромии, сморщивании, набухании.

При введении крысам 3-ей группы с ИГМ L-Аргинина содержание воды в ткани мозга в ранний ишемический период составило  $70,2 \pm 0,24$  % ( $p > 0,05$ ). Предполагается, что уменьшение ГМ и увеличение АМП при введении L-Аргинина в ранний период ИГМ связано с улучшением мозгового кровообращения.

В дальнейшем сравнительный анализ изменений изучаемых показателей будет осуществляться между их значениями в каждой из 3-8 групп с результатами во 2-ой группе, а также между значениями показателей в некоторых группах и подгруппах. АМП – уменьшилась до  $103 \pm 10,1$  мгPt/мин. ( $p < 0,05$ ).

При введении крысам 3-ей группы с ИГМ L-Аргинина содержание воды в ткани мозга уменьшилось до  $70,3 \pm 0,16$  % ( $p < 0,05$ ). Предполагается, что нормализующее влияние L-Аргинина в поздний период ИГМ связано с противовоспалительными эффектами образующегося из L-Аргинина NO.

При введении крысам с ИГМ неселективного ингибитора NOS L-NAME (4-ая группа) ГМ увеличилась до  $71,7 \pm 0,14$  % ( $p < 0,05$ ), а также произошло увеличение АМП ( $180 \pm 9,3$  мгPt/мин,  $p < 0,05$ ). Как видно, применение неселективного ингибитора NOS, вызывающего необратимое ингибирование nNOS и eNOS и обратимо ингибирующего iNOS, увеличивает степень ГМ и инфильтрацию ткани мозга лейкоцитами, т.е. пролонгирует воспалительный процесс в ткани мозга крыс с ИГМ.

Введение крысам селективного ингибитора nNOS 7-NI (5-ая группа) привело к снижению ГМ до  $70,4 \pm 0,13$  % ( $p < 0,05$ ) и АМП – до  $105 \pm 6,5$  мгPt/мин ( $p < 0,05$ ). Полученные в данной группе результаты дают основание думать о провоспалительных эффектах NO, образованного nNOS.

Введение крысам 6-ой группы с ИГМ селективного ингибитора iNOS S-MT привело к снижению ГМ (до  $70,3 \pm 0,13$  %,  $p < 0,05$ ) и АМП (до  $100 \pm 10,6$  мгPt/мин,  $p < 0,05$ ). Полученные результаты показали участие iNOS в реализации изучаемых воспалительных реакций в поздний период его субтотальной ишемии. Важно отметить, что содержание воды в ткани мозга в данной группе не отличалось от ее количества в мозговой ткани у крыс при введении L-Аргинина ( $p > 0,05$ ).

Введение крысам с ИГМ обоих селективных ингибиторов нейрональной и индуцибельной NOS – 7-NI и S-MT (7-ая группа) привело к снижению ГМ ( $70,2 \pm 0,20$  %,  $p < 0,05$ ) и АМП ( $90 \pm 9,4$  мгPt/мин.,  $p < 0,05$ ).

Сочетанное введение крысам с ИГМ 7-NI, S-MT и L-Аргинина (8-ая группа), как и в других группах, уменьшило гидратацию мозга ( $70,0 \pm 0,17$  %,  $p < 0,05$ ) и максимально снизило АМП (до  $75 \pm 4,2$  мгPt/мин.,  $p < 0,001$ ), при гистологическом исследовании грубых нарушений цитоархитектоники ткани мозга не выявлено. Это указывает на наиболее эффективный противовоспалительный эффект при ИГМ такого сочетания модуляторов гомеостаза NO.

### Обсуждение полученных результатов

Результаты исследований показали, что у крыс через 24 часа субтотальной двухсторонней окклюзии общих сонных артерий формируется отек и происходит инфильтрация мозговой ткани лейкоцитами. Отсутствие отека и инфильтрации мозга лейкоцитами в ранний период его субтотальной ишемии, по-видимому, является следствием резкого ограничения притока крови к головному мозгу вследствие окклюзии общих сонных артерий. Увеличению гидратации мозговой ткани в поздний ишемический период может способствовать коллапсальное кровообращение и увеличение осмотического давления в ишемическом регионе, а также повышение проницаемости сосудов. Изучение характера воспалительных реакций в ткани мозга при его субтотальной ишемии в условиях модуляции пути «L-Аргинин-NO» выявило их зависимость от образования NO в поздний период ИГМ.

Эксперименты с введением крысам с ИГМ ин-

гибатора nNOS 7-NI выявили уменьшение гидратации мозга и его лейкоцитарной инфильтрации в поздний период его субтотальной ишемии. Введение L-NAME, напротив, увеличивало проявление воспалительных реакций в мозговой ткани в поздний период ИГМ. Учитывая необратимость ингибирующего эффекта L-NAME в отношении обеих конституциональных изоформ NOS (нейрональной и эндотелиальной), а также обратимость ингибирования индуцибельной изоформы NOS, предполагается, что причиной провоспалительного эффекта L-NAME в поздний период ИГМ может быть угнетение эндотелиальной NOS (eNOS) и активация индуцибельной NOS (iNOS).

Эксперименты с введением ингибитора iNOS S-MT выявили уменьшение ГМ и АМП ткани мозга крыс только в поздний период субтотальной ИГМ, что доказывает участие iNOS в патогенезе отека и инфильтрации мозга лейкоцитами в данный период. Важно отметить, что источниками iNOS в ткани мозга являются не только макрофаги, но и эндотелий [14], тромбоциты [6] и нейроны [8]. Выявленные противовоспалительные свойства L-Аргинина могут быть связаны с образованием NO и его антиоксидантными, вазодилаторными, антиагрегационными и антиадгезивными эффектами [9, 19]. Предполагается, что благоприятный эффект L-Аргинина на течение воспалительных реакций обусловлен его косвенным ингибирующим нейрональную и индуцибельную изоформы NOS действием, связанным с усилением коллатерального кровотока, антиоксидантными и противовоспалительными эффектами L-Аргинина.

Таким образом, полученные на основании проведенных исследований с введением модуляторов пути «L-Аргинин-NO» результаты выявили патогенное участие в поздний период воспалительных реакций ИГМ нейрональной и индуцибельной NOS. Предполагается, что NO, образованный eNOS, выполняет противовоспалительную роль, ослабляя выраженность сосудистых и клеточных реакций воспалительного процесса. Исходя из полученных результатов, профилактика и терапия воспалительного процесса при ИГМ должна включать

препараты с селективными механизмами и направлена на угнетение повышенной активности нейрональной и индуцибельной изоформ NO-синтазы и увеличение активности эндотелиальной NOS.

### Литература

1. Гехт А. Б. Ишемический инсульт: вторичная профилактика и основные направления фармакотерапии в восстановительном периоде // Медицинские новости. - 2004. - № 1. - С. 25-30.
2. Максимович Н. Е. Понятие о нитроксидазной системе мозга. Роль нейрональных источников // Ж-л ГрГМУ. - 2003. - № 4. - С. 7-11.
3. Нечипуренко Н. И. Роль оксида азота при ишемии головного мозга // Медицинские новости. - 2004. - № 1. - С. 7-10.
4. Bradley P.P., Priebe D.A., Christensen R.D., et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker // J. Invest. Dermatol. 1982. - V. 78. - P.206-209.
5. Escuret E. Cerebral ischemic cascade // Annales Francaises d Anesthesie et de Reanimation. -1995. -V. 14(1). - P.103-113.
6. Exel E., Gussekloo J., de Craen A. et al. Inflammation and Stroke: The Leiden 85-Plus Study // Stroke. - 2002. - V.33(4). - P. 1135 - 1138.
7. Granger D. N., Kubes P. Nitric oxide as antiinflammatory agent // Methods in Enzymology. - 1996. - V. 269. - P.434 - 442.
8. Heneka M. T., Galea E., Gavriluyk V., et al. Noradrenergic Depletion Potentiates в-Amyloid-Induced Cortical Inflammation: Implications for Alzheimer's Disease // The Journal of Neuroscience. - 2002. - V. 22(7). - P. 2434-2442.
9. Higuchi H., Granger D.N., Saito H., Kurose I. Assay of antioxidant and antiinflammatory activity of nitric oxide in vivo // Methods in Enzymology. - 1999. - V. 301. - P. 424 - 436.
10. Hossman K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia // Cardiovascular Research. -1998. - V.39. - P. 106 -120.
11. Iadecola C., Zhang F., Casey R., Clark H. B., Ross M. E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia // Stroke. - 1996. - 27(8). - P.1373-1380.
12. Kogure K., Yamasaki Y., Matsuo Y., et al. Inflammation of the brain after ischemia // Acta Neurochir. Suppl. Wien. - 1996.-V.66. - P. 40-43.
13. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion // Proc. Natl. Acad. Sci USA. -1991.- V.88. - P.4651-4655.
14. Laroux F.S., Pavlick K.P., Hines I.N. Role of nitric oxide in inflammation // Acta Physiologica Scandinavica. - 2001.- V.173(1). - P.113-118.
15. Langrehr J. M., Hoffman R. A., Lancaster J. R., Simmons R. L. Nitric oxide – a new endogenous immunomodulator // Transplantation. - 1993. - V. 55. - № 6.-P.1205-1212.
16. Matsuo Y., Onodera H., Shiga Y. Et al. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat // Stroke. - 1994. - V. 25. - P. 1469.
17. Mehta J.L., Chen L.Y., Kone B.C., Mehta P., Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets // J. Lab. Clin. Med. -1995.-125.-P.370-377.
18. Pearce M. L., Yamashita J., Beazell J. Measurement of pulmonary edema // Circ. Res. 1965.- V. 16.- p.482-488.
19. Rubanyi G. M., Ho E. H., Cantor E.H., Lumma W. C. Cytoprotective function of nitric oxide: Inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1991. - V. 181. - P.1392-1397.