

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Материалы и методы

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

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

#### Результаты исследования и их Обсуждение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1

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

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

Примечание:

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

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

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

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