

ISSN 2225-6016

# ВЕСТНИК

*Смоленской государственной  
медицинской академии*

*Том 19, №2*

2020



УДК 616.831.31-005.4.-092.913:618.33

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2020:2.5

**ВЛИЯНИЕ L-NAME НА ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС С СУБТОТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ**

© Максимович Н.Е., Бонь Е.И., Троян Э.И.

*Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Республика Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80**Резюме*

**Цель.** Изучение морфофункциональных нарушений нейронов коры головного мозга и изменений прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс с субтотальной ишемией головного мозга в условиях введения ингибитора NO-синтазы L-NAME.

**Методика.** Эксперименты выполнены на 94 белых беспородных крысах: 40 крыс-самок с субтотальной ишемией и введением L-NAME. Животных декапитировали после 60-минутной ишемии. У крыс изучали морфофункциональные изменения нейронов теменной коры и поля CA1 гиппокампа, и показатели окислительного стресса.

**Результаты.** Ишемия головного мозга характеризуется активацией прооксидантных механизмов. Введение L-NAME увеличивает степень окислительного стресса, в условиях которого происходит нарушение клеточного метаболизма и деформация тел нейронов.

**Заключение.** Субтотальная церебральная ишемия приводит к активации оксидативных механизмов и развитию морфофункциональных нарушений коры головного мозга и, введение неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME усугубляло данные нарушения.

*Ключевые слова:* L-NAME, нейроны, ишемия, окислительный стресс

**INFLUENCE OF L-NAME ON CHANGES IN OXIDATIVE STRESS INDICATORS AND MORPHOFUNCTIONAL BRAIN DISORDERS IN RATS WITH SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA**  
Maksimovich N.Ye., Bon E.I., Troyan E.I.*Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic Belarus**Abstract*

**Objective.** Study of morphological and functional disorders of neurons of the cerebral cortex and changes in the prooxidant-antioxidant state in rats with subtotal cerebral ischemia under conditions of administration of an inhibitor of NO synthase L-NAME.

**Methods.** The experiments were performed on 94 white outbred rats: 40 female rats with subtotal cerebral ischemia and the introduction of L-NAME. The animals were decapitated after 60 minutes of ischemia. In rats, morphological and functional changes in the neurons of the parietal cortex and the CA1 field of the hippocampus, and indicators of oxidative stress were studied.

**Results.** Brain ischemia is characterized by the activation of prooxidant mechanisms. The introduction of L-NAME increases the degree of oxidative stress, under which there is a violation of cellular metabolism and deformation of neurons bodies.

**Conclusion.** Subtotal cerebral ischemia leads to the activation of oxidative mechanisms and the development of morphofunctional disorders of the cerebral cortex, and the introduction of a non-selective inhibitor of NO synthase L-NAME exacerbated these disorders.

*Keywords:* L-NAME, neurons, ischemia, oxidative stress

**Введение**

Цереброваскулярные и сердечно-сосудистые заболевания – наиболее актуальная медицинская и социальная проблема в мире. Ежегодно 450 тыс. человек переносят инсульты, из которых 75-80% имеют ишемическую природу. Ишемия головного мозга (ИГМ) приводит к целому ряду общих и

локальных метаболических и функциональных нарушений, патогенез которых сложен и до конца не изучен [8, 9]. Имеются сведения об участии оксидативного стресса в патогенезе ИГМ. На сегодняшний день сформировалось общее представление о про- и антиоксидантной системе организма. Дисбаланс между отдельными звеньями этой системы приводит к гиперпродукции кислородных радикалов и к повреждению тканей [5].

Активные формы кислорода (АФК) имеют важное значение в жизнедеятельности головного мозга. Кислородные радикалы выполняют функции мессенджера, отвечая за нейрональную активность, регулируют мозговой кровоток, апоптоз и другие важные процессы функционирования головного мозга. Показано, что проведение нервного импульса также сопряжено с возникновением свободно-радикальных форм фосфолипидов. Однако избыток АФК проявляется токсичностью, индуцированием апоптоза и некроза нейронов [13]. В развитии окислительного стресса наряду с АФК могут принимать участие активные формы азота (АФА), образование которых происходит из NO-молекулы, выполняющей в головном мозге ряд важных функций [7].

Известно, что оксид азота (NO) является молекулой со свободно-радикальными свойствами, в связи с чем он способен проявлять как анти-, так и прооксидантные свойства [5-7, 13]. Ранее проведенными исследованиями показана неоднозначная роль NO и изменения активности NO-синтазы в патогенезе ишемических повреждений головного мозга. Эффекты NO зависят от его концентрации, источника образования, стадии ишемического процесса, и ряда других факторов [5-7, 13, 14].

Данные о влиянии введения неселективного ингибитора NO-синтазы N $\omega$ -nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) в патогенезе ишемических повреждений головного мозга противоречивы. По данным некоторых авторов, однократное его применение вызывало защитный эффект, в то время как другими исследователями установлено отрицательное влияние L-NAME при ИГМ [14, 15].

Цель работы – изучение морфофункциональных нарушений нейронов коры головного мозга и изменений прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс с субтотальной ишемией головного мозга в условиях введения ингибитора NO-синтазы L-NAME.

## Методика

Эксперименты выполнены на 94 белых беспородных крысах: 40 крыс-самок с субтотальной ИГМ и введением L-NAME. Контролировались температурный, световой и шумовой режимы. При выполнении экспериментов руководствовались принципами гуманного отношения к животным. Оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной анальгезии в соответствии с этическими нормами, рекомендованными комиссией по гуманному обращению с экспериментальными животными (приказ ректора УО ГрГМУ от 27.12.2006 г. №125) [4].

Оперативные вмешательства осуществляли в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг) [2]. Контрольную группу (группа 1) составили ложнооперированные крысы, которым производился разрез кожи и внутривенно вводили изотонический раствор NaCl (0,5 мл). Субтотальную ИГМ (группа 2, опыт 1) моделировали перевязкой обеих общих сонных артерий (ОСА) с введением 0,5 мл 0,85% NaCl. Крысам второй опытной группы (группа 3, опыт 2 ИГМ+L-NAME) кроме перевязки ОСА вводили неселективный ингибитор NO-синтазы – L-NAME в дозе 5 мг/кг в 0,5 мл 0,85% NaCl непосредственно перед перевязкой. Животных декапитировали после 60-минутной ишемии.

У крыс изучали морфофункциональные изменения нейронов теменной коры и поля CA1 гиппокампа, и показатели окислительного стресса. Для морфометрического и гистохимического исследования после декапитации животных быстро извлекали головной мозг, кусочки переднего отдела коры больших полушарий фиксировали в жидкости Карнуа или замораживали в жидком азоте. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля и на выявление рибонуклеопротеинов по Эйнарсону. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Локализацию теменной коры и коры гиппокампа в гистологических препаратах мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [12]. У каждого животного оценивали не менее 30 нейронов пятого слоя париетальной коры и пирамидного слоя поля CA1 гиппокампа, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа. В парафиновых срезах определяли количество больших пирамидных нейронов на единицу площади срезов коры ГМ. Среди общего количества различали клетки по интенсивности окраски цитоплазмы (хроматофилии): нормохромные – умеренно окрашенные, гиперхромные – темные, гиперхромные

сморщенные – очень темные, с деформированными перикарионами, гипохромные – светло окрашенные и клетки-тени – почти прозрачные. Подсчитывали количество клеток каждого типа на 1 мм<sup>2</sup> ткани мозга. Для изучения размеров и формы перикарионов нейронов измеряли их площадь, форм-фактор и фактор элонгации.

В срезах толщиной 10 мкм, изготовленных в криостате Leica CM 1840, Германия (-12°C), в нейронах пятого слоя теменной коры и пирамидального слоя поля СА<sub>1</sub> гиппокампа определяли активность дегидрогеназ: восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида НАДН (НАДН-ДГ: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.93.3; по Нахласу и др., 1958), сукцината (СДГ: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1; по Нахласу и др., 1957), глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф-ДГ, D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.49; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958), лактата (ЛДГ; L = лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс и др., 1958) и кислой фосфатазы (КФ, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2; по Гомори, 1950).

НАДН-ДГ – фермент, участвующий в переносе электронов с НАДН на убихинон, СДГ – ключевой фермент аэробного окисления сукцината в митохондриях, Г-6-Ф-ДГ – немитохондриальный фермент пентозофосфатного пути, ЛДГ – фермент анаэробного гликолиза, КФ – маркерный фермент лизосом.

Прооксидантно-антиоксидантное состояние определяли в гомогенатах головного мозга. Осуществляли определение показателей перекисного окисления липидов: продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) и показателей антиоксидантной защиты: восстановленного глутатиона (GSH), общих сульфогрупп (TSH), активности глутатионпероксидазы.

Метод определения содержания ТБКРС основан на реакции альдегидных продуктов перекисного окисления липидов, прежде всего, малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой, образующей при высокой температуре и низком рН триметилловый комплекс, состоящий из двух молекул тиобарбитуровой кислоты и одной молекулы МДА. Согласно методике, к исследуемому образцу 10%-го гомогената головного мозга (0,3 мл) последовательно добавляли 2,4 мл 0,07 N p-ра серной и 0,3 мл 10% p-ра фосфорновольфрамовой кислот. К дважды отмытому, растворенному в 3,0 мл бидистиллированной воды осадку, добавляли 1 мл 0,85%-го водного раствора тиобарбитуровой кислоты, растворенной в уксусной кислоте. Цветная реакция протекала в герметически закрытых пробирках при температуре 96°C в течение 60 мин. После их охлаждения в воде в течение 5 мин. определяли оптическую плотность отцентрифугированного супернатанта на спектрофотометре «PV 1251С» при длинах волн 532 нм и 580 нм. Расчет концентрации МДА проводили по следующей формуле:

$$\text{МДА} = \frac{(E_{532} - E_{580})}{0,156} \cdot \text{ч К},$$

, где E – экстинкция при соответствующих длинах волн; V<sub>1</sub> – объем раствора тиобарбитуровой кислоты (1,0 мл); V<sub>2</sub> – объем исследуемого образца (0,3 мл); К – коэффициент разведения образца головного мозга (147,7)

Определение концентрации восстановленного глутатиона (GSH). Как известно, GSH обладает антиоксидантной активностью. Определение GSH осуществляли спектрофотометрически (коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). В чистую пробирку наливали 1 мл 15% гомогената головного мозга, добавляли 0,2 мл 25% ТХУ, встряхивали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5-ти мин. К полученному супернатанту (0,2 мл) добавляли 1,2 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,8) и 50 мкл реактива Элмана. Концентрацию GSH рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции путем определения оптической плотности исследуемых образцов при  $\lambda = 412 \text{ нм}$  на спектрофотометре «PV 1251С».

Определение концентрации общих сульфогрупп, TSH осуществляли путем добавления 30 мкл 3%-го раствора натриевой соли додецилсульфата к 60 мкл гомогената головного мозга. Затем к 25 мкл отобранной в чистую пробирку (эпиндорф) полученной смеси добавляли 1,2 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,8) и 50 мкл реактива Элмана. Концентрацию TSH рассчитывали после определения оптической плотности на спектрофотометре «PV 1251С» при  $\lambda = 412 \text{ нм}$  с учетом коэффициента молярной экстинкции после 10-минутной инкубации смеси при комнатной температуре.

Измерение активности глутатионпероксидазы. Глутатионпероксидаза восстанавливает водородные молекулы, а также липидные и другие органические молекулы, окисленные радикалами кислорода. Брали 0,8 мл Трис-НСl буфера (рН 7,25), содержащего 0,012 М азида натрия, 0,001М ЭДТА и 4,8mM GSH. После 3-х минутного прогревания при 37°C добавляли 0,1 мл 20 mM трет-бутилгидропероксида (т-БГП) и инкубировали 10 мин. при температуре 37°C. После

этого отбирали 0,1 мл образца и добавляли 0,02 мл 25% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Аналогичная процедура проводилась для получения нулевой точки сразу же после добавления т-БПП. После добавления ТХУ пробы центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин. Для спектрофотометрии к 1 мл фосфатного буфера (рН 7,8) добавляли 30 мкл полученного супернатанта головного мозга и 30 мкл реактива Элмана. Активность фермента выражали в ммольях GSH/л<sup>-1</sup>х мин<sup>-1</sup>.

Статистические методы после предварительной проверки на нормальность распределения показателей полученные данные анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Результаты представлены в виде Me(LQ;UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между показателями контрольной и опытной групп считали достоверными при  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test) [1].

## Результаты исследования и их обсуждение

Изучение морфофункциональных нарушений головного мозга. При морфометрии нейронов теменной коры и гиппокампа в группе «опыт 1» выявлено значительное уменьшение площади их перикарионов – на 53% ( $p < 0,05$ ) и 49% ( $p < 0,05$ ), увеличивалась вытянутость тел нейронов на 20% ( $p < 0,05$ ) в каждом из отделов коры, уменьшалась их округлость на – 11% ( $p < 0,05$ ) и 22% ( $p < 0,05$ ), соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Размеры и форма перикарионов нейронов теменной коры и гиппокампа крыс, у крыс с субтотальной ИГМ (1 ч.) и введении L-NAME, Me (LQ; UQ)

Группы животных	Зоны коры головного мозга	
	теменная кора	гиппокамп
	площадь, мкм <sup>2</sup>	
Контроль	145(130;154)	109(100;122)
ИГМ	69(67;74)*	56(55;57)*
ИГМ+L-NAME	69 (59;79)*	52(38;58)*
	форм-фактор, ед.	
Контроль	0,9(0,9;0,9)	0,9(0,9;0,9)
ИГМ	0,8(0,8;0,8)*	0,7(0,7;0,8)*
ИГМ+L-NAME	0,7(0,6;0,7)*+	0,8(0,8;0,8)*
	фактор элонгации, ед.	
Контроль	1,2(1,1;1,3)	1,2(1,1;1,3)
ИГМ	1,5(1,4;1,5)*	1,5(1,4;1,6)*
ИГМ+L-NAME	1,7(1,5;1,8)*	1,7(1,6;1,8)*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «контроль», + –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «ИГМ», ИГМ – ишемия головного мозга, L-NAME – N<sup>o</sup>-нитро-L-аргинин

Предполагается, что данные изменения размеров и формы нейронов обусловлены водно-электролитными нарушениями, а также денатурацией белка. В группе ИГМ+L-NAME в теменной коре происходило еще более существенное уменьшение форм-фактора – на 22% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой «опыт 1». По сравнению с показателями контрольной группы, в теменной коре площадь нейронов уменьшилась на 52% ( $p < 0,05$ ), форм фактор – на 22% ( $p < 0,05$ ), а фактор элонгации увеличился на 29% ( $p < 0,05$ ). В гиппокампе изменений выявлено не было, а по сравнению с показателями в группе «контроль» происходило уменьшение площади на 52%, форм фактора – на 11% ( $p < 0,05$ ) и увеличение фактора элонгации на 29% ( $p < 0,05$ ). У крыс контрольной группы на гистологических препаратах, окрашенных по методу Ниссля, преобладали нормохромные нейроны (рис. 1).

У животных группы ИГМ отмечалось уменьшение количества нормохромных нейронов и увеличение количества гиперхромных нейронов, а также дегенеративных форм – гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней как в теменной коре, так и в гиппокампе (табл. 2). В теменной коре количество гиперхромных нейронов увеличилось на 79% ( $p < 0,05$ ), гиперхромных сморщенных клеток – на 80% ( $p < 0,05$ ), клеток-теней – на 67% ( $p < 0,05$ ). В гиппокампе отмечалось увеличение количества гиперхромных нейронов на 77% ( $p < 0,05$ ), гиперхромных сморщенных клеток – на 80% ( $p < 0,05$ ), клеток-теней – на 67% ( $p < 0,05$ ), по сравнению с показателями в контрольной группе.

У животных группы (ИГМ+L-NAME) наблюдалось уменьшение количества гиперхромных нейронов в теменной коре (на 22%,  $p < 0,05$ ) и увеличение количества гиперхромных сморщенных нейронов (на 17%,  $p < 0,05$ ), по сравнению с группой «опыт 1» (ИГМ), а по сравнению с группой «контроль» происходило уменьшение количества нормохромных нейронов на 40% ( $p < 0,05$ ), увеличение количества гиперхромных – на 73% ( $p < 0,05$ ), гиперхромных сморщенных – на 83% ( $p < 0,05$ ) и клеток-теней – на 67% ( $p < 0,05$ ). В гиппокампе изменений по сравнению с группой опыт 1 выявлено не было ( $p > 0,05$ ), а по сравнению с группой контроль отмечалось уменьшение количества нормохромных нейронов на 31% ( $p < 0,05$ ), увеличение количества гиперхромных нейронов – на 79% ( $p < 0,05$ ), гиперхромных сморщенных – на 82% ( $p < 0,05$ ) и клеток-теней – на 67% ( $p < 0,05$ ). При этом отмечалось значительное увеличение содержания рибонуклеопротеинов по сравнению со значениями в контроле в теменной коре на 45% ( $p < 0,05$ ) и в гиппокампе – на 37% ( $p < 0,05$ ) в группе ИГМ и на 47% ( $p < 0,05$ ) и 40% ( $p < 0,05$ ) в группе ИГМ+L-NAME (табл. 3).

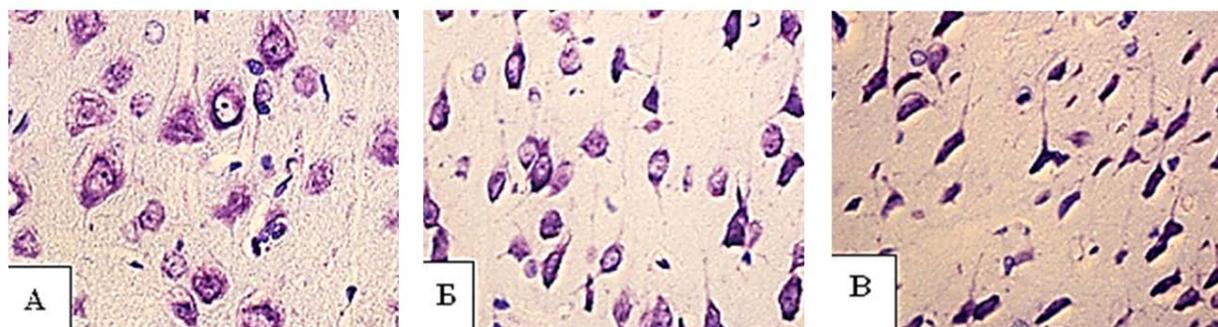


Рис. 1 Нейроны пятого слоя теменной коры. А – контроль (преобладают нормохромные нейроны). Б – ИГМ (преобладают гиперхромные нейроны). В – ИГМ+L-NAME (преобладают гиперхромные сморщенные нейроны) Цифровая микрофотография. Окраска по Нисслю. Ув. Ч40

Таблица 2. Количество разных форм нейронов теменной коры и гиппокампа крыс на 1 мм<sup>2</sup>, у крыс с субтотальной ИГМ) и введении L-NAME, Me (LQ; UQ)

Группы животных	Зоны коры головного мозга	
	теменная кора	гиппокамп
нормохромные нейроны		
Контроль	3208(3178;3245)	3003(2989;1945)
ИГМ	1932(1920;1945)*	2062(2009;2298)*
ИГМ+L-NAME	1928(1910;1960)*	2075(2004;2345)*
гиперхромные нейроны		
Контроль	201(201;268)	167(134;201)
ИГМ	938(804;938)*	737(670;938)*
ИГМ+L-NAME	737(670;737)*+	807(807;874)*
гиперхромные сморщенные нейроны		
Контроль	134(67;134)	134(0;134)
ИГМ	670(670;670)*	670(670;670)*
ИГМ+L-NAME	806(806;806) <sup>+</sup>	739(672;807)*
гипохромные нейроны		
Контроль	335(268;335)	201(134;268)
ИГМ	368(335;402)	368(268;469)
ИГМ+L-NAME	404 (269;538)	269(269;404)
клетки-тени		
Контроль	134(0;134)	134(134;134)
ИГМ	404(269;404)*	402(269;402)*
ИГМ+L-NAME	404(269;404)*	404(269;404)*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «контроль», + –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «ИГМ», ИГМ – ишемия головного мозга, L-NAME – N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинин

У крыс с ИГМ в цитоплазме нейронов пятого слоя теменной коры головного мозга отмечалось уменьшение активности НАДН-ДГ (фермента, участвующего в переносе электронов с НАДН на убихинон) на 24% ( $p < 0,05$ ) и пирамидного слоя поля CA<sub>1</sub> гиппокампа на – 23%, ( $p < 0,05$ ),

активности маркерного фермента митохондрий СДГ: на 39% – в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 30% – в гиппокампе ( $p < 0,05$ ), фермента пентозофосфатного пути Г-6-Ф-ДГ: на 31% – в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 23% – в гиппокампе ( $p < 0,05$ ), увеличение активности фермента анаэробного гликолиза ЛДГ: на 22% – в теменной коре и гиппокампе ( $p < 0,05$ ) и маркерного фермента лизосом КФ: на 31% – в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 23% – в гиппокампе ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3. Содержание рибонуклеопротеинов в цитоплазме нейронов теменной коры и гиппокампа крыс, у крыс с субтотальной ИГМ и введении L-NAME в единицах оптической плотности, Me (LQ; UQ)

Группы животных	Зоны коры головного мозга	
	теменная кора	гиппокамп
Контроль	0,16 (0,13;0,17)	0,17 (0,15;0,18)
ИГМ	0,29 (0,27;0,3)*	0,27 (0,25;0,28)*
ИГМ+L-NAME	0,3 (0,25;0,33)*	0,28 (0,23;0,31)*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «контроль», + –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «ИГМ», ИГМ – ишемия головного мозга, L-NAME – N $\omega$ -нитро-L-аргинин

После введения L-NAME в цитоплазме нейронов теменной коры наблюдалось уменьшение активности НАДН-ДГ на 25%, по сравнению со значениями у крыс с ИГМ без введения ингибитора NO-синтазы (группа опыт 1),  $p < 0,05$  (рис. 2, табл. 4).

Таблица 4. Активность ферментов в теменной коре и гиппокампе у крыс с ИГМ и введении L-NAME, в единицах оптической плотности, Me (LQ; UQ)

Группы	Отделы коры головного мозга	
	теменная кора	гиппокамп
НАДН-ДГ		
Контроль	0,21 (0,20; 0,26)	0,22 (0,19; 0,26)
ИГМ	0,16 (0,15; 0,18)*	0,17 (0,16; 0,18)*
ИГМ+L-NAME	0,12 (0,11; 0,13)**	0,16 (0,15; 0,17)*
СДГ		
Контроль	0,18 (0,16; 0,19)	0,17 (0,16; 0,18)
ИГМ	0,11(0,1; 0,12)*	0,12 (0,11; 0,13)*
ИГМ+L-NAME	0,09(0,08; 0,10)*+	0,12 (0,10; 0,14)*
Г-6-Ф-ДГ		
Контроль	0,23 (0,22; 0,25)	0,22 (0,2; 0,24)
ИГМ	0,16 (0,13; 0,19)*	0,17 (0,16; 0,18)*
ИГМ+L-NAME	0,16 (0,15; 0,17)*	0,16 (0,15; 0,17)*
ЛДГ		
Контроль	0,11 (0,10; 0,13)	0,14 (0,13; 0,15)
ИГМ	0,14 (0,13; 0,15)*	0,18 (0,17; 0,19)*
ИГМ+L-NAME	0,14 (0,13; 0,15)*	0,18 (0,17; 0,19)*
КФ		
Контроль	0,22 (0,20; 0,24)	0,24 (0,20; 0,25)
ИГМ	0,32 (0,30; 0,35)*	0,31 (0,30; 0,39)
ИГМ+L-NAME	0,30 (0,28; 0,32)*	0,30 (0,27; 0,33)*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «контроль», + –  $p < 0,05$  -по отношению к значениям в группе «ИГМ», ИГМ – ишемия головного мозга, L-NAME – N $\omega$ -нитро-L-аргинин, НАДН-ДГ – никотинамиддинуклеотиддегидрогеназа, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, Г-6-Ф-ДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, КФ – кислая фосфатаза

Определение прооксидантно-оксидантного состояния в гомогенатах головного мозга выявило следующие изменения концентрации показателей его характеризующих (табл. 5). В первой опытной группе с ИГМ отмечали уменьшение показателей неферментативных механизмов защиты: концентрации восстановленного глутатиона (GSH) на 11% ( $p < 0,05$ ), общих SH-групп белков и глутатиона (TSH) – на 16% ( $p < 0,05$ ) и повышение активности глутатионпероксидазы – на 24% ( $p < 0,05$ ), отражающей высокую напряженность ферментативных механизмов. При введении L-NAME отмечалось усугубление активности окислительного стресса: происходило дальнейшее уменьшение [GSH] и увеличение активности глутатионпероксидазы.

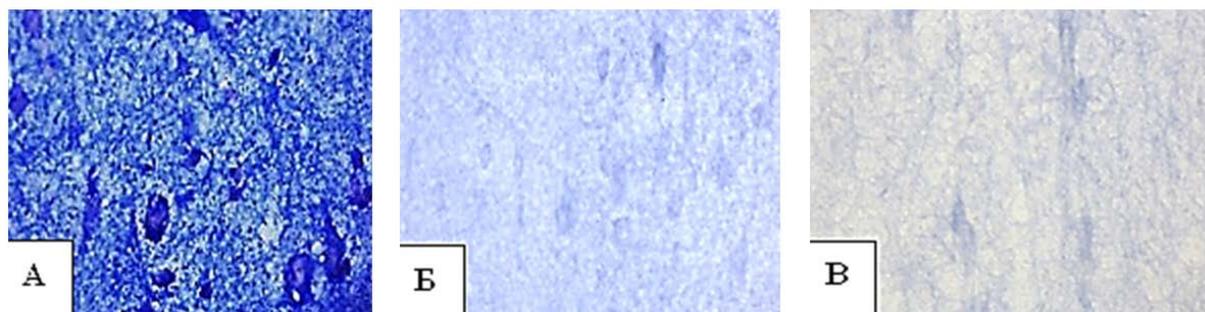


Рис. 2-Активность НАДН-ДГ в нейронах 5-го слоя теменной коры мозга крыс. А – контроль, Б – ИГМ, В – ИГМ+L-NAME Цифровая микрофотография. Ув. Ч400

Таблица 5. Показатели-маркеры прооксидантно-антиоксидантного состояния, Ме (LQ; UQ)

Группы	TSH, ммоль/л	GSH, ммоль/л	ГП, ммоль GSH/ минЧл	МДА, мкмоль/л
Контроль	2,78(2,63;2,92)	1,89 (1,76; 2,01)	62,8(59,2; 64,3)	122,6(105,7;132,4)
ИГМ	2,34(2,09;2,58)*	1,68(1,43;1,92)*	78,2(75,6;81,3)*	153,9(141,8;156,7)*
ИГМ+L-NAME	2,46(2,11;2,57)*	1,54(1,38; 1,63)*	88,1(86,7;92,3)**	148,4(142,3;152,7)*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «контроль», + –  $p < 0,05$  по отношению к значениям в группе «ИГМ», ИГМ – ишемия головного мозга, L-NAME – N $\omega$ -нитро-L-аргинин, GSH – восстановленный глутатион, TSH – общие сульфогруппы, ГП – активность глутатионпероксидазы, МДА – малоновый диальдегид

Ишемия головного мозга характеризуется активацией прооксидантных механизмов в ткани головного мозга. Введение неселективного ингибитора NO-синтазы – L-NAME, увеличивает степень окислительного стресса. Данный эффект при введении L-NAME, может быть обусловлен усугублением ишемии вследствие ингибирования NOS и повышением содержания супероксиданиона. В условиях окислительного стресса происходит нарушение клеточного метаболизма и деформация тел нейронов, что приводит к водно-электролитному дисбалансу, проявляющемуся сморщиванием и отечностью нейронов [3, 11]. Окислительный стресс запускает определенный «метаболический каскад» взаимосвязанных патологических реакций, необратимо повреждающих нейроны. Важную роль в механизмах оксидативного повреждения нейронов играют нарушения митохондрий и увеличение внутриклеточного  $[Ca^{2+}]_i$ , в результате чего происходит активация ферментов, ведущих к дезорганизации метаболизма, повышению проницаемости плазматической мембраны и развитию выявленных морфологических изменений: уменьшению размеров перикарионов и их деформации, появлению гиперхромных сморщенных нейронов [8-11]. Гиперхромные нейроны часто расцениваются в качестве маркеров ишемии. Причиной гиперхромии нейронов также может явиться денатурация белка и рибонуклеопротеинов, что увеличивает способность клетки воспринимать краситель.

В цитоплазме нейронов происходит снижение активности маркерных ферментов митохондрий: НАДН-ДГ – фермента, участвующего в переносе электронов с НАДН на убихинон и являющегося важным связующим звеном между циклом Кребса и электронно-транспортной цепью, СДГ – ключевого фермента аэробного окисления сукцината в митохондриях, а также внемитохондриального фермента Г-6-Ф-ДГ, связанного с пентозофосфатным путем. Происходит компенсаторное возрастание активности ЛДГ как показателя анаэробного гликолиза, и маркерного фермента лизосом КФ, отражающего возрастание процесса аутофагии, направленного на удаление поврежденных мембран и органелл в нейронах. Изменения активности ферментов (НАДН-ДГ, СДГ, Г-6-Ф-ДГ, ЛДГ и маркерного фермента лизосом КФ) свидетельствуют о нарушении энергетического обмена нейронов теменной коры и гиппокампа, что ведет к энергетическому дефициту, снижению их функциональной активности и гибели. В большей степени нарушения выражены в теменной коре, нейроны которой более чувствительны к недостатку кислорода. Введение L-NAME крысам с ИГМ способствует активации ПОД, что вследствие нарушения мембран, в том числе митохондриальных, может приводить к нарушению их энергетической функции вследствие разобщения процессов окисления и фосфорилирования [6, 7].

## Вывод

Субтотальная церебральная ишемия приводит к активации оксидативных механизмов и развитию морфофункциональных нарушений коры головного мозга и, введение неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME усугубляло данные нарушения.

## Литература (references)

- 1 Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных: учебно-методическое пособие. – Минск.: Институт подготовки научных кадров Национальной Академии Наук Беларуси – 2008. – 235 с. [Batin N.V. *Komp'yuternyy statisticheskiy analiz dannykh*. Computer statistical data analysis: proc. method. allowance. – Minsk: Institute for the Training of Scientific Personnel of the National Academy of Sciences of Belarus, 2008. – 235 p. (in Russian)]
- 2 Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга // Биомедицина. – 2018. – №2. – С. 59-71. [Bon' Ye.I., Maksimovich N.E. *Biomedicina*. Biomeditsina. – 2018. – N2. – P. 59-71. (in Russian)]
- 3 Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Темные нейроны мозга // Морфология. – 2017. – №6. – С. 81-86. [Bon E.I., Zimatkin S.M. *Morfologia*. Morphology. – 2017. – N6. – P. 81-86. (in Russian)]
- 4 Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. – М.: Профиль-2С. – 2010, 241 с. [Karkishchenko N.N., Gracheva S.V. *Rukovodstvo po laboratornym zhitvotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh*. Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical research. – Moscow: Profil-2S, 2010. – 241 p. (in Russian)]
- 5 Максимович Н.Е. Роль оксида азота в генезе повреждений мозга при оксидативном стрессе // Вестн. НАН Беларуси. Сер. мед. Навук. – 2004. – №2. – С. 112-117. [Maksimovich N. E. *Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya medicinskih nauk*. News Of the national Academy of Sciences of Belarus. – 2004. – N2. – P. 112-117. (in Russian)]
- 6 Максимович Н.Е. Понятие о нитроксидергической системе мозга. Роль нейрональных источников // Журнал ГрГМУ/ Н.Е. Максимович // 2003. – №4. – С. 7-11. [Maksimovich N.E. *Zhurnal Grodnenskiy gosudarstvennyy medicinskiy universitet*. Journal of Grodno state medical University. – 2003. – N4. – P. 7-11. (in Russian)]
- 7 Максимович Н. Е. Понятие о нитроксидергической системе мозга. Роль экстранейрональных источников // Журнал ГрГМУ // 2004. – №1. – С. 3-5. [Maksimovich N.E. *Zhurnal Grodnenskiy gosudarstvennyy medicinskiy universitet*. Journal of Grodno state medical University. – 2004. – №1. – P. 3-5. (in Russian)]
- 8 Матвеев А.Г. Феномен цитотоксичности и механизмы повреждения нейронов новой коры при гипоксии и ишемии // Тихоокеанский медицинский журнал / Pacific Medical Journal. – 2004. – №2. – С. 18-23. [Matveev A.G. *Tihookeanskiy medicinskiy zhurnal*. Pacific Medical Journal. – 2004. – N2. – P. 18-23. (in Russian)]
- 9 Arundine M., Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity // Cell Calcium. – 2003. – N34. – P. 325-337.
- 10 Bon L.I., Maksimovich N.E., Zimatkin S.M. Effects of experimental cerebral ischemia on metabolic characteristics of parietal cortex neurons // Bioprocess Engineering. – 2018. – N2. – P. 1-5.
- 11 Gallyas F., Pal J., Bukovics P. Supravital microwave experiments support that the formation of "dark" neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system // Brain Research. – 2009. – N1270. – P. 152-156.
- 12 Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. – Academic Press, Australia, 1998. – 242 p.
- 13 Romano A.D., Serviddio G., de Matthaëis A., Bellanti F., Vendemiale G. Oxidative stress and aging // Journal Nephrology. – 2010. – N15. – P. 29-33.
- 14 Yuan S., Kevil C.G. Nitric oxide and hydrogen sulfide regulation of ischemic vascular remodeling // Microcirculation. – 2016. – N23(2). – P. 134-45.
- 15 Zhang J., Han Y., Wang Y. et al. Neuronal nitric oxide synthase inhibition reduces brain damage by promoting collateral recruitment in a cerebral hypoxia-ischemia mice model // Medical Pharmacology Science. – 2018. – N22(10). – P. 3166-3172.

## Информация об авторах

Максимович Наталья Евгеньевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: mne@grsmu.by

Бонь Елизавета Игоревна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: asphodela@list.ru

Троян Элина Ивановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: elina8560@mail.ru