

*В.О. КУРОВСЬКА*

*Буковинський державний медичний університет*

## **Оксид азоту та експериментальна ішемія ГОЛОВНОГО МОЗКУ**

Ішемія головного мозку властива для пацієнтів, які перенесли кардіальний напад, шок, асфіксію, комплексне хірургічне втручання на серці, кому, апоплексичний удар, ішемічний інсульт, деліріум і нейрокогнітивне ушкодження [20]. Патогенез ушкодження нейронів за ішемії вивчений достатньо добре [2].

---

© Куровська В.О., 2011

Дії оксиду азоту (NO) як вільного радикалу та його похідних відведена значна роль і у механізмах регуляції мозкових функцій, і у розвитку ішемічного ушкодження [23]. Конкретизація цієї ролі розкриє нові раціональні фармакологічні стратегії, що ґрунтуються на модулюванні продукування NO в постішемічному періоді.

Біологічна тривалість розпаду NO в паренхімних тканинах змінюється в межах 0,09...2 с залежно від концентрації кисню. Як вільний радикал оксид азоту може існувати у трьох формах:  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^-$ ,  $\text{NO}^\cdot$ . Форма, в якій NO вивільняється з клітин і реалізує свої фізіологічні функції, активно дискутується. Однак, завдяки вилученій з нервової тканини синтазі оксиду азоту (NOS), встановлено, що під час реакції утворюється NO, а не  $\text{NO}^-$  чи  $\text{NO}^+$ . Основними реактивними формами оксиду азоту, які при їх надлишковому синтезі *in vivo* призводять до стану нітрозоктивного та оксидативного стресу, є діазоттриоксид і пероксинітрит [5]. Останній є інгібітором мітохондріальних функцій і прооксидантом, ушкоджує ліпіди, білки, ДНК і зумовлює нейрональну загибель [12].

Дія оксиду азоту є захисною чи деструктивною залежно від стадії розвитку ішемічного процесу та його клітинних джерел [21].

Позитивні ефекти NO за мозкової ішемії полягають у зростанні мозкового кровотоку, зменшенні агрегації тромбоцитів, зниженні їх адгезії, гальмуванні течії збудливих нейротрансмітерів усередину нервових клітин. Це пов'язується з функціонуванням ендотеліальної форми синтази (eNOS). Негативні впливи оксиду азоту реалізуються прямими цитотоксичними ефектами NO через зв'язування з залізосірчаними комплексами білків, пригнічення рибонуклеотидредуктази, аконітази, нітрозилування тіолів, ушкодження ферментів мітохондріального дихання та ДНК, а також непрямыми цитотоксичними ефектами, такими, як зростання рівнів пероксинітриту, гідроксил радикалу, діоксиду вуглецю. Ці явища спричинені функціонуванням нейрональної (nNOS) та індукцибельної (iNOS) ізоформ синтази оксиду азоту [20].

Для дослідження ішемічних впливів на мозок часто використовують гіпокамп. Він відіграє важливу роль під час навчання та запам'ятовування, селективно чутливий до ішемії. Модифікація синапсів відбувається після ішемічного ушкодження, відображаючи зміни у синаптичній передачі, що структурно проявляється у формуванні синаптичних міхурців, геометрії постсинаптичної щільності [30].

У дослідженнях із використанням двобічної оклюзії каротидних артерій на 10 хв спробували розмежувати роль eNOS і nNOS за ішемії. Досліджено кінетику церебрального продукування NO та ішемічні зміни в нейронах поля  $\text{CA}_1$  гіпокампа у eNOS і nNOS нокаутних мишей (eNOS<sup>-/-</sup>, nNOS<sup>-/-</sup>) впродовж церебральної ішемії та реперфузії. Рівні  $\text{NO}_3^-$  виявилися нижчими у nNOS<sup>-/-</sup> мишей, ніж у eNOS<sup>-/-</sup> після реперфузії; це свідчить про те, що NO впродовж ішемії та реперфузії походить з nNOS. Хоча вважають, що eNOS-походження NO має нейропротективні ефекти, а nNOS — нейротоксичні, однак NO, що походить і з nNOS і з eNOS, є тією самою молекулою. Таку амбівалентність можна пояснити локалізацією ізоформ синтази оксиду азоту. Однак імунореактивність nNOS ідентифікували у судинних ендотеліальних клітинах, а у nNOS<sup>-/-</sup> мишей eNOS виявилася експресованою у  $\text{CA}_1$  нейронах [26, 29]. Зазначимо, що NO-синтази є найбільш регульованими ферментами організму, очевидно, що і в механізмах їх кодування та синтезу є нерозгадані місця.

Активність NOS залежить від кисню, який за умов ішемії недостатний у необхідній кількості, а після реоксигенації, коли його концентрація різко зростає, NOS стає повноцінною активною. Але швидка доступність  $\text{O}_2$  може перевищити ємність мітохондрій з його утилізації, і звідси посилюється продукування супероксиду, що зумовлює утворен-

ня пероксинітриту [12]. Оксидативна інактивація тетрагідробіоптерину (кофактора NOS) може спричинити стеричне роз'єднання ферменту, що також зумовить появу пероксинітриту [16].

Однак мітохондрії можуть як споживати, так і продукувати NO, а NO стимулювати мітохондріальний біогенезис через цГМФ активацію транскрипційного фактора. З іншого боку, NO може пригнічувати мітохондріальне дихання внаслідок гострого та зворотного інгібування цитохромоксидази та незворотного ушкодження багатьох сайтів через активні форми азоту [14, 23].

В експериментальних дослідженнях донори оксиду азоту проявляють церебросудинний захист після змодельованого інсульту у щурів [32]. Уведення L-аргініну (донора NO) в проміжний період впродовж фокальної ішемії зменшує розмір інфаркту шляхом впливу на мозковий кровотік через дилатацію піальних судин [20]. На моделі неповної глобальної ішемії мозку отримано дані про антиоксидантні ефекти внаслідок введення L-аргініну перед початком реперфузійного періоду [6].

В ішемізованому мозку оксид азоту відіграє важливу роль в авторегуляції мозкового кровотоку [19]. Пацієнти з інсультом чи транзиторною ішемічною атакою в анамнезі мають більшу швидкість церебрального кровотоку у відповідь на введення L-аргініну, ніж пацієнти з серцевосудинними чинниками ризику без первинних цереброваскулярних явищ. При цьому простежується зв'язок між збільшенням реактивності судин внаслідок надходження L-аргініну з первинним інсультом, транзиторною ішемічною атакою і підняттям рівнів фібриногену. Причому це не стосується віку, товщини інтими-медії, гіпертензії, рівнів холестерину. Зростання реактивності L-аргініну є потенційним маркером церебральної ендотеліальної дисфункції [31]. Відповідно для пацієнтів з ішемічним інсультом важливо спрямувати терапію на захист судин [33].

Загалом напрями нейропротекції мозку завдяки впливу оксиду азоту інтенсивно вивчають, і сьогодні вже є певний досвід цієї стратегії.

Як зазначалось, нейрональне вивільнення NO відіграє важливу роль в ішемічній нейротоксичності. Нейропротекція від селективного пригнічення nNOS у гризунів спостерігається в перші 2 год після фокальної церебральної ішемії. Однак пригнічення nNOS не можна застосовувати для людей у гострому періоді інсульту, адже нейрональна NOS відіграє роль у церебральній гіперемічній відповіді на гіпоксію, її пригнічення порушує важливі компенсаторні механізми, а також впливає на інші неврологічні функції, зокрема такі, як синаптична пластичність, нейрональна сигналізація. До того ж, пригнічення nNOS активує нуклеарний фактор  $\kappa\beta$ , що призводить до індукції iNOS, яка опосередковано збільшує тканинне ушкодження [28].

Уведення L-аргініну з затримкою 24 год після розвитку церебральної ішемії призводить до збільшення розміру інфаркту. З цього часу його протективні ефекти втрачаються внаслідок появи в ішемічній пенумбрі третьої ізоформи iNOS — відомої складової відтермінованої загибелі нейронів.

mPINK iNOS визначаються вже після 12 год ішемії, досягаючи піку концентрації через 48 год і тримаються приблизно 7 діб, повертаючись до базальних значень. Аміногуанідин, відносно селективний інгібітор iNOS, показав часо- і дозозалежні нейропротективні ефекти — раннє використання, високі дози, значне зменшення розміру інфаркту. Більше того, на відміну від інших нейропротективних агентів, аміногуанідин нейропротективний навіть після введення з затримкою 24 год після ішемії, бо зменшує розмір інфаркту на 33% [24, 28].

Нейропротекцію спостерігали і при введенні магнію за транзиторної гіпоксії у полях гіпокампа. Магній блокує NMDA рецептори і потенціалзалежні кальцієві канали, регулюючи концентрацію кальцію

всередині клітини й модифікуючи посттравматичні нейрохімічні зміни [18]. Застосування прекодиційних стимулів має для судин захисні ефекти, які ґрунтуються на поєднанні взаємовпливів оксиду азоту та АФК і сприяють розвитку ішемічної толерантності. Прекодиційні стимули експресують нейропротективні гени, поліпшують мітохондріальну функцію і зумовлюють зміни нейротрансмітерів і рецепторів, що збільшує стійкість нейронів і глії до ішемії [25].

Нейропротекція оксидом азоту опосередкована адипонектином, антиапоптичними білками bcl-2, еритропоетином, шаперонами [10, 11, 13, 17]. Якщо в клінічній практиці для відновлення після глобальної ішемії-реперфузії мозку використовувати не стовідсотковий кисень, це також дасть позитивний результат. Постішемичне ушкодження зменшується за нормоксичного оживлення порівняно з гіпероксичним. Після 2 год реперфузії з використанням гіпероксичної вентиляції 3-нітротирозинові плями значно зросли у гіпокампі, а з використанням нормоксичної вентиляції були слабшими порівняно зі зразками, отриманими у гіпероксичних тварин і подібними до зразків умовно-оперованих неішемізованих тварин [27].

Описаний механізм рефлекторної нейрогенної нейропротекції реалізується кисневочутливими симпатозбудливими ретикулоспінальними нейронами. Їхні ефекти спрямовані на збільшення церебрального кровотоку. Шляхи й трансмітери, що реалізують інший захисний механізм, повністю невідомі. Нейропротекція, представлена цією системою, є тривалою і стійкою впродовж двох тижнів і зменшує імунореактивність мозкових мікросудин [15, 24].

У клінічній практиці використовують кровозамінник перфторан — препарат, який здатен переносити кисень; за своєю хімічною природою він належить до перфторвуглеводнів. Існує також багато експериментальних досліджень щодо ефектів перфторану за ішемії-реперфузії. Внутрішньовенне його введення сприяє відновленню діаметра артеріол на етапі реперфузії, запобігаючи постішемичним розладам мікроциркуляції, характеризується збільшенням системного та місцевого кровотоку на тлі зниження загального периферичного опору судин [9, 4]. На моделі неповної глобальної ішемії головного мозку в щурів у спостереженнях за локальним місцевим кровотоком у тим'яній ділянці кори зауважено, що введення перфторану сприяє появі реактивної гіперемії у ранньому реперфузійному періоді [3]. Перфторан, як препарат, не лише переносить кисень, але й володіє властивостями адсорбенту, мембранопротектора. Це підтверджують дані про виражений антиоксидантний ефект, що спостерігався під час його введення за моделювання ішемії головного мозку й полягав у зниженні продуктів перекисного окиснення ліпідів [1].

Ефекти перфторану пов'язують з NO, що пояснює його позитивні впливи, незумовлені газотранспортною функцією. Відповідь криється в уявленнях про міцелярне окиснювальне нітрузування. Розчинність NO і кисню у воді нижча, ніж у більшості менш полярних розчинників, зокрема в ліпідах. Відповідно мембрани клітин, гідрофобні глобули білків, ліпопротеїни та інші гідрофобні фази діють як губки, втягуючи реагенти із водних фаз і концентруючи їх у малому обсязі ліпідів. Це явище і називають міцелярним каталізом [7].

Отже, мікрокраплі емульсії перфторану в крові втягують оксид азоту та кисень і в них окиснюється основна частина NO. Оскільки ці реакції відбуваються у штучній гідрофобній фазі, якою є крапля емульсії, то концентрація NO в навколишній водній фазі першопочатково знижується, що призводить до активації ферментів NO-синтаз. Окрім цього, NO зі "звичайних" гідрофобних фаз (наприклад, холестеринових бляшок) переходить у краплі емульсії, отже, згубний вплив

продуктів окиснення NO на стінки судин зменшується. Побічні ефекти кровозамінників типу перфторану проявляються не одразу. У перші години після введення емульсія стає основним місцем окиснення NO, але через добу процеси зміщуються у природні ліпідні фази організму, в яких розчинились перфторвуглеводні. Отже, вони будуть впливати не тільки на параметри міцелярного окиснення NO, але й інші процеси, такі, як нітрування та нітрузування ліпідів, білків, нуклеїнових кислот [8].

Таким чином, в експериментальних дослідженнях із оксидом азоту необхідно враховувати, що NO екзогенного та ендogenous походження має різні ефекти. Дія вільних радикалів на перший погляд може здатися неузгодженою і спонтанною, але вона має чіткі механізми регуляції, адже у функціонуванні нашого організму немає хаотичності. Це стосується як норми, так і патології. Кожен патогенез має свій механізм, на який ми впливаємо, здійснюючи лікування. Тому важливо не тільки констатувати факт тієї чи іншої дії оксиду азоту, а й розкрити ті механізми, які керують цією молекулою.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ардашева Е.И. Влияние перфторана на процессы перекисного окисления липидов в головном мозге и мягких тканях крыс при тяжелой компрессионной травме / Е.И. Ардашева, П.С. Разумов, С.Г. Долгова // Биомед. журн. — 2004. — Т. 5. — С. 151–153.
2. Бабаян Е.М. Защита мозга от ишемии: состояние проблемы / Е.М. Бабаян // Анестезиология и реаниматология. — 2005. — № 4. — С. 4–14.
3. Влияние перфторана на динамику реперфузионного процесса после глобальной переходящей ишемии головного мозга / В.В. Александрин, В.Л. Кожура, М.С. Новодержкина и др. // Биомед. журн. — 2004. — Т. 5. — С. 252.
4. Влияние перфторана на постшемические расстройства микроциркуляции / Д.А. Басараб, М.И. Тимкина, В.Л. Кожура и др. // Биомед. журн. — 2004. — Т. 5. — С. 126–127.
5. Дмитренко Н.П. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. Токсическое действие оксида азота / Н.П. Дмитренко, А. Холиан // Укр. біохім. журн. — 2005. — Т. 77, № 5. — С. 5–23.
6. Куровська В.О. Перекисне окиснення ліпідів у гіпокампі щурів за умов ішемії-реперфузії головного мозку та введення L-аргініну / В.О. Куровська, І.Р. Тимофійчук // Буковин. мед. вісник. — 2010. — Т. 14, № 1. — С. 124–127.
7. Недоспасов А.А. Биогенные оксиды азота / А.А. Недоспасов, Н.В. Беда // Природа. — 2005. — № 7. — С. 35–42.
8. Недоспасов А.А. “Перфторан”: революционная комбинация / А.А. Недоспасов, Н.В. Беда // Природа. — 2005. — № 8. — С. 33–39.
9. Экспериментальное исследование воздействия перфторана на кровоток / А.А. Орлов, Н.Б. Кармен, И.Э. Лежнева и др. // Биомед. журн. — 2004. — Т. 5. — С. 244–245.
10. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanisms / M. Nishimura, Y. Izumiya, A. Higuchi et al. // Circulation. — 2008. — Vol. 117. — P. 216–223.
11. Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of bcl-2 in transgenic mice / K. Ritagawa, M. Matsumoto, Y. Tsujimoto et al. // Stroke. — 1998. — Vol. 29. — P. 2616–2621.
12. Bolanos J. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia / J. Bolanos, A. Almeida // Biochim. et biophys. acta. — 1999. — Vol. 1411, N. 2–3. — P. 415–436.
13. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways / E. Kilic, V. Kilic, J. Soliz et al. // The FASEB Journ. — 2005. — Vol. 19. — P. 2026–2030.
14. Brown G. Nitric oxide and mitochondria / G. Brown // Front biosci. — 2007. — №12. — P. 1024–1033.
15. Central neurogenic neuroprotection: central neural systems that protect the brain from hypoxia and ischemia. — 1997. — Vol. 835, № 19. — P. 168–186.
16. Chalupsky K. Endothelial dehydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase / K. Chalupsky, H. Car // PNAS. — 2005. — Vol. 102. — P. 9056–9061.
17. Chaperones, protein aggregation and brain protection from hypoxic/ischemic injury / R. Giffard, L. Xu, H. Zhao // J. of experimental biology. — 2004. — Vol. 207, № 6. — P. 3213–3220.
18. Effect of magnesium pre-treatment on the hippocampal NOS activity during long-lasting intermittent hypoxia / K. Jandova, M. Langmeier, D. Maresova et al. // Praque med. report. — 2006. — Vol. 107, № 1. — P. 108–116.
19. Eibeshitz E. The role of nitric oxide in the ischemic brain evaluated by spectroscopic monitoring of mitochondrial NADH, microcirculatory blood flow and HbO<sub>2</sub> / E. Eibeshitz, E. Barbiro-Michaely, A. Mayevsky // Progress in biomedical optics and imaging. — 2008. — Vol.10, № 42. — P. 72801j.1–72801j.10.
20. Harukuni I. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia / I. Harukuni, A. Bhardwaj // Neurologic. clinics.



— 2006. — № 24. — P. 1–21. 21. *Iadecola C.* Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury / *C. Iadecola* // *Trends neurosci.* — 1997. — Vol. 20, № 3. — P. 132–139. 22. *Liu X.* The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning / *X. Liu, R. Sheng, Z. Qin* // *Acta pharmacol. sin.* — 2009. — Vol. 30, № 8. — P. 1071–1090. 23. *Moncada S.* Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration / *S. Moncada, J. Bolanos* // *J. neurochem.* — 2006. — Vol. 97, № 6. — P. 1676–1689. 24. *Neuroprotection* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase after experiment / *C. Gahm, S. Holmin, P. Wikluna et al.* // *J. of neurotrauma.* — 2006. — Vol. 23. — P. 1343–1354. 25. *Neurovascular* protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species / *A. Kunz, L. Park, T. Abe et al.* // *J. of neuroscience.* — 2007. — Vol. 27. — P. 7083–7093. 26. *Nitric oxide* production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and nNOS-knockout mice / *Y. Ito, T. Ohkubo, Y. Asano et al.* // *Current neurovascular research.* — 2010. — № 7. — P. 23–31. 27. *Normoxic* resuscitation after cardiac arrest protects against hippocampal oxidative stress, metabolic dysfunction and neuronal death / *V. Vereczki, E. Martin, R. Rosenthal et al.* // *J. cereb blood flow metab.* — 2006. — Vol. 26, № 6. — P. 821–835. 28. *O'Mahony D.* Nitric oxide in acute ischaemic stroke: a target for neuroprotection / *D. Mahony, M. Kendall* // *J. Neurol. neurosurg psychiatry.* — 1999. — Vol. 67. — P. 1–13. 29. *Species*, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarity discrepancies in nitric oxide dependent synaptic plasticity / *S. Blackshaw, M. Ellasson, A. Sawa et al.* // *Neuroscience.* — 2003. — Vol. 119, № 4. — P. 979–990. 30. *Structural* features of ischemic damage in the hippocampus / *A. Nikonenko, L. Radenovic, P. Andjus et al.* // *Anal. Rec. (Hoboken).* — 2009. — Vol. 292. — № 12. — P. 1914–1921. 31. *Toda N.* Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances / *N. Toda, K. Ayajiki, T. Okamura* // *Pharmacological reviews.* — 2009. — Vol. 61, № 1. — P. 62–97. 32. *Tsuda K.* Neuroprotective effects of leptin and nitric oxide against cerebral ischemia / *K. Tsuda* // *Stroke.* — 2009. — Vol. 40. — P. 406–413. 33. *Vascular* protection in brain ischemia / *M. Rodriguez-Yanez, M. Castellanos, M. Blanco et al.* // *Cerebrovascular diseases.* — 2006. — Vol. 21, S. 2. — P. 21–29.

Стаття надійшла до редколегії 29.07.11

## ОКСИД АЗОТА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИШЕМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В.О. КУРОВСКАЯ

В статье представлены данные экспериментальных исследований участия регуляторной сигнальной молекулы оксида азота при ишемическом повреждении головного мозга. Отмечены моменты его деструктивного влияния и рассмотрены пути нейропротекции оксидом азота через моделирование активности его синтаз, изменение кровотока, влияние эндогенных и экзогенных веществ.

**Ключевые слова:** оксид азота, ишемия, головной мозг.

## NITRIC OXIDE AND EXPERIMENTAL ISCHEMIA OF BRAIN

V. KUROVS'KA

This article presents the data of experimental investigation about participation of nitric oxide regulatory signal molecule under the ischemic damages of brain. The moments of destruction and ways of neuroprotection by nitric oxide through modulation of its synthases activity, changes of blood flow, influence of endogenous and exogenous substances have been noted.

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