ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И
СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОУ ДПО ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ИНСТИТУТ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ

В.И. ГОРБАЧЁВ

В.В. КОВАЛЁВ

# НАРУШЕНИЯ НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Иркутск – 2006

УДК 616.831-
001+577.128
ББК 56.127.708
Г 67

Рецензенты: Кондратьев Анатолий Николаевич – д-р мед. наук, проф., руководитель отделения анестезиологии и реаниматологии Российского нейрохирургического института им. проф. А.Л.Поленова

Сороковиков Владимир Алексеевич – д-р мед. наук, зам. директора центра РВХ ВСНЦ СО РАМН, директор НИИТО.

**Горбачев В.И., Ковалёв В.В.**

**Г 67** Нарушения нитроксидергической системы при травматическом повреждении головного мозга. - Монография: РИО ИГИУВа, 2006. - 158 с.
ISBN 5-89786-037-8

В монографии обобщены современные представления о биологических эффектах оксида азота и его роли в патогенезе тяжелой черепно-мозговой травмы. Представлена разработанная авторами технология прямого определения уровня оксида азота методом электрохимического окисления в биологических жидкостях организма. Дана количественная характеристика содержания метаболитов оксида азота в крови и цереброспинальной жидкости в условиях нормы и патологии. Представлены результаты изучения нарушений в нитроксидергической системе с учетом тяжести черепно-мозговой травмы, характера повреждения головного мозга и интенсивности субарахноидальной геморрагии. Изучены изменения системной гемодинамики, транскапиллярного обмена, динамика неврологического статуса в остром периоде травматической болезни головного мозга и дано патогенетическое обоснование возможности оценки тяжести, течения черепно-мозговой травмы и прогнозирование её исхода на основе мониторинга нитроксидергической системы.

Предназначена для анестезиологов-реаниматологов, нейрохирургов, биохимиков, патофизиологов.

ББК 56.127.708

© Горбачев В.И., Ковалёв В.В., 2006

**ISBN 5-89786-037-8**

# СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление
АДдиаст – диастолическое артериальное давление
АДсист – систолическое артериальное давление
АТФ – аденозинтрифосфат
БАВ – биологически активные вещества
ВАК – возбуждающие аминокислоты
ВМГ – внутримозговая гематома
ВМОК – внутримозговой объём крови
ВЧГ – внутричерепная гипертензия
ВЧД – внутричерепное давление
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГКС – группа клинического сравнения
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЭТК - диэтилтиокарбамат
ИВЛ – искусственная вентиляция лёгких
ИОС – индекс очаговой симптоматики
КОД – коллоидно-онкотическое давление
КТ – компьютерная томография
ЛПС - липополисахариды
МК – мозговой кровоток
МОК – минутный объём кровообращения
НГ – нитроглицерин
ОПСС – общее периферическое сосудистое сопротивление
ОЦК – объём циркулирующей крови
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РПД – редуцированное пульсовое давление
САГ – субарахноидальная геморрагия
САД – среднее артериальное давление
СДГ – субдуральная гематома
СИ – сердечный индекс
СКД – среднее капиллярное давление
СОД - супероксиддисмутаза
УГМ – ушиб головного мозга
УИ – ударный индекс

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
ЦПД – церебральное перфузионное давление
ЦСЖ – цереброспинальная жидкость
ЧМТ – черепно-мозговая травма
ШИГ – шкала исходов Глазго
ШКГ – шкала ком Глазго
ЭДГ – эпидуральная гематома
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
CaM - кальмодулин
EDRF - «endothelium derived relaxing factor», эндотелиальный расслабляющий фактор сосудов
GC – стеклоуглеродный электрод
Hb – гемоглобин
NO – оксид азота
NOS – синтаза оксида азота (eNOS – эндотелиальная, nNOS – нейрональная, iNOS – индуцибельная изоформы синтаз)

# ВВЕДЕНИЕ

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) – одно из наиболее частых и тяжёлых травматических повреждений, на её долю приходится от 25 до 40% всех травм. Ежегодно в Российской федерации до 4 человек на 1000 населения получают черепно-мозговую травму, а абсолютное число пострадавших составляет не менее 600 тысяч человек. Летальность при всех видах ЧМТ составляет 4,3%, прогрессивно возрастает по мере увеличения тяжести травмы и достигает при тяжёлой степени 40-70% [Коновалов А.Н., 1998; Лебедев В.В., 2000]. Обычно страдают активные люди трудоспособного возраста (20-55 лет), причём мужчины чаще, чем женщины (2:1).

В связи с высокой частотой распространения, степенью летальности и инвалидизации пациентов, черепно-мозговая травма является не только медицинской, но и социальной проблемой, однако процессы, лежащие в основе нарушений мозгового кровотока и механизмы повреждений нервных клеток до конца не исследованы. Они обусловлены не только прямым травматическим воздействием, но и определяются вторичными факторами, среди которых важную роль играют развивающиеся ишемические осложнения, а также влияние «агрессивных» медиаторов, что приводит к ухудшению течения и прогноза острой нейрохирургической патологии [Вахницкая В.В., 2001; Крылов В.В., 2001; Царенко С.В., 2004; Taneda M., 1996]. Благодаря сложной системе ауторегуляции, мозговой кровоток в определенной мере независим от системной гемодинамики, страдая только при значительных колебаниях артериального давления, однако патогенетические аспекты их нарушений связаны общими механизмами контроля этих процессов.

В последние годы особенно большое значение уделяется изучению эндотелийзависимых механизмов регуляции тонуса сосудов, которые, влияя на местный сосудистый тонус, участ-

вуют в формировании системных гемодинамических реакций. Эндотелий представляет собой конечное звено нейрогенной и гуморальной регуляции сосудистого тонуса, где эта реакция реализуется на клеточном уровне и моделирует внутриклеточные биохимические процессы. Вазоактивные факторы, секретируемые эндотелием, оказывают наиболее важное влияние на тонус сосудов и мозговое кровообращение [Гомазков О.А., 1999; Rongen G.A., 1994; Haller H. et al., 1997; Lusher T.F., 1997].

Экспериментальные исследования и литературные данные, посвящённые этой проблеме, часто носят противоречивый характер. Это связано со сложным патогенезом цереброваскулярных нарушений и многофакторным механизмом ауторегуляции сосудистого тонуса, в основе которого лежит баланс между констрикторными и релаксирующими субстанциями, вырабатываемыми эндотелием, клетками крови, железами внутренней секреции и рядом других тканей под динамическим контролем ЦНС и механизмов обратной связи.

Изучение оксида азота как биомолекулы началось с 50-60-х годов прошлого века, когда физиологи проявили интерес к механизмам, лежащим в основе явления «рабочей гиперемии», в частности, рассматривая нитросоединения как возможный регулятор этого процесса. В 60-80-х годах в ходе исследования природы эндотелиального фактора релаксации сосудов («endothelium derived relaxing factor», EDRF) было установлено, что EDRF выделяется эндотелиальными клетками в ответ на введение некоторых соединений (например, ацетилхолина, брадикинина и др.) и вызывает расслабление гладких мышц сосудов. Осмысление роли эндогенного оксида азота было связано с изучением физиологических, фармакологических и токсических свойств нитратов и нитритов, возможность эндогенного образования которых была доказана только в 1983 г. Более того, оказалось, что концентрации последних резко повышаются при воспалительных процессах. Исследования в области сосудистой физиологии, патофизиологии, фармакологии и иммунологии показали, что оксид азота обладает широким спектром биорегуляторного действия **(табл. 1)**.

*Таблица 1*

**Хронология открытия эндогенного оксида азота**

| Год | | Авторы |
|---|---|---|
| 1879 | Нитроглицерин-кардиологическое средство | Маррелл |
| 1916 | С мочой у млекопитающих выводится больше нитрата, чем поступает с пищей | Митчелл, Шонли, Гриндлей |
| 1975 | Ингаляция NO вызывает образование детектируемого ЭПР-комплекса с гемом, быстро исчезающего после ингаляции | Ода, Кусумото, Накаима |
| 1977 | Механизм сосудорасширяющего действия нитратов: активация гуанилатциклазы | Арнольд, Миттал, Кацуки, Мурад |
| 1978 | В крови людей постоянно присутствует NO | Фриман, Диер |
| 1978 | Эндогенный нитрит образует Fe-содержащие комплексы в печени, а введение $Fe^{2+}$ увеличивает их выход | Ванин, Киладзе, Кубрина |
| 1979 | Ингаляция NO вызывает появление нитрита и нитрата в моче | Йошида, Касама, Китабаке |
| 1980 | Эндотелиальные клетки аорты образуют EDRF, вызывающий вазорелаксацию | Фарчготт, Завадский |
| 1985 | Нитрат и нитрит синтезируют макрофаги | Стьюер, Марлетта |
| 1987 | Синтез нитрата происходит из аминокислоты L-аргинина | Гиббс, Ваврин, Таинтор |
| 1987 | Действие EDRF связано с синтезом NO | Пальмер, Игнарро |

К такому выводу привели результаты ведущихся на протяжении многих лет работ по четырем главным направлениям. Это – изучение природы вырабатываемого эндотелием релаксирующего фактора сосудов; механизма так называемой неадренергической, нехолинергической регуляции (NANC); иммуногенной цитотоксичности макрофагов и, наконец, метаболизма давно известных вазодилататорных нитратов. Имевшая место в начале 80–х годов «конвергенция» исследований в отмеченных направлениях привела к открытию уникальных свойств оксида азота в качестве биорегулятора.

В 1987 г. две независимые группы зарубежных исследователей (Furchgott R.F. et al., Ignarro L. et al.) на основе сравнительного изучения физиологических и физико-химических свойств пришли к заключению, что EDRF идентичен NO. Этот вывод позднее был подтверждён в ряде работ других авторов.

Следует отметить, что в настоящее время не все ученые согласны с выводом о тождественности EDRF и NO. В процессе изучения EDRF было выяснено, что последний в дозовом отношении (по количеству обнаруживаемого NO) на порядок эффективнее, чем свободный оксид азота. В связи с этим было высказано мнение, что EDRF представляет собой некое нитрозосоединение, типа S-нитрозоцистеина либо динитрозильных комплексов железа, способных защитить входящий в их состав NO от окисления и высвобождать его при контакте с гладкомышечными клетками [Ванин А.Ф., 1998]. Точная структура этого соединения пока не установлена. Однако практически все исследователи признают, что активным вазодилатирующим компонентом EDRF является оксид азота. Открытие у NO вазорелаксирующих свойств послужило мощным стимулом для резкой интенсификации исследований различных аспектов функциональной активности этого соединения. Рост числа научных публикаций был столь стремительным, что уже в 1992 г. редколлегия журнала «Science» объявила оксид азота «молекулой года». Доказательством широкого признания исключительной важности исследований явилось решение Шведской академии наук о присуждении Нобелевской премии по медицине 12 октября 1998 г. американским ученым Роберту Фарчготу (R.F.Furchgott), Фриду Мьюрэду (F.Murad) и Луису Игнарро (L.Ignarro) за открытие функциональной активности оксида азота в кардиоваскулярной системе[1].

[1] Таким образом, замкнулся интересный исторический круг. Дело в том, что основатель этой престижной награды Альфред Нобель обеспечил ее финансовую сторону открытием динамита, активным началом которого является нитроглицерин, а исследования биологического действия этого соединения оценены Нобелевской премией. Курьезное обстоятельство заключается в том, что незадолго до смерти Нобелю, страдав-

Многочисленные исследования биологической роли NO привели к тому, что в теоретической медицине появилось новое направление, именуемое NO-физиологией, которое занимается исследованием роли этого вещества в тех или иных жизненных процессах, изучением их тонких механизмов и клинических проявлений, конструированием новых лекарственных препаратов.

Учитывая важную биорегуляторную роль оксида азота в организме, нарушения в нитроксидергической системе являются ключевым звеном в патогенезе эндотелиальной дисфункции, которую рассматривают как дисбаланс между медиаторами, обеспечивающими в норме течение всех эндотелий-зависимых процессов. В качестве одного из важнейших трансмиттеров центральной нервной системы, оксид азота может оказывать не только цитопротективное, но и токсическое воздействие на мозговую ткань, вызывая дополнительное её повреждение [Акмаев И.Г., 1998; Голиков П.П., 2003; Hunley T.E. et al., 1995; Dalkara T., 1994].

Функции оксида азота в ЦНС чрезвычайно многообразны: он контролирует активность нейронов, является медиатором ноцицепции, термогенеза, обоняния, регулирует выход нейромедиаторов, играет важную роль в процессах долгосрочной потенциации и, соответственно, обучения и памяти [Викторов И.В, 2000; Раевский К.С. и др., 2000]. С помощью оксида азота осуществляется синаптическая передача от пре- к постсинаптическому нейрону, воздействие на клетки глии и окружающие нейроны. В физиологических условиях NO защищает головной мозг от ишемических и нейротоксических воздействий, тогда как в условиях патологии может усиливать деструктивные процессы в головном мозге. Оксид азота также

---

шему болями в сердце, врачи прописали нитроглицерин, терапевтическое действие которого было только что обнаружено. Великий меценат отказался поверить в целебность взрывчатки и категорически отверг рекомендацию врачей. Налицо интересное переплетение открытий, направленных, с одной стороны, на уничтожение человека и, с другой – на спасение его жизни.

участвует в передаче нервного импульса по эфферентным волокнам.

В ответ на механическую травму головного мозга возникает совокупность патологических процессов, закономерно изменяющихся во времени, взаимодействующих между собой и укладывающихся в понятие «болезни повреждённого мозга» [Старченко А.А., 1999; Хлуновский А.Н., 1999]. В их основе лежат особенности эволюционно сложившихся реакций центральной нервной системы на травматическое воздействие. Общебиологические закономерности ответа на повреждение в мозге, как и в любом другом органе, проявляются, с одной стороны, универсально, с другой – соответственно своеобразию его строения и функции и носят адаптивный характер.

Развитие ишемии мозговой ткани, являющейся одной из основных причин вторичного её повреждения, возникает в результате как непосредственного размножения мозга, так и за счёт посттравматического вазоспазма и приводит к резкому снижению или исключению интегративной функции головного мозга, и как следствие, к дисфункции всех органов и систем организма [Greene K.A. et al., 1997, Беляевский А.Д., 2000]. Возникающие при этом не просто патологические сдвиги, а порочные круги приводят к развитию более выраженной и стойкой гипоксии как всего организма, так и мозга – так называемый «гипоксический порочный круг», вызывая прогредиентное течение посттравматического периода. Наличие зачастую множественных внутричерепных повреждений, сочетающихся с массивной субарахноидальной геморрагией, способствуют возникновению ряда патологических процессов, характерных для острого периода тяжёлой ЧМТ и обусловливают особенности патогенеза первичного ответа организма на травму и вариабельность клинических её проявлений.

Однако в отечественных и зарубежных публикациях последних лет, посвящённых изучению патогенетических аспектов черепно-мозговой травмы, роль нитроксидергической системы представлена недостаточно. Относительно небольшое количество исследований затрагивает изучение баланса эндотелий-зависимых медиаторов в условиях гипоксии и ишемии

мозговой ткани, при нетравматических субарахноидальных кровоизлияниях, а также на различных моделях церебрального вазоспазма в экспериментальных работах. Для расширения представлений о клеточных и медиаторных механизмах повреждения нервных клеток необходимо изучение нарушений, развивающихся в звене нитроксидергической регуляции при патологии центральной нервной системы травматического генеза.

# ГЛАВА 1.
# ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ОРГАНИЗМЕ

## 1.1. Физико-химические и биологические свойства NO

В свободном состоянии NO представляет собой бесцветный, невоспламеняющийся, липофильный газ с молекулярной массой 30,006 Д. По своей химической природе NO является свободным радикалом, имеющим неспаренный электрон на внешней π-орбитали, что придаёт ему высокую реакционную способность.

Оксид азота легко реагирует с другими соединениями, содержащими неспаренные электроны – $O_2$, $O_2^-$ (супероксидный радикал), некоторыми ионами металлов и др. Поэтому в реальных условиях in vivo время, за которое концентрация NO снижается в 2 раза ($T_{0,5}$), сильно зависит от природы окружающих соединений и их концентрации. При очень низких концентрациях $O_2$ оксид азота способен диффундировать от места генерации на десятки сантиметров [Козлов И.А., 1997; Реутов В.П., 1999; Keefer L.K., 1996]. При повышении концентраций NO и $O_2$ величина $T_{0,5}$ резко снижается. Аналогичное явление наблюдается в присутствии оксигемоглобина, когда $T_{0,5}$ для NO сокращается до ~ 5 с. Однако и за столь короткое время оксид азота успевает диффундировать на расстояние, равное нескольким клеточным диаметрам, и выполнить функцию трансмиттера [Koppenol W.H., 1996; Marletta M.A., 1993].

В крови оксид азота практически мгновенно связывается с гемоглобином, благодаря чему время нахождения в кровотоке сведено к минимуму. Сродство гемоглобина к NO в тысячи раз превышает его сродство к $O_2$. При взаимодействии NO с оксигемоглобином ($HbO_2$) образуются метгемоглобин ($Hb^{Fe3+}$) и анионы $NO_3^-$, а при взаимодействии с восстановленным Hb –

нитрозилгемоглобин (HbNO) и $NO_3^-$. Последние выводятся почками, их клиренс составляет 20 мл/мин. $Hb^{Fe3+}$ подвергается обратной трансформации в Hb за счет механизмов эндогенной детоксикации. В соединении с Hb NO может транспортироваться на значительные расстояния, вступая в обменные процессы в различных органах и тканях [Романова Т.А., 2001].

Растворимость оксида азота в воде выше, чем у кислорода, и насыщенный водный раствор NO при 37°С и ионной силе 0,15М имеет молярную концентрацию 1,55мМ. В гидрофобных средах NO растворяется лучше, чем в воде. Коэффициент распределения в системе I-этанол/вода для NO равен 6,5.

Коэффициент диффузии оксида азота в воде при 37°С равен $4,8*10^{-5}см^2*с^{-1}$. Коэффициент диффузии NO из эндотелиальных клеток в клетки мышечной ткани аорты и ткани мозга составляет при 37°С $3,3*10^{-5}$ и $3,8*10^{-5}см^2*с^{-1}$ соответственно [Tirtilli A., 1998]. Клеточные мембраны лишь незначительно замедляют диффузию оксида азота.

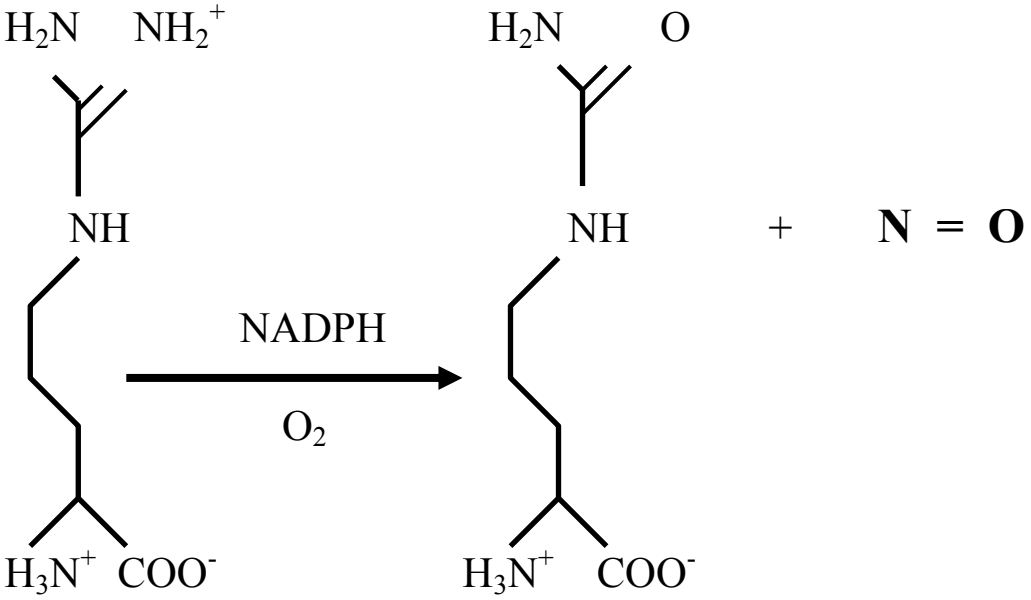
Кроме того, оксид азота способен вступать в окислительно–восстановительные реакции, образуя многочисленные азотсодержащие соединения, в которых валентность атома азота может изменяться от -3 до +6 (аммиак $NH_3$, гидразин $NH_2NH_2$, гидроксиламин $NH_2OH$, свободный азот $N_2$, закись азота $N_2O$, азотноватистая кислота $H_2N_2O_2$, трехокись азота $N_2O_3$, азотистая кислота $HNO_2$, двуокись азота $NO_2$, четырехокись азота $N_2O_4$, пятиокись азота $N_2O_5$, азотная кислота $HNO_3$, шестиокись азота $N_2O_6$ и др.).

Концентрация газообразных NO и $NO_2$ измеряется в специальных единицах, определяющих количество молекул соединения на миллион (ppm) и биллион (ppb) молекул других газов. В естественных условиях содержание NO в атмосфере колеблется от 10 до 100 ppb и является побочным продуктом ряда промышленных производств, а также входит в состав выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания. Избыточная концентрация оксида азота в окружающем воздухе является маркером загрязнения окружающей среды и привлекает пристальное внимание экологов.

## 1.2. Синтез и биотрансформация оксида азота в организме человека

Синтез оксида азота катализируется группой металлоферментов – синтаз оксида азота, или NO-синтаз (NOS), достаточно селективных по своему субстрату. Синтез NO может происходить лишь из L–аргинина, L–гомоаргинина, $N^G$–метил–L–аргинина. NO–синтазы окисляют аминогруппу в гуанидиновом остатке этой аминокислоты, в результате чего высвобождается оксид азота, а аргинин превращается в цитруллин. Цитруллин затем вновь рециклируется, пополняя внутриклеточные запасы аргинина.

Предполагаемая суммарная реакция выглядит следующим образом [Cooke J.P. et al., 1997]:




**L – аргинин** **L – цитруллин** **Оксид азота**

Для активности NOS необходимы шесть основных кофакторов и простетических групп: тиолсвязанный гем, флавинадениндинуклеотид (ФАД), флавинмононуклеотид (ФМН), $Ca^{2+}$/кальмодулин и ($6^R$) 5,6,7,8- тетрагидро-L-биоптерин ($BH_4$). Шестой кофактор - ион цинка выполняет скорее структурную функцию. Хотя многие из перечисленных кофакторов широко представлены в ферментах, катализирующих окисли-

тельно-восстановительные реакции, синтаза оксида азота является единственным ферментом, который одновременно использует все шесть кофакторов.

В организме выделены 3 изоформы NO–синтаз: эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS), индуцибельная (iNOS). Соответствующие гены картированы в геноме человека на 7, 12, и 17-й хромосомах. eNOS и nNOS - конститутивные ферменты, которые всегда присутствуют в тканях, даже и в неактивной форме. Активируясь, ферменты связывают ионы кальция и кальмодулин (CaM), осуществляя, таким образом, регуляцию многочисленных клеточных процессов. iNOS в норме не экспрессируется в клетках, ее синтез запускается в ответ на различные токсические и опосредующие процесс воспаления соединения – токсины, цитокины, активные формы кислорода. Активность nNOS и eNOS (конститутивных форм NOS) регулируется ионами $Ca^{2+}$ с участием кальмодулина. В то же время, с индуцибельной формой CaM связан столь прочно, что добавление $Ca^{2+}$ не требуется для активации фермента, а регуляция активности iNOS осуществляется на уровне экспрессии белка. Как правило, NO–синтазами в тканях поддерживается постоянный уровень NO [Гервазиев Ю.В., 1999; Меньщикова Е.Б., 2000; Nathan C., 1994; Wang Y. et al., 1995].

Все NO–синтазы являются гомодимерами, субъединицы которых имеют несколько обособленных структурно-функциональных участков (доменов) – оксидазный, редуктазный и $Ca^{2+}$/кальмодулинсвязывающий. Система $Ca^{2+}$-CaM ответственна за перенос электронов между редуктазным и оксигеназным доменами NOS. Молекула кальмодулина обладает гантелеобразной структурой с двумя долями, каждая из которых содержит два $Ca^{2+}$-связывающих участка. Связывание четырех ионов $Ca^{2+}$ вызывает смещения α-спиралей в каждой доле, при этом угол между ними значительно изменяется. В результате на поверхности молекулы кальмодулина выступают два гидрофобных участка, богатых метионином, по одному на каждой доле. Эти районы и являются ответственными за связывание белка-мишени. В двух субъединицах iNOS взаимодействуют оксигеназные домены, формируя димер, редуктазные же доме-

ны не взаимодействуют друг с другом. В конститутивных формах (eNOS и nNOS) показано взаимодействие и редуктазных доменов.

Изолированные редуктазные домены NOS содержат FAD и FMN и являются мономерными. Если рядом содержится соседний кальмодулинсвязывающий домен, они каталитически компетентны и осуществляют такой же $Ca^{2+}$-CaM – зависимый перенос электронов от NADPH на цитохром С и другие акцепторы электронов, и могут катализировать перенос электронов от NADPH на изолированный оксигеназный домен NO-синтазы. Оксигеназный домен содержит участки связывания для гема, L-аргинина и биоптерина. В отличие от редуктазного домена индуцибельной синтазы, оксигеназный домен её является димерным, но не активным. Однако его активность восстанавливается в присутствии NADPH и редуктазного домена. Промежуточный кальмодулинсвязывающий домен вариабелен и характеризуется изоморфной специфичностью. При этом различия между кальмодулинсвязывающими доменами являются главной причиной функциональных свойств различных изоформ NOS, хотя аминокислотные последовательности в С-концевой половине домена индуцибельной NOS также вносят вклад в аффинность $Ca^{2+}$-CaM [Горрен А.К. и др., 1998].

Сложная структурная организация NO–синтаз и многофакторная природа активности создают уникальные возможности для регуляции каталитического действия ферментов на различных уровнях. Кальмодулин придаёт ферменту NOS конформационное состояние, необходимое для внутреннего переноса электронов. Он абсолютно необходим для переноса электронов от редуктазного на оксигеназный домен, т.е. на гем, кроме этого, он сильно стимулирует перенос электронов в редуктазном домене **(рис. 1)**.

Эндотелиальная NO - синтаза обнаружена в эндотелии всех сосудов, в сердце (эндокарде и миокарде) и в тромбоцитах. В физиологических условиях её активность регулируется ионами $Ca^{2+}$ и активируется такими агонистами $Ca^{2+}$ как ацетилхолин и брадикинин. Одним из механизмов активации eNOS может быть фосфорилирование фермента или ассоции-

рованного с ним белка. Локализация её в плазматической мембране, аппарате Гольджи или клеточных кавеолах регулируется посттрансляционной модификацией фермента – миристоилированием/пальмитированием в районе N – конца.

Хотя эндотелиальную NO – синтазу относят к конституциональным изоформам, уровень её генной экспрессии может изменяться в ответ на некоторые факторы и при патологических состояниях. Так, эстрогены, цГМФ, основной фактор роста фибробластов, реперфузия после ишемии стимулируют, а окисленные липопротеиды низкой плотности, гипоксия, фактор некроза опухоли, липополисахариды, напротив, подавляют экспрессию этого фермента. Оксид азота сам участвует в регуляции экспрессии гена эндотелиальной NO- синтазы через механизм обратной связи.

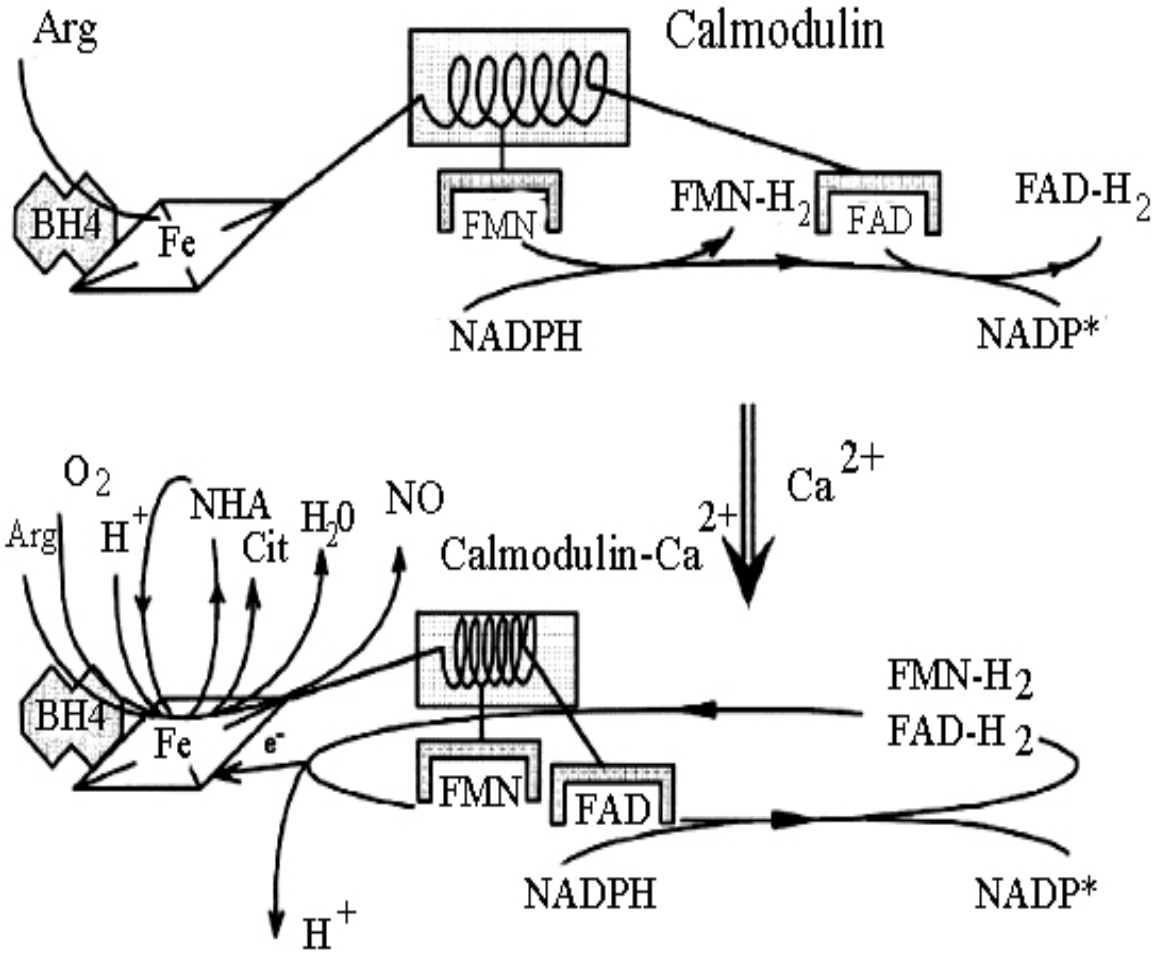



**Рис. 1. Активация системы $Ca^{2+}$-CaM (по А.А. Недоспасову)**

Вторая конституциональная форма синтазы оксида азота – нейрональная, экспрессирована в нейронах, где активность её также регулируется градиентами $Ca^{2+}$. Продуцируемый благодаря этому ферменту NO является важным нейротрансмиттером, он также играет большую роль в регуляции мозгового кровообращения. Установлено, что метаболическая активность работающего нейрона может быть сбалансирована им самим путем высвобождения NO. Будучи свободным радикалом, нитроксид выделяется всей поверхностью тела нейрона и его отростков. При этом, во-первых, тесный дендрососудистый контакт обеспечивает рецепцию изменений сосудистого тонуса, а во-вторых, обусловливает сосудодвигательный эффект. Располагаясь среди проекционных аксонов, нитроксидергические нейроны получают информацию о функциональной активности соответствующих участков мозга, и, выделяя оксид азота, оказывают влияние на локальный кровоток в пределах работающего модуля [Семченко В.В., 1999; Chabrier P.E., 1992].

В отличие от эндотелиальной и нейрональной NO- синтаз, которые экспрессированы конституционально, индуцированная («макрофагальная», «иммунологическая») изоформа NO – синтазы не представлена в нормальных клетках в обычных состояниях. Но в ответ на ряд факторов экспрессия фермента происходит во многих типах клеток, включая эндотелиоциты и миоциты сосудов, в течение нескольких часов. Индуцированная NO – синтаза продуцирует большее количество оксида азота, чем конституциональные формы. В отличие от eNOS и nNOS, активность iNOS не регулируется уровнем внутриклеточного кальция [Fostermann U. et al., 1991], хотя iNOS и содержит в своем составе крепко связанный кальмодулин [Xie E. et al., 1992]. iNOS играет ведущую патофизиологическую роль в реализации цитотоксических функций активированных макрофагов [Blaylock M.G., 1998; Nathan C., 1992]. Активированные макрофаги могут производить количества NO на несколько порядков большие, чем способны клетки эндотелия сосудов. Основная функция NO, вырабатываемого макрофагами, - цитотоксическое действие против клеток – мишеней (опухолевые клетки, бактерии, вирусы и др.). Цитотоксический механизм

действия NO представляется в виде взаимодействия между NO и железом, содержащимся в различных ферментах, отвечающих за митохондриальные функции и пролиферацию клеток, что приводит к цитостатическому и разрушающему клетки эффектам. Оксид азота также может взаимодействовать с местно вырабатывающимся супероксид – анионом, образуя пероксинитрит – анион, вызывающий повреждение тканей.

Flemming J. и соавт. (1996) полагают, что в гладких миоцитах кровеносных сосудов главную роль играет именно iNOS, а не ее конституциональные изоформы. Такие факторы, как липополисахарид, интерлейкин-1β, интерферон-γ, фактор некроза опухоли α вызывают экспрессию индуцированной NO – синтазы, а интерлейкин-4, интерлейкин-10, трансформирующий фактор роста β, основной фактор роста фибробластов, альдостерон подавляют её. Важно, что 5`- область гена индуцированной NO– синтазы содержит чувствительный к гипоксии элемент и поэтому его экспрессия в эндотелии может модулироваться уровнем кровотока.

Синтез NO с участием различных форм NO – синтаз является доминирующим, но не единственным путем его генерации in vivo. В литературе описаны несколько NOS – независимых путей образования NO. Среди них можно указать биотрансформацию нитрита в NO в условиях тканевого ацидоза, реакцию между аргинином и $H_2O_2$ с образованием NO и катализируемое ксантиноксидазой восстановление $NO_2^-$ в NO в условиях гипоксии. Этот механизм начинает активно действовать в условиях дефицита кислорода, когда гемсодержащие белки переходят в дезоксиформу и приобретают способность восстанавливать нитриты в NO. L – аргинин в условиях гипоксии перестает быть единственным источником NO. Поэтому клеткам при гипоксии нет необходимости запускать расточительные в энергетическом и структурном отношениях реакции с использованием свободного или включенного в состав биопептидов L–аргинина для синтеза NO **(рис. 2)**.

По мнению Реутова В.П. (1998), в клетках живых организмов существует цикл окиси азота, который можно рассматривать как первое звено защиты клеток от избытка NO и повы-

шенного содержания активированных форм кислорода, в то время как ферментативные и неферментативные системы защиты, по-видимому, выполняют функцию дополнительного механизма инактивации свободнорадикальных соединений, образующихся в процессе метаболизма.

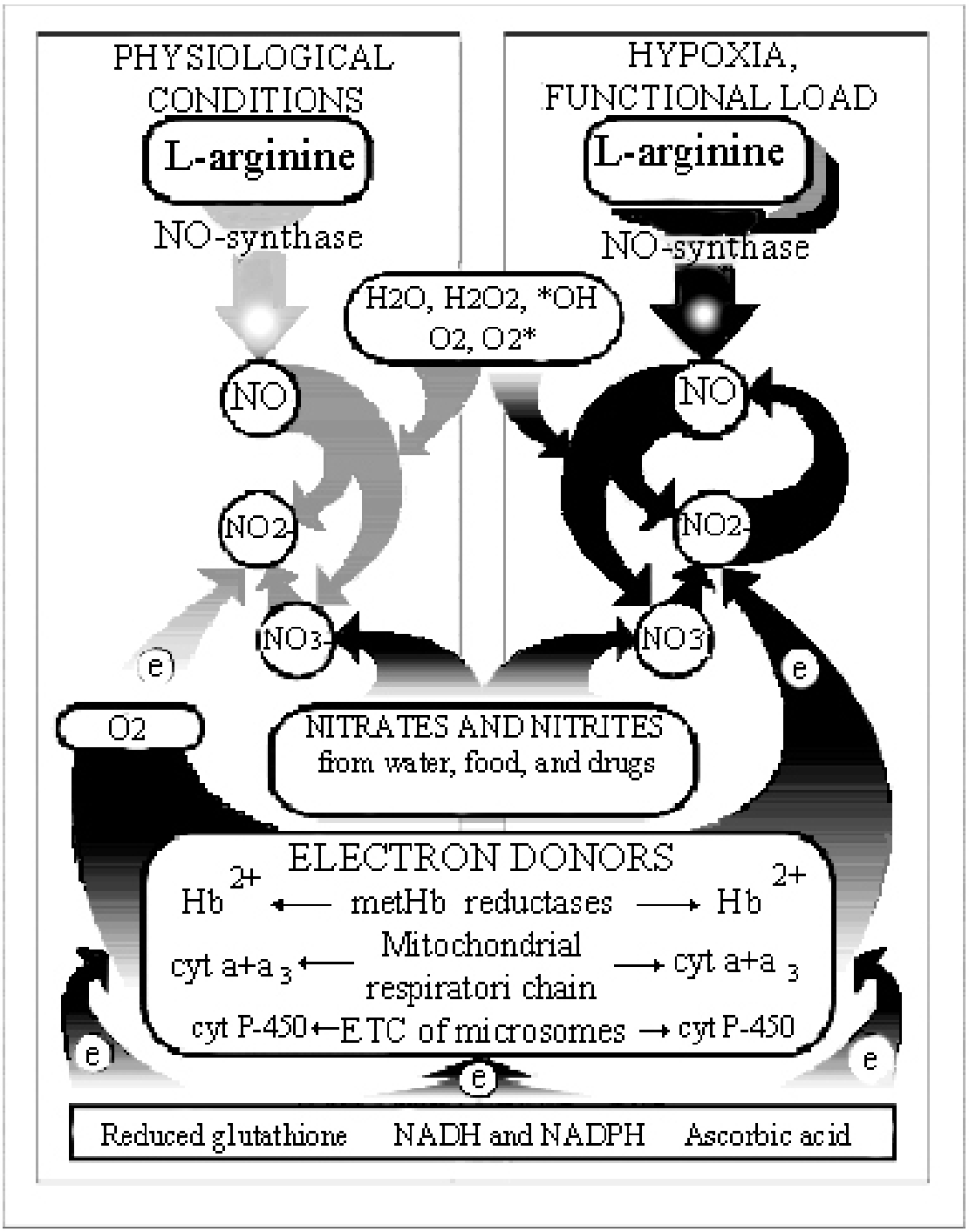



**Рис. 2. Синтез и биотрансформация оксида азота в кровотоке в условиях нормы и гипоксии (по В.П. Реутову)**

Цикл окиси азота обеспечивает координацию многих $Ca^{2+}$- зависимых метаболических процессов как в клетках с NO–синтазной активностью, так и в клетках, не имеющих такой активности. Участвуя в межклеточном взаимодействии, NO может окисляться в ионы $NO_2^-$ и $NO_3^-$ и тем самым переходить в малоактивное или неактивное состояние. Однако, благодаря нитратредуктазной активности NO – содержащих белков (ксантиноксидаза) и гемосодержащих белков, находящихся в дезоксиформе, эти соединения могут вновь регенерировать в NO.

Кроме того, оксид азота, связываясь с гемоглобином и другими веществами, может транспортироваться на расстояния, значительно превышающие размеры клеток. Избыточное количество NO связывается гемосодержащими белками, низкомолекулярными тиолсодержащими веществами, железосерными соединениями, а также вторичными аминами. Совмещая в обычных физиологических условиях роль переносчика $O_2$ и NO, гемоглобин превращается в ловушку для NO при поступлении высоких доз этого вещества, либо предшественников NO – нитритов и нитратов.

В связи с этой проблемой заслуживает отдельного комментария ситуация, связанная с ролью нитрат-иона в практической деятельности человека и с его воздействием на организм. Принято считать, что нитрат-ион, поступающий в организм вследствие загрязнения окружающей среды азотсодержащими промышленными и бытовыми отходами, оказывает отрицательное воздействие на состояние здоровья. По оценкам, в развитых странах человек в сутки получает с едой и питьем до 400 мг нитрат-иона в сутки. Между тем известно, что продуцируемая организмом окись азота в итоге окисляется до нитрат-иона, количество которого сопоставимо с приведенной цифрой [Зеленин К.Н., 1997]. Это подтверждается тем, что при отсутствии внешних источников нитрат-иона его обнаруживают в моче, причем его повышенное выделение может быть вызвано теми или иными заболеваниями, что можно использовать в диагностических целях. Однако требуется более глубокий анализ роли нитрат-иона в организме.

Кинетика превращения оксида азота в его метаболиты недостаточно изучена. Плазменный нитрит рассматривается как источник доставки для внутрисосудистого оксида азота. Представляет интерес изучение надёжности исследования нитрита в качестве маркера нитроксидергической системы.

Lauer T. et al. в своём исследовании (2001) определяли содержание метаболитов оксида азота в пробах крови, взятых из кубитальной вены и брахиальной артерии здоровых добровольцев. В результате исследований существенной артериовенозной разницы не обнаружено. Вместе с тем, стимуляция ацетилхолином (1-10 мкг/мин) эндотелиальной NOS сопровождалась дозозависимым приращиванием уровня $NO_2^-$ максимум на 71%. Этот эффект сопровождался 4-кратным увеличением тока крови в предплечье. Равноэффективная доза папаверина, стимулируя ток крови в предплечье, не оказывала влияния на уровень нитрита. Интраартериальное введение $NO_2^-$ изменяло ток крови в предплечье. Ингибирование eNOS ($N^G$-монометил-L-аргинин, 4-12 мкмоль/мин) дозозависимо вызывало снижение базального уровня $NO_2^-$ и тока крови в предплечье. Одновременно отмечалось угнетение индуцированной ацетилхолином вазодилатации. Таким образом, доказано, что в физиологических условиях нитрит способен генерировать оксид азота.

## 1.3. Биологические эффекты оксида азота

В настоящее время получены обширные клинические материалы, подтверждающие важную роль оксида азота в функционировании различных органов и систем организма (сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной систем и реализации иммунной защиты организма). Выясняется значение оксида азота в патогенезе заболеваний с системной воспалительной реакцией. Простейшее по своей химической структуре соединение выполняет функцию одного из универсальных регуляторов физиологических и биохимических процессов.

Все многообразие биологических эффектов NO можно разделить на 3 типа:

1. Регуляторное влияние NO на сосудистый тонус, адгезию клеток, проницаемость сосудов, нейротрансмиссию, бронходилатацию, агрегацию тромбоцитов, систему противоопухолевого иммунитета, функцию почек.

2. Защитное действие оксида азота, проявляющееся в его антиоксидантной активности, ингибировании адгезии лейкоцитов и защите от токсичного воздействия фактора некроза опухолей $\alpha$.

3. Повреждающее действие NO, выражающееся в ингибировании ряда ферментов, нарушении структуры ДНК, индукции процессов перекисного окисления липидов, снижении антиоксидантного потенциала клеток, повышении их чувствительности к радиации, алкилирующим агентам и токсичным ионам металлов.

Влияние оксида азота осуществляется через прямые и опосредованные эффекты: прямые эффекты наблюдаются в тех случаях, когда с биологическими макромолекулами взаимодействует сам NO опосредованные эффекты реализуются не NO, а продуктами его взаимодействия с другими соединениями, в первую очередь, $O_2$ и $O_2^-$.

При взаимодействии NO с $O_2$ сначала образуется $NO_2$ ($2NO+O_2 \rightarrow 2NO_2$), который с очень высокой скоростью реагирует с другой молекулой NO с образованием $N_2O_3$ ($NO_2+NO \rightarrow N_2O_3$). $N_2O_3$ может либо нитрозировать амины и тиолы (например, в белках), либо взаимодействовать с $H_2O$ с образованием $HNO_2$. Сильным нитрозирующим агентом является пероксинитрит ($ONOO^-$), образующийся при взаимодействии NO с $O_2^-$ ($O+O_2^- \rightarrow ONOO^-$; к~$7*10^9 M^{-1}*c^{-1}$). Нитрозирование функциональных групп в белках приводит к значительным изменениям их функциональной активности.

Ярким примером прямого регуляторного действия NO служит его вазодилататорная активность. Сосудорасширяющее действие NO связано с активацией растворимой формы фермента гуанилатциклазы. Гуанилатциклаза катализирует биосинтез циклического 3,5 – гуанозинмонофосфата (цГМФ) из гуанозинтрифосфата [Северина И.С., 2000].

Как известно, цГМФ оказывает модуляторное действие на многие клеточные процессы. Характерной особенностью растворимой гуанилатциклазы является присутствие в ней гемовой группы (ферропротопорфирина IX). NO связывается с молекулами железа гема и специфично изменяет структуру последнего. Такая структурная перестройка приводит к резкому возрастанию активности гуанилатциклазы (до 400-кратного) и накоплению цГМФ.

Активизирующее действие оксида азота проявляется при его очень низких концентрациях ($EC_{50}$~100нМ)[2]. В процессе вазодилатации, кроме цГМФ, ключевые роли играют цГМФ-зависимая протеинкиназа, $Ca^{2+}$-АТФ-аза и $Ca^{2+}$.

В основе процессов местной ауторегуляции сосудистого тонуса лежит взаимодействие разнонаправленных процессов, изменяющих внутриклеточную концентрацию ионов $Ca^{2+}$. Вазоактивные вещества, повышающие тонус сосудистой стенки, например катехоламины, приводят к активизации системы циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и увеличению внутриклеточной концентрации $Ca^{2+}$. Наряду с включением внутриклеточных структур, обеспечивающих повышение сосудистого тонуса, комплекс $Ca^{2+}$-кальмодулин активирует эндотелиальную конституционную NO – синтазу, синтезированный NO практически моментально диффундирует в прилегающий слой гладкомышечных клеток, где стимулирует гуанилатциклазу, в

[2] Следует иметь в виду, что из трех взаимосвязанных форм окиси азота: NO (нейтральный свободный радикал, содержащий «экстра-электрон»), $NO^+$ (нитросониевый катион, возникающий в результате удаления одного электрона) и $NO^-$ (нитросильный анион, образующийся при добавлении одного электрона к молекуле окиси азота), только NO реагирует с гуанилатциклазой, что ведет к образованию цГМФ и последующим регуляторным эффектам в клетках. Молекула $NO^+$ также может осуществлять отдельные регуляторные функции за счет образования «метаболо-нитрозилсоединений», но главное, она обладает четко выраженными канцерогенными свойствами. Патофизиологическая роль $NO^-$ пока неизвестна. В воде $NO^-$ быстро переходит в $N_2O$. Для удобства предложено только NO обозначать как «окись азота», остальные две формы получили название «моноокись азота», хотя, в принципе, все три молекулы являются, по существу, моноокисями азота (N-O).

результате действия цГМФ на процессы транспорта $Ca^{2+}$ внутриклеточная концентрация последнего снижается и происходит расслабление стенки сосудов.

Вазодилататорное действие NO осуществляется не только путем активации гуанилатциклазы, но и в результате обратимого ингибирования цитохромоксидазы. Ингибирование цитохромоксидазы в сосудистой ткани вызывает нарушение энергетического метаболизма, а это, вероятно, приводит к расслаблению сосудов за счет гиперполяризации мембраны, обусловленной открытием АТФ – зависимых калиевых каналов, а также за счет снижения уровня АТФ, необходимого для функции сократительного аппарата.

Недостаточное образование эндогенного оксида азота при патологических состояниях вызывает артериальную и легочную гипертензию, спазм коронарных и периферических артерий, сосудов головного мозга, а также способствует развитию атеросклероза и реперфузионных повреждений различных органов. Чрезмерный синтез NO играет важную роль в патогенезе и клинической картине септического шока (артериальная гипотензия и миокардиальная недостаточность, рефрактерные к катехоламинам, повреждение различных тканей), патологической цитотоксичности макрофагов (подавление митохондриального дыхания и синтеза ДНК), полиорганной недостаточности.

# ГЛАВА 2.

# РОЛЬ НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗГА ПРИ ТЯЖЁЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

## 2.1. Эндотелиальные факторы регуляции церебрального сосудистого тонуса

Эндотелий, по классическому определению гистологов, — однослойный пласт специализированных клеток, выстилающих изнутри все сердечно-сосудистое русло **(рис. 3)**.

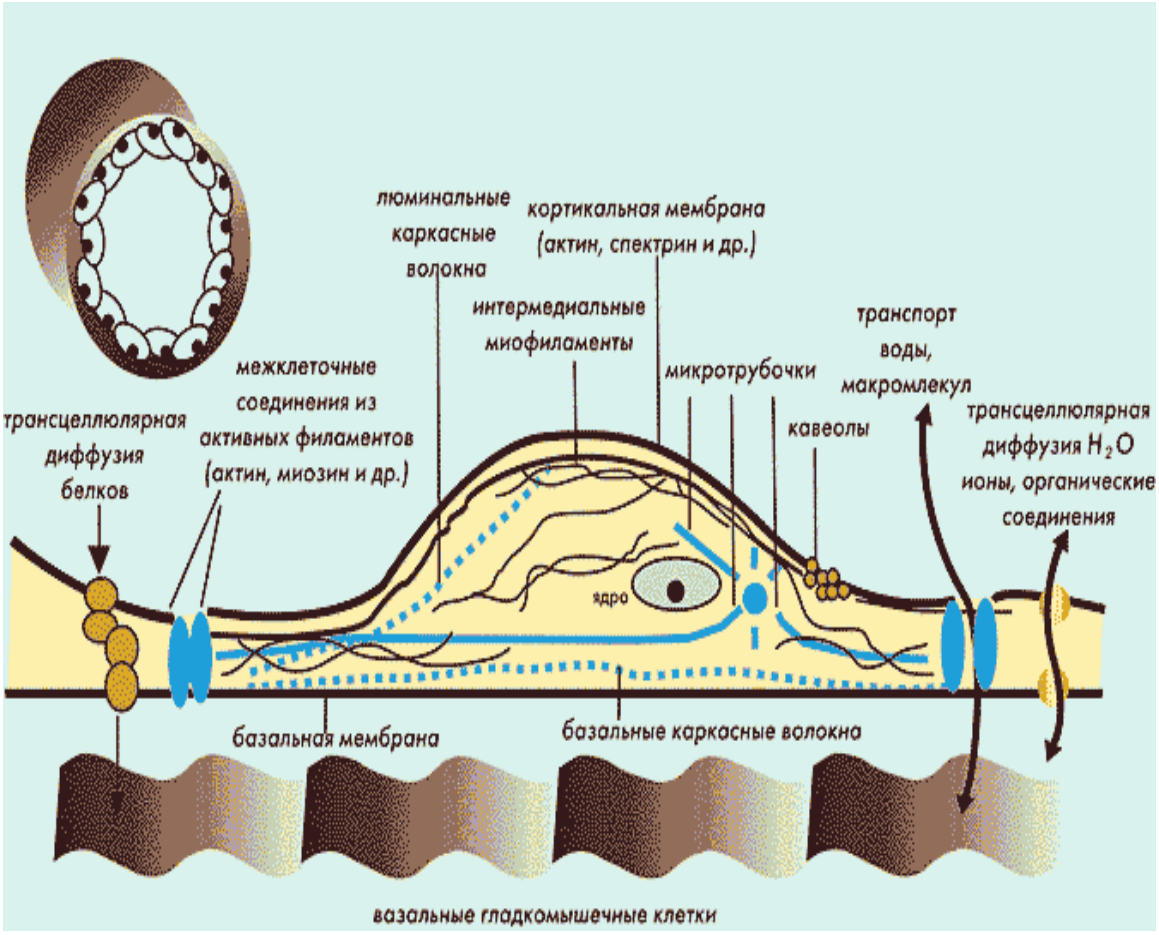



**Рис. 3. Микроскопическая структура эндотелиальной клетки (по О.А. Гомазкову)**

Для человека среднего веса — это ткань общей площадью в шесть теннисных кортов и весом около 1,8 кг, содержащая один триллион клеток со сложнейшей “биохимической организацией”, включающей системы синтеза белков и низкомолекулярных веществ, рецепторы, ионные каналы.

Эндотелиальная ткань не однородна в своей архитектуре. Её гетерогенность, соответствующая гетерогенности сосудистого ложа, зависит от размера, структуры, биохимической организации, функции данного органа. Эндотелий коронарных сосудов, легочный эндотелий, церебральный и др., хотя и схожи анатомически, но существенно различаются в генной и биохимической специфичности, типах рецепторов, наборе белков-предшественников, ферментов, трансмиттеров. Соответственно, патологические явления также избирательно развиваются в популяциях эндотелиальных и сосудистых клеток: они неодинаково чувствительны к атеросклерозу, ишемическим нарушениям, развитию отёка и др. Эти особенности весьма существенны при формировании эндотелиальных дисфункций и других патологий.

На поверхности эндотелиальных клеток, обращенной в просвет сосуда, расположены многочисленные рецепторы, воспринимающие те или иные химические агенты, поступающие с кровью. Часть этих рецепторов идентифицирована в качестве воспринимающих вазоактивные сигналы. Это рецепторы к ангиотензину II, гистамину, серотонину, брадикинину, аденозинди-, и аденозинтрифосфату, мускариновые рецепторы, чувствительные к ацетилхолину. Из крови к клеткам эндотелия поступает ренин, ангиотензиноген, ангиотензин, «большой неактивный эндотелин» (Big-Et); клеточной мембраной фиксируются трансформирующий фактор роста, а также ряд метаболитов [Lusher T.F., 1990].

Кроме веществ, имеющихся в плазме крови, эндотелий тесно взаимодействует с форменными элементами пристеночного тока крови - тромбоцитами и лейкоцитами, стабилизирует тромбоциты и получает арахидоновую кислоту, серотонин, факторы роста и другие, фиксированные оболочкой тромбоцитов биологически активные вещества.

Эндотелий подвергается постоянному внутрисосудистому давлению крови, его поверхность испытывает воздействие самого тока крови - ламинарного в норме и турбулентного при патологии, что оказывает влияние на биофизическое состояние клеточных мембран, их проницаемость и в конечном итоге на процессы внутриклеточного метаболизма. Если учесть, что подавляющее большинство веществ, проникающих в эндотелий, играет роль в регуляции сосудистого тонуса, то становится очевидной его возможная роль в патогенезе нарушений церебрального кровотока и системной гемодинамики при травматическом повреждении головного мозга.

Различают 5 важнейших функций эндотелия:

1) получение информации – химической, механической; фиксация различных гуморальных факторов на поверхности клетки, обращенной в просвет сосуда; переработка информации для управления эффекторными слоями сосудистой стенки;

2) регуляция продукции простагландинов;

3) выработка специфического вазодилататора – оксида азота;

4) образование эндотелиального вазоконстрикторного фактора - эндотелина, резко усиливающееся при повреждении эндотелия;

5) контроль за адгезией и агрегацией тромбоцитов и усиление антикоагуляционных процессов.

Тонус церебральных сосудов в нормальных условиях регулируется двумя главными механизмами: через активацию калиевых каналов и посредством синтеза и выделения эндотелием сильных релаксирующих и констрикторных факторов. Эти два механизма взаимосвязаны, потому что некоторые эндотелиальные факторы вызывают релаксацию через активацию калиевых каналов, с другой стороны, мембранная гиперполяризация вызывает мобилизацию кальция и способствует высвобождению эндотелием оксида азота.

С помощью фармакологических средств выяснена роль $B_2$-кининовых рецепторов, находящихся на поверхности эндотелиальных клеток: их блокада тормозит вызываемое брадикинином расслабление сосудистых клеток (вазодилатацию) и вы-

свобождение NO. Активность другого пептида — ангиотензина II, вызывающего сокращение (констрикцию) артериальных сосудов, угнетает действие оксида азота.

Активация калиевых каналов в гладких миоцитах вызывает гиперполяризацию клеточной мембраны, закрытие потенциалзависимых кальциевых каналов, уменьшение содержания внутриклеточного кальция и вазорелаксацию **(рис. 4)**.

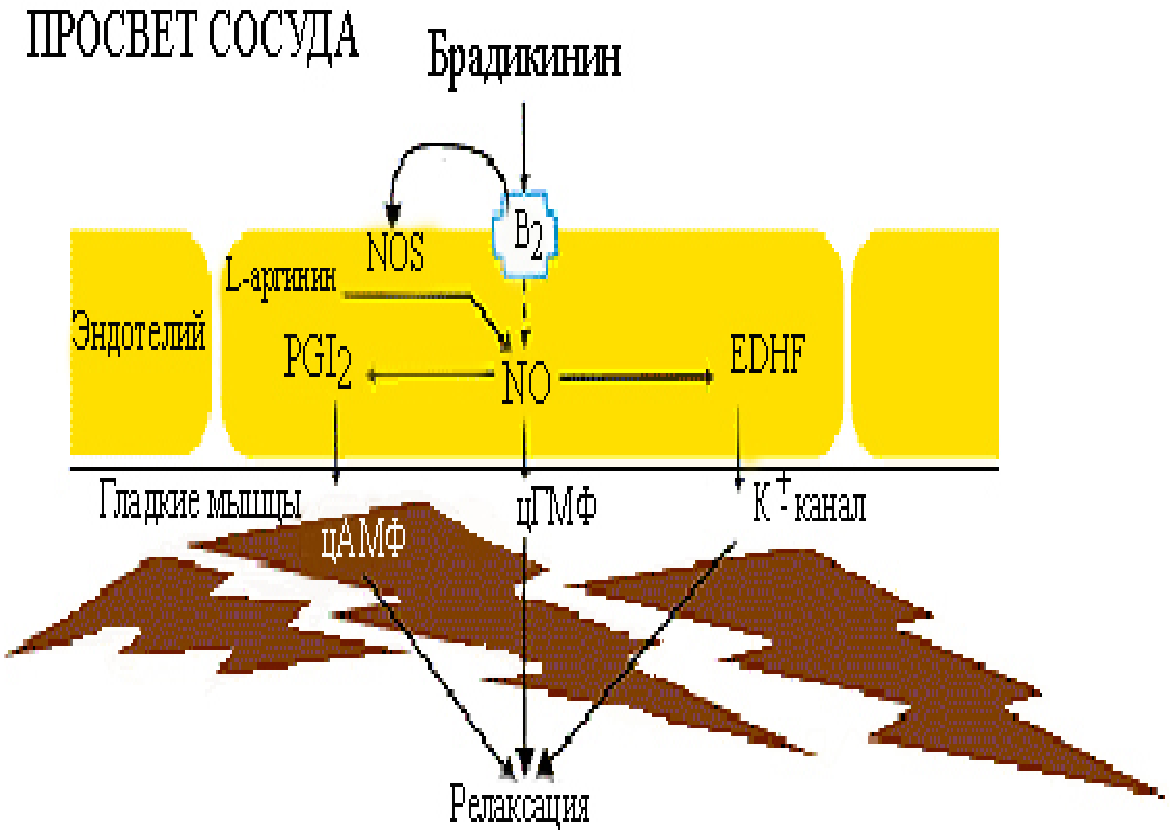



**Рис. 4. Регуляция сосудистого тонуса (по О.А. Гомазкову)**
($B_2$ — кининовый рецептор, $PGI_2$ — простациклин, EDHF — эндотелиальный фактор гиперполяризации, цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат, цАМФ — циклический аденозинмонофосфат)

В церебральных сосудах представлены следующие типы калиевых каналов, экспрессированные не только в миоцитах, но и в эндотелии:

1) АТФ – сенситивные;
2) кальцийактивируемые;
3) потенциалзависимые;
4) каналы внутреннего выпрямления.

Ряд факторов, включая некоторые рецепторопосредованные агонисты, вторичные посредники и гипоксию, влияет на тонус церебральных сосудов посредством активации калиевых каналов.

Вазоактивные факторы, секретируемые эндотелием, оказывают наиболее важное влияние на тонус сосудов и мозговое кровообращение. Цереброваскулярный тонус определяется динамическим балансом констрикторных и релаксирующих факторов.

Эндотелин – пептид, наиболее сильный констрикторный фактор. Существует три формы изопептида эндотелина, но только эндотелин – 1 (ЕТ-1) вырабатывается эндотелием в норме. ЕТ-1 образуется в эндотелии из более крупных предшественников (preproET, bigET), с помощью эндотелинконвертирующего энзима (ECE) и, активируя в миоцитах рецепторы двух типов (ЕТ-А и ЕТ-В), вызывает их сокращение и вазоконстрикцию. Активация эндотелин –В – рецепторов (ЕТ-В) в эндотелии стимулирует NO – синтазу (NOS) и продукцию оксида азота. Экспрессия генов эндотелина повышается тромбином, трансформирующим фактором роста β, гемоглобином, фактором некроза опухоли α и ингибируется NO и цГМФ.

Эндотелин влияет на тонус сосудов через рецепторы двух типов: эндотелин – А и эндотелин – В – рецепторы. Эндотелин – А – рецепторы экспрессируются в гладких миоцитах сосудов и опосредуют вазоконстрикцию эндотелином. Реакция сосудистого тонуса на активацию эндотелин- В – рецепторов зависит от их локализации; в гладких миоцитах они опосредуют вазоконстрикцию, в эндотелии – релаксацию через высвобождение простациклина или оксида азота.

Ингибиторы эндотелиновых рецепторов не оказывают эффекта на тонус церебральных сосудов in vivo, из чего следует, что синтез эндотелина не влияет на базальный тонус мозговых сосудов. Однако при патологических состояниях, сопровождающихся сосудодвигательными феноменами, уровень экспрессии генов эндотелина играет важную роль [Гомазков О.А., 1999; Паппапетропулос А., 1997; Lusher T.F., 1992].

Другой, менее изученной, констрикторной субстанцией, продуцируемой эндотелием, является первичный метаболит арахидоновой кислоты, который вызывает вазоконстрикцию через активацию $PGH_2$ – тромбоксан – $A_2$ – рецепторов.

Простациклин ($PGI_2$) – эндотелиальный фактор, который вырабатывается с помощью циклооксигеназных энзимов двух изоформ. Циклооксигеназа–1 экспрессируется конституционально во многих клетках, включая эндотелий. Циклооксигеназа-2 является индуцированной изоформой, которая экспрессирована преимущественно в макрофагах, фибробластах, эндотелии и гладких миоцитах сосудов. Липополисахариды, цАМФ, гипоксия, некоторые цитокины, опухолевые гормоны роста вызывают экспрессию циклооксигеназы-2 [Asano T., 1982]. Простациклин вызывает релаксацию церебральных артерий in vitro и артериол in vivo, что связано с активацией аденилатциклады с накоплением цАМФ, активацией калиевых каналов и частично зависит от образования NO. Простациклин, благодаря синергическому действию с оксидом азота, является сильным ингибитором агрегации тромбоцитов, адгезии лейкоцитов к эндотелию и пролиферации гладких миоцитов сосудистой стенки.

Эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF) относится к эпоксиэйкозотриеновым кислотам. Эти кислоты повышают наружный калиевый ток в изолированных миоцитах мозговых микрососудов, вызывая гиперполяризацию и релаксацию [Nagao T., 1993].

Оксид углерода (CO) также функционирует как эндотелиальный релаксирующий фактор в некоторых кровеносных сосудах. Хотя CO не способен прямо релаксировать церебральные сосуды, он изменяет сосудистый тонус через влияние на продукцию цГМФ в гладких миоцитах.

Реактивные радикалы кислорода (гидроксильные радикалы) могут синтезироваться эндотелием и служить дилататорами в церебральной микроциркуляции.

Оксид азота - сильный вазодилататор, вызывающий релаксацию церебральных сосудов как in vitro, так и in vivo. Стимулируя растворённую гуанилатциклазу в миоцитах сосудов, он вызывает повышение внутриклеточной концентрации

цГМФ, что приводит к вазорелаксации. В дополнение к этому цГМФ – зависимому механизму нитроксид может вызывать релаксацию некоторых сосудов через активацию калиевых каналов. Принципиально важно, что релаксация мозговых сосудов в ответ на ацетилхолин, брадикинин, аргининвазопрессин, окситоцин, субстанцию Р, гистамин, активатор G-протеина, эндотелин (через активацию рецепторов эндотелин-В), простагландин $F_{2\alpha}$ опосредуется главным образом через NO. Органические нитраты, такие как нитроглицерин, также вызывают релаксацию мышц церебральных сосудов через активацию гуанилатциклазы после биотрансформации в оксид азота.

## 2.2. Патофизиологические механизмы развития нарушений мозгового кровотока

Основными факторами, влияющими на течение и прогноз острой нейрохирургической патологии, являются процессы, возникающие как результат первичного поражения центральной нервной системы, а также вторичные ишемические эпизоды. Поскольку первичные повреждения головного мозга недоступны для лечебных воздействий, основной целью интенсивной терапии больных с черепно – мозговой травмой является предупреждение и лечение вторичных ишемических повреждений. К наиболее тяжелым из них относятся цереброваскулярные процессы, приводящие к срыву ауторегуляции мозгового кровотока (МК). Локальные нарушения МК, развившиеся в результате повреждения или сдавления мозга в свете последних представлений об общих механизмах церебральных ишемий объединяются термином «первичный травматический инсульт» [Вахницкая В.В., 2001].

У больных с острой нейрохирургической патологией Chesnut R.M. (1996) выделяет экстра- и интракраниальные причины вторичных ишемических атак. К экстракраниальным автор относит гипотензию, гипоксию, анемию, гипертермию, гипер- и гипокапнию, электролитные расстройства, гипер- и гипогликемию, нарушения кислотно – основного состояния и системные воспалительные реакции. Интракраниальные факто-

ры вторичного поражения мозга включают внутричерепную гипертензию, отек мозга, аксональные, а также вторичные геморрагические и ишемические повреждения, ангиоспазм, нарушения мозгового кровотока, гемо- и ликвороциркуляции, гидроцефалию, интракраниальные инфекционные нарушения, нейрохимические расстройства.

В настоящее время большое значение придается вторичным ишемическим эпизодам, возникающим при ЧМТ и сосудистой патологии головного мозга из-за несоответствия между доставкой к мозгу кислорода и питательных веществ и потребностями нейронов вследствие нарушения ауторегуляции кровообращения. Поврежденный головной мозг особенно чувствителен к гипотонии и гипоксии. Нарушение способности сосудов к компенсаторному изменению тонуса в ответ на изменение углекислого газа, кислорода в крови или в мозговой ткани, уровня гемоглобина, концентрации глюкозы и других воздействий вызывает резкие колебания интенсивности МК от гиперемии мозга до ишемии [Kordestani R.K., 1997; Martin N.A., 1995; Weir B. et al., 1999].

Мозговой кровоток в нормальных условиях поддерживается на достаточно стабильном уровне благодаря сложной системе ауторегуляции и определяется уровнем внутрисосудистого давления, состоянием кислотно-щелочного равновесия и напряжением газов крови, а также содержанием метаболитов и биологически активных веществ [Крылов В.В., 2000; Sander D., 1993; Weber M., 1990].

В пределах физиологических колебаний артериального давления мозговой кровоток остается относительно независимым благодаря изменению диаметра церебральных сосудов (эффект Остроумова-Бейлисса). При снижении среднего артериального давления ниже 60-50 мм.рт.ст. мозговой кровоток начинает прогрессивно падать, при этом церебральные сосуды пассивно сужаются и их диаметр уменьшается. Как показали исследования Медведева Ю.А. (2002), Nakamura S. (1992), этот процесс принципиально отличается от спазма сосудов, обусловленного активным сокращением сосудистой стенки. При локальном снижении кровотока, сопровождающимся ауторегу-

ляторным расширением сосудов мозга и развитием коллатерального тока крови, возникает гипертрофия и гиперплазия мышечной оболочки артерий, утолщение интимы, приводящее к изменению их просвета. Ишемия мозга развивается при уменьшении притока крови к тем или иным его отделам из-за закрытия или гемодинамически значимого сужения церебральных сосудов [Кравец Л.Я., 2002].

Объём крови, находящийся в сосудах головного мозга, зависит от нескольких факторов, главными из которых являются объём циркулирующей крови (ОЦК), минутный объем кровообращения (МОК), системное артериальное давление (АД), среднее артериальное давление (САД) и церебральное перфузионное давление (ЦПД). Этот компонент характеризуют две основные величины: внутримозговой объём крови (ВМОК) – часть ОЦК, находящаяся в сосудах мозга в данный момент, и мозговой кровоток (МК) как часть МОК, обеспечивающая кровоснабжение головного мозга. ВМОК – относительно стабильная величина, зависящая от ОЦК и ёмкости сосудистого русла головного мозга. МК составляет приблизительно 15 % МОК, динамически связан с ВМОК и зависит от метаболических потребностей мозга и влияния местных регуляторных механизмов [Мальцев В.В., 2000].

Зависимость ВМОК от САД в пересчете на 100 г мозговой ткани отражается следующим уравнением:

$\Delta$ВМОК = 0,015 мл/100 г/ 1 мм Hg,

где $\Delta$ВМОК – изменение внутримозгового объёма крови.

Мозговой кровоток определяется уровнем ЦПД:

ЦПД = САД - ВД – ВЧД, где

САД – среднее артериальное давление

ВД – давление в венозных коллекторах мозга

ВЧД – внутричерепное давление.

Величиной ВД часто пренебрегают при расчете ЦПД, однако при высоком ВЧД она оказывается фактором, стабилизирующим отток крови из мозговых сосудов. Кроме того, градиент САД – ВД идет на преодоление периферического сосудистого сопротивления (ПСС). Снижение ПСС улучшает условия тканевого кровотока, даже при сниженном САД.

По механизму развития выделяют два принципиально различных варианта нарушения мозгового кровообращения – гиперемия и олигемия мозга. В основе регионарной гиперемии лежит комплекс экстра- и интракраниальных воздействий: нарушение ауторегуляции мозгового кровотока, повышение артериального давления, действие метаболитов (ионы водорода, лактат, простагландины, аденозин, кинины и др.). Олигемия мозга приводит к ишемическому его поражению и может являться следствием системной артериальной гипотензии или спазма церебральных сосудов. Оба этих варианта нарушения мозгового кровообращения (церебральная гиперемия и ангиоспазм) встречаются при тяжелой ЧМТ примерно в равном соотношении, доминируя на различных фазах травматической болезни мозга [Ганнушкина И.В., 2000; Bouma G.J. et al., 1995].

Стандартные представления об ангиоспазме предполагают только существование повышенного тонуса гладкомышечных структур артериол и метаартериол головного мозга. Однако в реальных условиях гиперпродукция нейромедиаторов приводит к тому, что участки вазоспазма соседствуют с участками дилатации и пареза сосудов, вследствие чего мозговой кровоток страдает более значительно [Коновалов А.Н., 1998; Zubkov A.Y., 2000].

Возможные варианты нарушения сосудистой реактивности включают:

- Сужение артериол, наступающее немедленно после травмы.
- При травме средней тяжести снижается реактивность вазоконстрикторов на артериальную гипокапнию, при тяжелой травме она утрачивается полностью.
- Рефлекторная вазодилатация в ответ на артериальную гипотензию ослабляется даже после легкой ЧМТ, при тяжелой травме сосуды начинают фактически пассивно уменьшать свой калибр на фоне снижения АД.
- Реакция гиперемии на артериальную гипоксемию значительно снижается после ЧМТ и эпизодов субарахноидального кровоизлияния.

Как следствие нарушения сосудистой реактивности при САГ, а также ЧМТ, в начальном периоде угнетается вазодила-

тационный ответ на гипоксемию и гиперкапнию, снижается МК. В последующем анемия мозга сменяется гиперемией с повышением уровня общего МК и снижением сосудистого сопротивления. При повторных эпизодах САГ и тяжёлой ЧМТ наступает срыв ауторегуляции МК, ведущий к его уменьшению.

Нарушения мозгового кровотока, как правило, имеют фазное течение. Martin N.A. (1995) на основе транскраниального допплерографического исследования выделяет три фазы. Первая фаза – гипоперфузии, наблюдается непосредственно после травмы и характеризуется снижением мозгового кровотока. Вторая фаза - гиперемическая (1-3 сутки после травмы), она проявляется повышением мозгового кровотока и внутричерепного давления. В третьей фазе - ангиоспастической (4-15 сутки) имеет место повторное снижение мозгового кровотока вследствие развивающегося церебрального вазоспазма. Это подтверждают также данные Rolza L. (1999) о развитии посттравматического вазоспазма между вторыми и восьмыми сутками.

Способность системы мозговых сосудов к ауторегуляции защищает МК во всех случаях колебания АД, кроме очень сильного падения. При снижении церебрального метаболизма обычно имеет место и вторичное угнетение МК. ЧМТ снижает вазодилатационный ответ на гипоксемию и гиперкапнию. МК при этом может уменьшиться до границ, достаточных для возникновения заметных изменений неврологических функций.

В экспериментальных исследованиях Hossmann K. (1993) установлен алгоритм метаболических реакций ткани мозга на снижение мозгового кровотока. При снижении уровня кровотока до 55 мл на 100 г в 1 мин (первый критический уровень) возникает первая реакция в виде торможения синтеза белкового синтеза; снижение до 35 мл на 100 г в 1 мин (второй критический уровень) сопровождается активацией анаэробного гликолиза. Нарастающая ишемия (снижение кровотока до 20 мл на 100 г в 1 мин – третий критический уровень) приводит к формированию энергетической недостаточности и как следствие к дисфункции каналов активного ионного транспорта, дестабилизации клеточных мембран и избыточному выбросу ней-

ротрансмиттеров. Аноксическая деполяризация мембран и смерть клеток происходят при достижении уровня мозгового кровотока 10-15 мл на 100 г в 1 мин.

Метаболизм кислорода в наибольшей мере страдает в центральной зоне ишемии и в меньшей - в демаркационной зоне. Область мозга с наиболее выраженным снижением кровотока (менее 10 мл на 100 г в 1 мин) становится необратимо поврежденной очень быстро – в течение 6-8 мин с момента развития острого нарушения мозгового кровотока («сердце», или «ядерная» зона, инфаркта). В течение нескольких часов центральный «точечный» инфаркт окружен ишемизированной, но живой тканью (со снижением мозгового кровотока до 20 мл на 100 г в 1 мин) – так называемой зоной «ишемической полутени», или пенумбры (penumbra). В области пенумбры в целом сохранен энергетический метаболизм и имеются лишь функциональные, но не структурные изменения. За счет зоны пенумбры происходит постепенное увеличение размеров инфаркта. Длительность существования пенумбры индивидуальна у каждого больного и определяет границы временного периода (так называемое «терапевтическое окно»), внутри которого с наибольшей эффективностью могут проводиться лечебные мероприятия.

Результаты экспериментальных исследований показали, что при острой фокальной ишемии мозга «терапевтическое окно» более узкое, чем при глобальной ишемии. Формирование большей части зоны инфаркта заканчивается через 3-6 ч с момента нарушения кровотока, доформирование её продолжается 48-72 ч а, возможно, и дольше, с учётом влияния сохраняющегося отёка мозга и других отдаленных последствий церебральной ишемии.

Важно отметить, что и в областях, удалённых от очага ишемии, выявляются вторичные изменения мозгового кровотока и энергетического метаболизма мозга как результат распространения транснейронального торможения активности нейронов («диашиз», или «отдаленная функциональная депрессия»). В области пенумбры быстрее и в большей степени поражаются элементы глии, медленнее и менее резко – нейроны головного

мозга. При нетяжёлой или кратковременной фокальной ишемии происходит селективное поражение отдельных нейронов с повышенной чувствительностью к ишемии.

Дальнейшее развитие повреждения связано с агрессивным воздействием возбуждённых ишемией клеток глии (в первую очередь микроглии) на жизнеспособные нейроны периинфарктной зоны. Таким образом запускаются механизмы вторичного повреждения мозга за счет отсроченных нейрональных потерь. С удлинением периода ишемизации избирательность клеточной гибели теряется и тканевое повреждение прогрессирует по общим механизмам, обусловливая развитие некротического очага.

Снижение мозгового кровотока вследствие развития сосудистого спазма является одним из наиболее частых и грозных осложнений при тяжёлой ЧМТ. Посттравматический вазоспазм по данным различных авторов возникает у 26,7-68% пострадавших и может быть генерализованным или локальным.

Martin N.A. (1995) выявил три независимых фактора, предопределяющих вероятность развития вазоспазма средней мозговой артерии и выявляемых при компьютерной томографии: субдуральная гематома, субарахноидальное кровоизлияние, внутримозговая гематома. При наличии одного из факторов вазоспазм развивался в 14% случаев, если же имело место сочетание двух и более факторов, вероятность возникновения вазоспазма достигала 65-78%. Однако, не исключено, что в данном случае имела место более тяжелая травма, и, соответственно, неврологическая симптоматика и степень снижения мозгового кровотока были выражены в большей степени.

По данным Болюх А.С. (2002) частота встречаемости посттравматического церебрального вазоспазма (по данным транскраниальной допплерографии) составляет 28,2%, с началом процесса на 1-12 день (в среднем, 4,05±0,7) и длительностью от 2 до 18 дней (в среднем, 7,40±1,2). Базальная локализация ушибов значительно повышает риск развития вазоспазма (до 88,2%). При этом у 40% больных с явлениями вазоспазма отмечались неблагоприятные исходы (смерть, вегетативное состояние).

Выраженность церебрального вазоспазма, сопровождающего тяжелую черепно-мозговую травму, определяет степень вторичного ишемического повреждения клеток головного мозга. В областях, удаленных от очага ишемии, также выявляются вторичные изменения мозгового кровотока и энергетического метаболизма мозга как результат распространения транснейронального торможения активности нейронов. Степень ишемического повреждения нейронов головного мозга определяет тяжесть состояния больных, глубину угнетения сознания и нарушение витальных функций, наличие очаговой полушарной и стволовой симптоматики. При развившемся сосудистом спазме нарушения сознания различной степени отмечаются у 70% больных, очаговая полушарная симптоматика – у 63%, стволовые симптомы у 61% [Вахницкая В.В., 2001].

Многими авторами подчеркивается схожесть в течении посттравматического и постгеморрагического вазоспазма, но этот факт наблюдается, в основном, при сочетании черепно-мозговой травмы с субарахноидальной геморрагией. При отсутствии последней церебральный вазоспазм начинается раньше и имеет меньшую продолжительность. Показано, что при ЧМТ степень сужения церебральных сосудов (по данным транскраниальной доплерографии) увеличивается после 48 часов и достигает максимума между пятым и седьмым днями после травмы. Продолжительность существования сосудистого спазма в этих условиях может колебаться от 12 часов до 14 суток. Кроме того, большое значение имеет локализация спазмированных сосудов. При наличии вазоспазма в вертебробазилярном бассейне отмечалось нарушение функций ствола мозга, летальность в этой группе больных достигала 90% [Kordestani R.K., 1997].

В исследовании Green K.A. (1996), у 41% больных, умерших от последствий черепно-мозговой травмы, на ангиограммах обнаруживался выраженный вазоспазм. При этом ишемия головного мозга выявлена в 51% случаев, протекавших с явлениями вазоспазма, и только в 32% при отсутствии последнего.

## 2.3. Роль нитроксидергической системы в патогенезе повреждения нервных клеток при черепно-мозговой травме

Большое внимание к NO связано с тем, что NO участвует в регуляции систем внутриклеточной сигнализации. Эта регуляция осуществляется посредством нескольких механизмов. Один из механизмов связан с активацией синтеза NO, увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ и активацией через систему G-киназ $Ca^{2+}$ насосов эндоплазматической сети. Другим механизмом может быть регуляция высвобождения ионов $Ca^{2+}$ из пула этих ионов, нечувствительного к инозитол-1,4,5-трифосфату. Образование $NO^{+}$, одного из промежуточных продуктов метаболизма NO, может влиять на проницаемость $Ca^{2+}$ каналов. Эти свойства NO позволяют причислять это соединение к таким вторичным мессенджерам, как цАМФ, цГМФ, $Ca^{2+}$, инозитол-1,4,5-трифосфат, диацилглицерол, цАДФ-рибоза, арахидоновая кислота.

Имеются данные о том, что NO не только выполняет в мозге функцию вторичного мессенджера, но и участвует как нейромедиатор в межклеточной сигнализации, функционально соединяя пресинаптический и постсинаптический нейроны. NO влияет на пластические свойства нейронов, участвует в процессах долговременной синаптической потенциации, модулирует активность нейромедиаторных систем, влияет на синтез и секрецию нервными клетками нейромедиаторов.

Наибольшая активность NO – синтазы выделяется в мозжечке, более низкий уровень активности наблюдается в среднем мозге, стриатуме, коре, гиппокампе и продолговатом мозге [Семченко В.В., 1999].

Существенная роль оксида азота состоит в сопряжении локальных уровней нейрональной активности и кровотока в одном и том же участке мозга [Охотин В.Е., Куприянов В.В., 1996]. Установлено, что дендриты NO–синтезирующих нейронов оплетают кровеносные капилляры по их ходу на протяжении 500-1500 мкм и имеют тесный дендрососудистый контакт, обеспечивающий рецепцию изменений сосудистого тонуса и обусловливающий ответный сосудодвигательный эффект. По-

лучая информацию о функциональной активности соответствующих участков мозга, нейроны выделяют оксид азота, и тем самым оказывают влияние на локальный кровоток в пределах работающего модуля, усиливая кровоснабжение преимущественно функционирующих в данный момент участков мозга при общем стабильном притоке.

На основании литературных данных о генерации in vitro супероксидного радикала и перекиси водорода NO – синтазами мозга, о реакции in vitro NO с супероксидным радикалом и органическими перекисными радикалами, о термодинамической возможности генерации гидроксильного радикала из NO, об инициации перекисного окисления липопротеидов низкой плотности NO и супероксидом, о вызываемой активацией NMDA рецепторов образования супероксида, о генерации гидроксильного радикала in vitro, можно предположить, что NO-синтаза играет важную роль в свободнорадикальном статусе ткани мозга [Реутов В.П. и др.,1998; Koppenol W.H., 1992; Stamler S.S. et al., 1992]. Взаимодействие оксида азота с супероксидным радикалом кислорода можно также рассматривать как механизм взаимоинактивации этих двух высокореактивных молекул с образованием менее агрессивных промежуточных продуктов [Реутов В.П. и др. 1998; Beckman J.S., 1991]. Оксид азота инактивирует реактивные формы кислорода, образующиеся в эндотелиоцитах капилляров мозга, осуществляя тем самым защиту гематоэнцефалического барьера на молекулярном уровне [Utepbergenov D.I. et al., 1998].

Цикл окиси азота, являясь важным звеном регуляции, осуществляет координацию $Ca^{2+}$-, цАМФ-, и цГМФ – зависимых метаболических процессов и обеспечивает регуляцию содержания NO, транспорт этого соединения и более или менее полную регенерацию NO в условиях различной степени обеспеченности организма кислородом. Поэтому уже на этапе гипоксии мозга NO играет важную роль в обеспечении защиты мозга от многих патологических факторов. Кроме того, наличие нитритредуктазной и NO – связывающей способности у гемоглобина имеет важное биологическое значение в условиях постаноксической гипоксии мозга, так как позволяет осуществ-

лять транспорт NO на расстояния, значительно превышающие межклеточные, в виде R–конформеров гемоглобин–NO комплексов с последующим высвобождением оксида азота в условиях недостатка кислорода [Реутов В.П. и др., 1998].

Ведущими патогенетическими синдромами при ЧМТ являются гипоксия и локальная ишемия мозга, имеющие свои особенности на различных этапах его травматической болезни. В последние годы интенсивно изучается ряд новых аспектов, в частности, такие, как роль свободнорадикальных процессов, медиаторов воспаления, ионов $Ca^{2+}$ и возбуждающих аминокислот (ВАК), значение газообразных медиаторов, участие генетических механизмов **(рис. 5)**.

Большой экспериментальный и клинический материал свидетельствует о том, что активация свободнорадикальных процессов, имеющая лавинообразный характер и сопряженная с перекисным окислением липидов биомембран, сопровождает все патологические процессы, в основе которых лежит гипоксия, в том числе и при черепно-мозговой травме.

Основными индукторами свободных радикалов в тканях являются ионы двухвалентного железа, ферментные системы окисления катехоламинов, ксантиноксидаза, избыток восстановленного убихинона при гипоксической блокаде дыхательной цепи и др. Следует подчеркнуть, что головной мозг, исключительно богатый липидными образованиями, особенно чувствителен к активации процессов ПОЛ [Гусев Е.И., 1995; Телушкин П.К., 1998; Kovack T.A., 1996].

В литературе последних лет приводятся данные о значении специфических для нейротравмы механизмов индукции свободнорадикальных процессов. К ним относится механизм, связанный с освобождением ионов железа (мощного активатора образования свободных радикалов) из состава гемоглобина и других высокомолекулярных хелатированных форм.

Второй чрезвычайно важный механизм связан с повреждающей ролью избыточных концентраций внутриклеточного $Ca^{2+}$ и освобождением арахидоновой кислоты (АК) из состава фосфолипидов биомембран.




**Рис. 5. Схема патогенеза необратимых повреждений мозга при тяжёлой черепно-мозговой травме (по В.А. Розанову)**

Перегрузка нейронов ионами $Ca^{2+}$ приводит к активации фосфолипазы $A_2$, вследствие чего происходит отщепление полиненасыщенной АК из положения 2 в молекулах фосфолипидов. Последующие превращения АК под действием циклооксигеназы приводят к образованию целого семейства биологически активных соединений (простагландинов, тромбоксанов), которые вносят вклад в развитие воспалительных явлений при травме, а сам процесс превращения ее в гидрокси- и гидропероксиформы и в лейкотрикены связан с генерацией свободных радикалов. Таким образом, механизмы активации ПОЛ в мозге при травме многообразны.

В настоящее время изучение роли нарушений гомеостаза $Ca^{2+}$ и системы возбуждающих аминокислот находится в центре внимания в связи с ключевой ролью ионов $Ca^{2+}$ в регуляции нейрофизиологических и нейрохимических процессов в мозге [Ашмарин И.П., 1996; Grander D.W., 1988; Lipton S.A., 1994]. Кальций служит мессенджером в важнейших процессах в клетках и их медиаторных системах, регулируя синаптическую секрецию медиаторов и активность множества ферментных систем. Ионы кальция поступают в клетку через систему потенциалзависимых и хемиуправляемых каналов, агонистами рецепторов последних являются возбуждающие аминокислоты глутамат и аспартат. Удаление $Ca^{2+}$ из клетки против градиента концентраций осуществляется $Ca^{2+}$-Na-антипортером за счет энергии трансмембранного градиента $Na^{+}$, поддерживаемого энергетическими ресурсами клетки. При гипоксии и ишемии кальциевый гомеостаз вследствие энергетического дефицита нарушается. Гипоксическая деполяризация нейронов активирует поток $Ca^{2+}$ в клетку через потенциалзависимые каналы. Вход $Ca^{2+}$ в клетку стимулирует выброс ВАК, которые через различные типы рецепторов (NMDA, каинатные и квисквалат/AMPA – рецепторы) стимулируют входящий ток $Ca^{2+}$ и $Na^{+}$,усиливая деполяризацию и замыкая «порочный круг». Повышенные концентрации внутриклеточного $Ca^{2+}$ запускают ряд патологических явлений внутри клетки, в частности липолиз (фосфолипаза $A_2$), протеолиз, активацию протеинкиназ с усилением фосфорилирования различных структурных белков и белков –

ферментов, дезагрегацию цитоскелета. Опосредованно, через активацию цикла АК, $Ca^{2+}$ стимулирует развитие окислительного свободнорадикального стресса. Кроме перечисленных явлений, $Ca^{2+}$ и ВАК при травме принимают активное участие в продукции газообразных медиаторов NO и CO.

При действии глутамата, опосредованном через NMDA – рецепторы, открываются потенциалзависимые кальциевые каналы аргининсодержащих нейронов, что позволяет ионам кальция проникать в клетку. В цитоплазме нейрона они связываются со своим рецептором кальмодулином, который в присутствии НАДФ активирует фермент NO-синтазу. Последняя, выделяясь из клетки, взаимодействует с соседними нейронами. Её рецепторной мишенью является атом железа в активном центре (имеющем структуру гема) молекулы гуанилатциклазы, что приводит к её активации и в конечном итоге к продукции цГМФ в клетках-мишенях. Таким образом, механизм действия оксида азота на клетку-мишень сходен с механизмом действия нейротрансмиттеров, опосредуемым через вторичный мессенджер, в связи с чем NO можно рассматривать как нетрадиционный нейротрансмиттер. Между тем, в ишемизированных участках мозга глутаматергические нейроны вместо физиологической порции нейротрансмиттера выделяют поток глутамата, который обрушивается на NO-синтезирующие нейроны, - так называемый глутаматный каскад [Choi D.W., 1988; Strosznajder J., 1994; Castillo J., 1997]. В этом случае воздействие нейротрансмиттера напоминает таковое при постсинаптической потенциации нейрона: разряды, следующие один за другим с высокой частотой, не позволяют потенциалзависимым кальциевым каналам закрываться, что ведёт к повышенному поступлению кальция в клетку и, как следствие, к повышению синтеза и выделения из нейрона оксида азота. Выделение больших количеств NO приводит не к продукции цГМФ, а к гибели окружающих нейронов. В этом случае NO-продуцирующие нейроны ведут себя как макрофаги. Подобного рода факты были подтверждены в опытах на культуре нейронов коры головного мозга куриных эмбрионов. Добавление NMDA в культуру даже на короткое время (не более 5 минут) вызывало гибель 90%

нейронов, тогда как ингибиторы синтеза NO (метил-, нитроаргинин) эффективно защищали нейроны, снижая их гибель на 73% [Dawson V.L. et al., 1991].

В новой и старой коре NO синтезируется преимущественно в тормозных ГАМК – эргических, содержащих НАДФН–диафоразу нейронах и эндотелиоцитах [Vincent S.R., Kimura H., 1992]. Авторы рассматривают подобные нейроны как нейросекреторные клетки, принимающие участие в регуляции сосудистого тонуса. Нейроны, содержащие НАДФН – диафоразу, NOS и способные синтезировать NO, обладающий выраженным сосудорасширяющим свойством, рассматриваются в качестве наиболее эффективного звена в регуляции мозгового кровообращения.

Таким образом, НАДФН – диафораза, являясь необходимым компонентом цепи образования NO в нейронах, глии, клетках сосудов мозга, играет значительную роль в механизмах ответа клеток мозга на физиологический и патологичнеский стресс посредством модуляции NOS – системы. Конечный эффект активации этой системы определяется длительностью и силой патологического воздействия. Вполне вероятно, что сублетальное ишемическое воздействие имеет эффект активации адаптивно – компенсаторных механизмов. Начальным звеном этих механизмов является активация эффекторных систем клеток мозга, которая приводит к образованию и накоплению вторичных мессенджеров (цАМФ, цГМФ, NO, ДАГ), последующей активации протеинкиназ, экспрессии генов, появлению и закреплению новых устойчивых долговременных свойств нейронов. При некротическом аноксическом воздействии на мозг вышеописанные механизмы не спасают нейроны от гибели в постаноксическом периоде [Dawson D.D. et al., 1992]. Кроме того, система образования NO принимает участие в разделении нейронной популяции мозга на группу резистентных и чувствительных к аноксии нейронов.

Следовательно, существуют механизмы прямого управления периферическим кровообращением со стороны нейронов мозга. Особое значение механизмы совокупного тормозного (на пирамидные эффекторные нейроны) и сосудорасширяюще-

го действия непирамидных NOS – позитивных нейронов приобретают в постгипоксическом периоде, когда NO – зависимое расширение сосудов и торможение пирамидных нейронов способствует сохранению клеток мозга. Особенно важно то, что NO наиболее эффективно регулирует деятельность нейронов глутаматергической системы мозга и при ее гиперреактивности может выполнять роль саногенетического механизма. Это связано с тем, что NO является стимулятором процесса апоптоза, являющегося универсальным механизмом элиминации «стареющих» и поврежденных клеток. Повышение в них уровня свободного, нехелированного железа, служащего активатором реакций Фентона и Габер–Уэйса в каскаде перекисного окисления липидов сопровождается индукцией синтеза оксида азота и реакцией нитрификации ДНК и РНК клеток [Новиков В.С., 1996; Blaylock M.G., 1998]. Апоптозная гибель части гиперреактивных нейронов имеет положительный (саногенетический) эффект для сохранения целостности мозга, так как предотвращает образование патологических детерминантных систем и формирование из них устойчивых доминантных систем типа эпилептической.

Термин «апоптоз» был предложен Д.Керром и его сотрудниками в 1972 г. для обозначения активного процесса разрушения клетки, характеризуемого её сжатием, агрегацией хроматина с обширной фрагментацией генома и пикнозом ядра. Цель этого процесса - удаление нежелательных клеток организма при таких процессах, как развитие, защитные реакции и старение. Процессы запрограммированной гибели клеток запускаются внешними сигналами, поступающими от рецепторов на поверхности клетки, или имеют внутриклеточное происхождение, связанное с действием фармакологических веществ или токсинов.

Многочисленные исследования выявили как нейропротекторный, так и нейротоксический эффект увеличения уровня NO [Горбачёв В.И., Ковалёв В.В., 2005; Dalkara T., Moskowitz M.A., 1994; Endoh M. et al., 1994]. Активация NO – продуцирующей системы в эндотелиоцитах и периваскулярных глиальных клетках имеет однозначный положительный эффект, а активация

NOS – системы нейронов – двойной эффект. При интенсивной стимуляции нейрональных глутаматергических синапсов активируется NO–синтаза и синтез оксида азота интенсифицируется в постсинаптической зоне. Оттуда NO выходит в межнейрональную жидкость, проникает в терминали и активирует гуанилатциклазу, повышая уровень цГМФ в терминалях и глии. При другом варианте NO синтезируется в терминалях и осуществляет последующее действие через гуанилатциклазную систему на постсинаптическую зону, гладкую мускулатуру сосудов. Малые концентрации NO оказывают в мозге нейропротекторное действие, а относительно большие, возникающие при интенсивном возбуждении, способствуют повреждению нейронов. Нейропротекторный эффект NO связан с повышением регионарного кровотока, торможением агрегации тромбоцитов, уменьшением адгезии тромбоцитов и нейтрофилов, эффектом блокады сопряженных с $Ca^{2+}$-ионными каналами NMDA рецепторов. Последнее снижает трансмембранный $Ca^{2+}$ ток, уменьшает его внутриклеточную концентрацию, а, следовательно, и патологический эффект $Ca^{2+}$-зависимой активации фосфолипаз, эндонуклеаз, протеаз и других ферментов.

Блокировка NMDA рецепторов происходит в результате соединения свободнорадикальных форм NO с тиоловыми группами NMDA рецепторов. Негативный нейротоксический эффект осуществляется в результате прямого токсического присоединения NO к железосерным комплексам, что приводит к ингибированию митохондриальных дыхательных ферментов, рибонуклеотидредуктазы, аконитазы. Присоединение оксида азота к тиоловым группам блокирует глицеролальдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Этот фермент катализирует первый этап гликолиза и гексозомонофосфатного шунта, является важным звеном образования НАДФ и поддержания интрацеллюлярного низкого уровня глутатиона [Реутов В.П. и др., 1998; Wink D.A., 1997].

Особенно важное значение в формировании церебрального вазоспазма в настоящее время отводят нарушению эндотелийзависимой релаксации сосудов мозга. Установлено, что эта релаксация ухудшается в крупных церебральных артериях при

экспериментальных моделях и в основной артерии пациентов после САГ. Рассматривается несколько механизмов, объясняющих эту дисфункцию.

В работе Карпюк В.Б. и соавт. (2001) приводятся данные о динамике показателей нитроксидергической системы, оцениваемой по уровню ближайшего стабильного метаболита оксида азота - нитрита, при церебральном вазоспазме, вызванном нетравматической субарахноидальной геморрагией. Снижение мозгового кровотока авторы объясняют нарушением процессов нитроксидергической вазорелаксации с развитием эндотелиальной дисфункции и более выраженным констрикторным влиянием на этом фоне. Причиной дефицита оксида азота по мнению авторов, является уменьшение его продукции из-за гибели NO-продуцирующих клеток. В пользу этого также говорят данные R. Govers (2001) о том, что уровни мРНК для эндотелиальной NO–синтазы снижены в церебральных сосудах приматов в состоянии вазоспазма.

По данным Asano T. (1992), после кровоизлияния нарушается активация растворённой гуанилатциклазы и продукция цГМФ. Уровни протеина и активность растворённой гуанилатциклазы – первичной мишени для оксида азота, а также уровни цГМФ снижены в моделях САГ на собаках и приматах.

Одну из возможных причин нарушения эндотелий-зависимой релаксации и вазоспазма объясняют действием гемоглобина на оксид азота. Концентрация оксигемоглобина и дезоксигемоглобина, активно связывающих NO, резко увеличена в церебральных периваскулярных пространствах при субарахноидальной геморрагии. Потерю активности оксида азота в присутствии оксигемоглобина и стимулированное последним перепроизводство эндотелина Карпюк В.Б. и соавт. (2001) также рассматривают как возможную причину отсроченного постгеморрагического церебрального вазоспазма.

В связи с высокой биологической активностью оксида азота, его действие на нервную ткань может быть двояким. В зависимости от его уровня в мозговой ткани, стадии патологического процесса, реактивности организма могут проявляться как нейропротекторный, так и нейротоксический эффекты. Ак-

тивация NO–продуцирующей системы в эндотелиоцитах и периваскулярных глиальных клетках, как правило, имеет положительный эффект. Малые концентрации оксида азота оказывают в мозге нейропротекторное действие, а относительно большие, возникающие при интенсивном возбуждении, способствуют повреждению нейронов.

Нейропротекторный эффект проявляется релаксацией церебральных сосудов, торможением агрегации тромбоцитов, уменьшением адгезии тромбоцитов и нейтрофилов, а также эффектом блокады сопряженных с $Ca^{2+}$-ионными каналами N-метил-D-аспартатных рецепторов за счет соединения оксида азота с их тиоловыми группами. Последнее снижает трансмембранный кальциевый ток, уменьшает внутриклеточную концентрацию ионов кальция, а, следовательно, и патологический эффект $Ca^{2+}$-зависимой активации фосфолипаз, эндонуклеаз, протеаз и других ферментов, лежащий в основе феномена «эксайтотоксичности», обусловленной взаимодействием избыточных концентраций возбуждающих нейромедиаторов (главным образом, глутамата) с NMDA-рецепторами.

В экспериментах на животных показано, что содержание NO в нервных клетках повышалось в условиях ишемии и последующей реперфузии по сравнению с интактным уровнем. Применение ингибиторов NO–синтазы в условиях ишемии приводило к увеличению области инфаркта мозга [Dawson D.A. et al., 1992]. Ингибируя выброс АКТГ, адреналина, норадреналина, оксид азота осуществляет стресс-протективную функцию. По мнению Семченко В.В. (1999), особое значение механизмы совокупного тормозного и сосудорасширяющего действия приобретают в постишемическом периоде, когда NO – зависимое расширение сосудов и торможение нейронов способствуют сохранению клеток мозга. До конца роль вышеуказанного механизма в патологии клеток мозга не выяснена. Вполне вероятно, что подобные реакции имеют двойственное значение в зависимости от индивидуальных особенностей метаболизма конкретных нейронов. Не выявлена также роль взаимоотношения NO – продуцирующей системы и эффекторных систем клетки (аденилатциклазная, фосфолипазная). Из-

вестно только то, что фосфорилирование белков NO – синтазы протеинкиназой С ингибирует ее активность [Baskys A., 1992]. Следовательно, нейромедиаторная активация метаботропных рецепторов, приводящая к активации протеинкиназы С, снижает уровень образования NO. Неизвестно, насколько эффективен этот механизм в регуляции образования всех изоформ NO – синтазы.

Прямой нейротоксический эффект оксида азота может осуществляться в результате присоединения его к железосерным комплексам, что приводит к ингибированию митохондриальных дыхательных ферментов, рибонуклеотидредуктазы, аконитазы. Нитрозирование тиоловых групп блокирует глицеролальдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Этот фермент катализирует первый этап гликолиза и гексозомонофосфатного шунта, является важным звеном образования НАДФ и поддержания интрацеллюлярного уровня глутатиона. Кроме того, высказано предположение, что оксид азота может присоединяться к ДНК и повреждать её цепь [Ванин А.Ф., 1999; Café C., 1993].

Непрямое цитотоксическое действие оксида азота осуществляется посредством воздействия свободнорадикальных производных – пероксинитрита, нитрогендиоксида, гидроксильного радикала, образующихся в результате взаимодействия NO с супероксидным радикалом и инициирующих перекисное окисление липидов. Оксид азота играет важную роль в свободнорадикальном статусе ткани мозга, богатой липидными соединениями, и исключительно чувствительной к процессам пероксидации. Пероксинитрит ($ONOO^-$), образующийся при взаимодействии NO с $O_2$- ($NO+O_2^- \rightarrow ONOO^-$; к~$7*10^9$ $M^{-1}*c^{-1}$), дает начало большому количеству оксидантов, играющих основную роль в ишемической гибели нейронов [Лобышева И.И., 1999; Alexander R.W., 1995; Cazevielle C., 1993; Wink D.A., 1996].

В связи с тем, что нейрональная форма NO–синтазы обнаружена только в глутаматергических гранулярных нейронах и ряде ГАМК-ергических нейронов, изучается роль оксида азота в патогенезе судорожных расстройств. Показано, что NO потенцирует токсическое действие глутамата при ишемии мозга и эпилептиформных судорогах. У животных с экспериментально

вызванными судорогами содержание оксида азота в мозге в 4-6 раз превышает интактный уровень, а введение ингибиторов NO–синтазы предотвращает возникновение судорог [Башкатова В.Г., 1998; Недвецкий П.И., 2000]. В настоящее время продолжается изучение значения оксида азота в ноцицептивной чувствительности, процессах памяти, а также в патогенезе таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона, Альцгеймера и др.

Нейротоксичность оксида азота, продуцируемого различными изоформами NO-синтаз определяется как стадией процесса, так и глубиной поражения мозговой ткани. По данным Викторова И.В. (2000) в начальном периоде превалирует, повидимому, экспрессия конституциональных NO-синтаз, имеющая целью компенсацию ишемии. В дальнейшем продукция оксида азота и других свободных радикалов резко возрастает, давая начало интенсивному оксидативному стрессу. Поскольку основная масса нейронов (около 98%) не содержит nNOS, их повреждение определяется экзогенным оксидом азота, источниками которого служат, помимо эндотелиоцитов, NOS-нейроны, активированные астроциты, содержащие как iNOS, так и nNOS, микроглия. При фокальной ишемии все эти клетки-продуценты находятся в перифокальной зоне ишемического очага, в то время как в зоне центрального некроза вышеперечисленные клетки утрачивают способность к продукции NO, за исключением привлеченных активированных нейтрофилов и макрофагов, содержащих iNOS.

Несмотря на неоднозначный эффект, вызываемый в результате активации нитроксидергической системы в головном мозге, в литературе преобладает мнение о положительном совокупном воздействии NO на нервную ткань. Семченко В.В. (1999) полагает, что NOS–содержащие нейроны мозга обладают повышенной резистентностью к повреждающим факторам, поскольку обладают НАДФН–диафоразной активностью. НАДФН–диафораза, являясь необходимым компонентом цепи образования NO в нейронах, глии, клетках сосудов мозга, играет значительную роль в механизмах ответа на ишемические процессы в мозговой ткани и отражает начальный этап актива-

ции различных систем, участвующих в восстановлении поврежденного мозга (эффекторные системы, биосинтез структурных белков и ферментов, экспрессия генов). В связи с этим, высказано предположение, что на начальном этапе возникновения ишемии активация нитроксидергической системы может оказывать благоприятное влияние за счет увеличения мозгового кровотока, но в более поздний период вызывает нейротоксический эффект, связанный с чрезмерным усилением свободнорадикальных процессов **(рис. 6)**.

Таким образом, важнейшие компоненты каскада патологических процессов при травматическом повреждении головного мозга представляются следующими:

1. Образование свободных радикалов и деструкция клеточных мембран в головном мозге на фоне угнетённого энергетического метаболизма.

2. Окисление накопившейся арахидоновой кислоты по липо-, оксигеназным путям с появлением БАВ, воздействующих на микроциркуляцию вообще и в головном мозге в частности, а также частично обладающих свойствами свободных радикалов.

3. Перераспределение ионов кальция, приводящее вместе с действием свободных радикалов к повреждению ДНК, белоксинтезирующих систем, протеолизу и появлению патогенных белков.

4. Поэтапные патологические изменения мозгового кровообращения с появлением фаз гипоперфузии, сочетающиеся с мозаичными микроциркуляторными нарушениями во всех структурах головного мозга.

5. Активация индуцибельной синтазы оксида азота, и реализация нейротоксического действия NO с последующей гибелью ряда ранимых образований мозга.

Многообразие патогенетических аспектов повреждения нервных клеток при черепно-мозговой травме подтверждает целесообразность изучения нарушений, развивающихся в звене нитроксидергической регуляции в различные стадии травматической болезни, с перспективой возможной коррекции этих нарушений, либо выбора дифференцированной тактики интенсивной терапии.

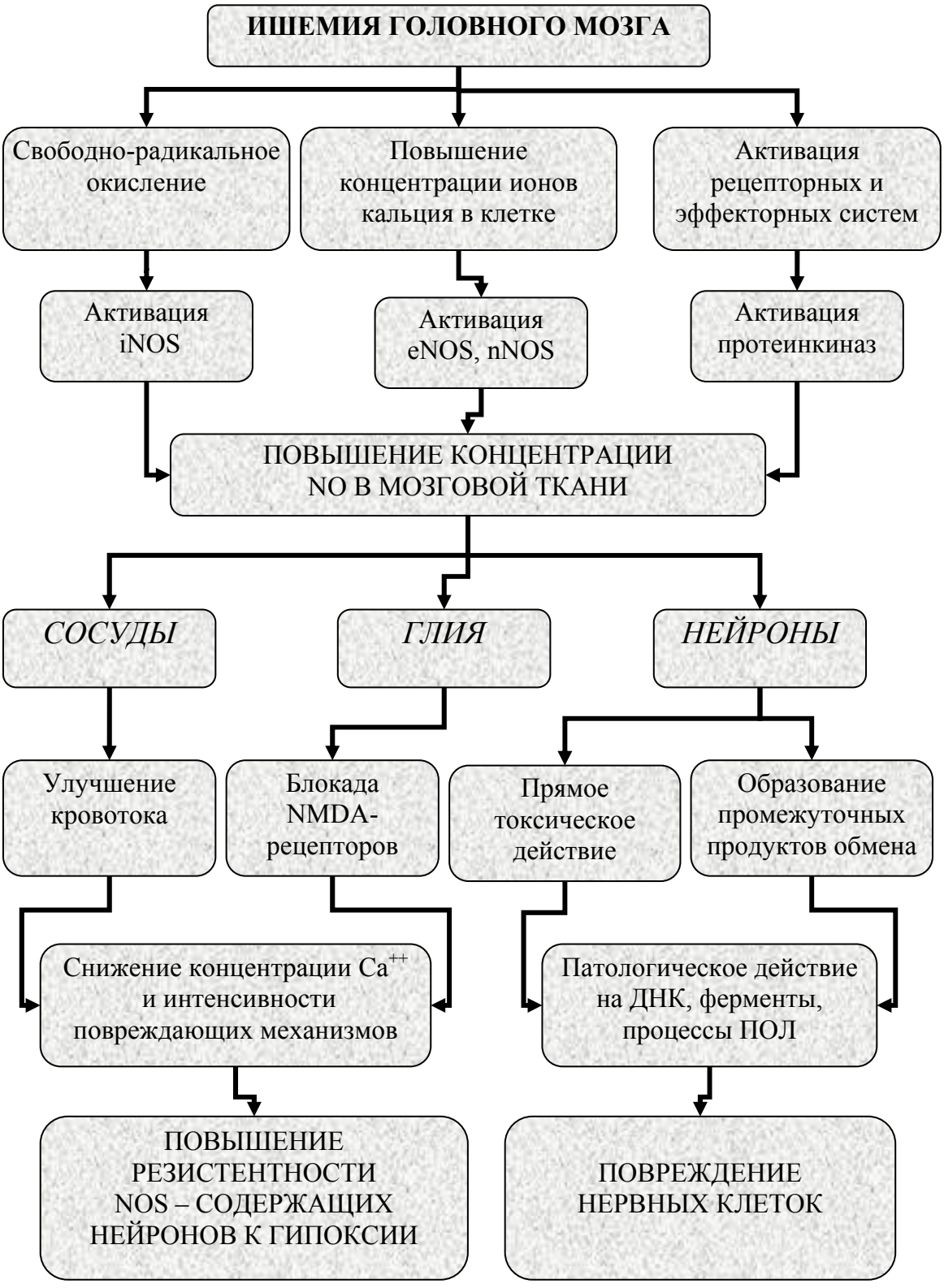



**Рис. 6. Механизмы активации, образования и роль NO в ишемической патологии головного мозга (по В.В. Семченко)**

## 2.4. Коррекция нитроксидергической системы в нейрореаниматологии

Внедрение фундаментальных достижений биологических исследований оксда азота в практическую медицину сопряжено с рядом трудностей, среди которых основные – недостаточная изученность нарушений в нитроксидергической системе при патологии головного мозга, а также практически полное отсутствие фармакологических средств, избирательно влияющих на продукцию или метаболизм этого соединения в организме. Тем не менее, проводится активный поиск препаратов, позволяющих воздействовать на развивающиеся патологические процессы. С целью направленного воздействия на систему нитроксидергической вазорелаксации возможны следующие подходы:

*1. Регуляция уровня субстрата.*

Имеются противоречивые сведения о влиянии экзогенного L-аргинина на активность нитроксидергической вазорелаксации. Имеются данные, что даже относительно высокие концентрации L-аргинина не влияют на тонус церебральных артерий и артериол и на мозговой кровоток в целом [Faraci F.M., 1992; He Z., 1995]. С другой стороны, в некоторых работах сообщается о низких и средних уровнях сосудистой дилатации в ответ на L-аргинин, когда его приём вызывал увеличение скорости мозгового кровотока у здоровых добровольцев, повышал содержание выдыхаемого NO и оказывал благоприятное влияние на гемодинамику у пациентов с легочной гипертензией [Micieli G. et al., 1997]. Это может быть связано с различной активностью аргиназы, которая экспрессируется в эндотелии и имеет общий субстрат с NO-синтазой. Аргиназа может нарушать синтез оксида азота путём снижения концентрации внутриклеточного аргинина. Применение ингибитора аргиназы дифторметилорнитина – DFMO в эксперименте вызывало увеличение продукции NO на 80% и значительно повышало вазодилатацию в ответ на аденозин и серотонин [Zhang C., 2001].

*2. Активация или ингибирование NO-синтазных энзимов.*

Базальная активность eNOS может быть стимулирована посредством увеличения внутриклеточного кальция. При ва-

зоспазме в гладких миоцитах также происходит увеличение концентрации внутриклеточного кальция, что ведёт к стойкой деполяризации мембраны и вазоконстрикции. Эффект применяемого при этой патологии блокатора кальциевых каналов нимодипина связан не только с восстановлением поляризации мембран, но и с высвобождением эндотелиального NO за счёт мобилизации кальция в гладкой мускулатуре сосудов мозга [Cohen R.A., 1997].

Наиболее сильными активаторами кальцийнезависимой iNOS являются ЛПС и цитокины, которые приводят к отсроченному, на 2-6 часов, выделению большого количества NO. ЛПС обладают сильной иммуностимулирующей активностью и токсичностью. Уже в небольших дозах они вызывают быструю активацию макрофагов с выделением провоспалительных цитокинов, а также экспрессию iNOS с прогрессивной вазодилатацией, вплоть до эндотоксического шока [Brian J.E., 1995; Suzukis S. et al., 1994].

Активность синтазы оксида азота ингибируется аналогами L-аргинина, такими как N-монометил-L-аргинин (L-NMMA), N-нитро-L-аргинин (L-NNA), N,N-диметил-L-аргинин (ADMA) и др. Эти соединения вызывали эндотелийзависимое сокращение церебральных артерий и снижали церебральный кровоток в эксперименте на приматах [Faraci F.M., 1995; McPherson R.W., 1995]. Кроме того, экспрессию iNOS блокируют глюкокортикоиды, что связано, скорее всего, с их влиянием на воспалительные и иммунные реакции, они также могут несколько улучшать церебральную перфузию за счёт индуцирования артериальной гипертензии.

*3. Влияние на уровень кофакторов.*

Кофактор $H_4$Б ($H_4$-биоптерин) необходим для активности многих ферментов и присутствует практически во всех типах клеток высших организмов. Показано, что увеличенная биодоступность $H_4$Б способствует увеличению продукции NO, и, наоборот, в артериях с истощенным запасом данного кофактора синтез NO значительно снижен [Kinoshita H., 1997]. Важен тот факт, что в присутствии кислорода происходит окисление $H_4$Б, которое приводит к образованию супероксидного аниона с по-

следующей химической активацией NO. В экспериментах на изолированных церебральных артериях собак установлено, что аутооксидация экзогенного $H_4Б$ приводит к нарушению эндотелийзависимой нитроксидергической вазорелаксации и вызывает сокращение сосуда. В связи с этим кажутся перспективными разработки по применению аскорбиновой кислоты, которая может защищать эндогенный $H_4Б$ от оксидации и тем самым трёхкратно увеличивать его внутриклеточный уровень [Heller R., 2001].

*4. Воздействие на метаболизм эндогенного оксида азота.*

В организме NO подвергается метаболизму в результате трёх основных реакций: 1) с супероксидным радикалом и липидной перекисью; 2) с белками, содержащими гемовое и негемовое железо; 3) с тиолами и вторичными аминами. Фармакологическое ингибирование функционально невыгодных путей метаболизма NO может способствовать его защите и оптимизации полезных нитроксидергических механизмов.

Реакция NO с супероксидным радикалом (имеющая важное значение для поддержания антиоксидантного статуса мозга) происходит в три раза быстрее, чем последний обезвреживается супероксиддисмутазой (СОД). Между тем, локальная концентрация СОД является важной детерминантой активности NO. С одной стороны, обработка сосудов ингибитором СОД диэтилтиокарбаматом приводит к выраженному нарушению нитроксидергической вазодилатации. С другой стороны, применение человеческой рекомбинантной СОД на кроличьей модели САГ даёт превентивный эффект. Интрацистернальное введение животным аутокрови в комплексе с СОД не сопровождается вазоспазмом [Laight D.W. et al., 1998; Shishido T. et al., 1994].

Эбселен – синтетический органический селеновый комплекс, который проявляет антиоксидантные свойства за счёт ингибирования перекисного окисления липидов и тем самым способствует стабилизации оксида азота. Обработка им основной артерии собак сопровождается инактивацией арахидоновой 5-липоксигеназы с уменьшением продукции гидроксиэйкозатетраноидной кислоты и оказывает протективный антиспасти-

ческий эффект [Watanable T., 1997]. В суточной дозе 20 мг/кг эбселен в значительной степени предупреждает уменьшение калибра средней мозговой артерии после индукции САГ у приматов [Handa Y. et al., 2000].

Скевенджер гидроксильных радикалов пропилендиникотинамид ((+/-)-N,N-propylenedinicotinamide – AVS) снижает частоту церебрального вазоспазма и вероятность развития отстроченного неврологического дефицита у пациентов после САГ [Yamamoto S. et al., 2000]. Известно, что гемовое железо взаимодействует с NO и катализирует генерацию свободных радикалов после САГ. Деферипрон (deferiprone) хелат железа, способен активно проникать через гематоэнцефалический барьер и эффективно редуцировать экспериментальный вазоспазм [Arthur A.S. et al., 1997].

*5. Введение экзогенного оксида азота.*

Химические доноры NO имитируют его эффекты. В их числе как истинные доноры, т.н. NO-NO-аты, динитрозильные и мононитрозильные комплексы железа, так и источники эндогенного оксида азота – моно-, ди-, и тринитраты, в частности, нитроглицерин[3]. Установлено, что нитраты эффективны для лечения церебрального вазоспазма. Их эффект связан с биотрансформацией в NO. Кроме того, имеются данные о том, что нитроглицерин способен увеличивать синтез эндогенного оксида азота [Sahach V.F., 2000].

В моделях на животных показано, что введение нитратов вызывает регресс и служит надежным методом профилактики развивающегося в ответ на САГ вазоспазма. При сравнительном анализе реактивности изолированных артериальных и ве-

[3] Нитроглицерин был впервые получен в 1846 году итальянским химиком Аскарио Собреро. Это вещество очень чувствительно и может детонировать даже при легком ударе. В 1862 году шведский химик Альфред Нобель приступил к промышленному изготовлению НГ на фабрике под Стокгольмом. В 1864 году там произошел взрыв, от которого погибло пять человек, в том числе младший рат Нобеля, Эмиль. В том же году Нобель обнаружил, что НГ можно сделать безопасным в обращении, смешав его с кизельгуром и в 1867 году запатентовал эту смесь под названием «динамит».

нозных сосудов на введение нитросодержащих препаратов выявлено, что чувствительность основной артерии превышает аналогичный показатель для коронарной, бедренной артерии, а также бедренной вены и подкожной вены голени, что свидетельствует о важной роли эндотелий-зависимых механизмов в регуляции местного церебрального сосудистого тонуса [Egemen N., 1993].

Интракаротидная инфузия доноров (диэтиламин-NO, пролин-NO), а также интраартериальная инфузия физиологического раствора, насыщенного растворённым NO, в эксперименте на приматах вызывала обратное развитие ангиографически подтвержденного вазоспазма среднемозговой артерии, увеличение регионарного мозгового кровотока и снижение его линейной скорости по данным доплерографии. Thomas J.E. (1997) приводит данные о том, что доноры оксида азота (нитропруссид натрия, нитроглицерин) вызывали регресс вазоконстрикции основной артерии кроликов, вызванной эндотелином, когда они применялись с адвентициальной стороны (эндолюмбальное введение).

Введение нитропруссида натрия в условиях оперативного вмешательства предотвращает развитие аксон-рефлексов, приводящих к ангиоспазму и, соответственно, к нарушению кровообращения в перифокальной зоне, и локализует очаг повреждения [Мальцев В.В., 2000]. Действие нитратов оказывается полезным в нормализации метаболизма мозговой ткани в условиях гипоксии и проявляется улучшением микроциркуляции за счет дилатации церебральных сосудов, а также снижением активности свободно-радикального окисления.

Оксид азота, выделяющийся при введении нитропрепаратов, по своему действию близок к продуцированному конститутиональными изоформами NO-синтазы и способен как вызывать вазорелаксацию, так и блокировать синтез индуцибельной NO-синтазы, позволяя избегать гиперпродукции NO, и, как следствие, увеличения образования гидроксильного радикала и пероксинитрита, участвующих в активации процессов перекисного окисления липидов и повреждении мембран клеток головного мозга.

В настоящее время идёт интенсивный поиск эффективных и безопасных форм препаратов и методов введения нитратов. В модели САГ на кроликах показано, что низкие дозы нитроглицерина, вводимые через кожу, способны селективно дилатировать спазмированные артерии без влияния на нормальные сосуды и системное кровообращение [Ito I. et al., 2000]. Возможность фармакологической нейтрализации гипотензивного эффекта нитроглицерина даёт дополнительные возможности для использования его в лечении церебрального вазоспазма. Однако нитраты могут оказывать и вредный цитотоксический эффект, вызывая оксидативное повреждение мозга за счёт генерации гидроксильных радикалов, активации перекисного окисления липидов. Это необходимо учитывать при изучении вопросов клинического использования данной группы препаратов в острой стадии, поскольку в этих условиях и так имеются грубые нарушения окислительного метаболизма в тканях головного мозга [Амчеславский В.Г., 1999].

Одно из главных возражений против введения нитросодержащих препаратов при ЧМТ заключается в увеличении ёмкости церебрального сосудистого русла, и, следовательно, ВМОК и ВЧД. Однако инфузия нитропруссида натрия переводит систему высокого давления (артериальную) в близкую по свойствам к системе низкого давления, в которой распределение кровотока подчиняется законам гравитации. По этой причине подъем головного конца кровати на 30-45$^{\circ}$ будет уменьшать приток крови к мозгу и уменьшать объём крови в мозге и внутричерепное давление [Мальцев В.В., 2000].

Кроме того, существенным недостатком нитровазодилататоров является их влияние на системную гемодинамику в виде снижения артериального давления и, соответственно, церебрального перфузионного давления, что может привести к увеличению степени ишемии в условиях существующего вазоспазма. У пациентов с рефрактерным к стандартной терапии церебральным вазоспазмом снижение степени последнего достигалось нитропруссидом натрия, вводимым интравентрикулярно, субарахноидально или непосредственно в область оперативного вмешательства интраоперационно [Проскуряков С.Я. и

др., 1999]. В экспериментах на кроликах показано, что низкие дозы нитроглицерина способны оказывать дилатирующее действие на спазмированные сосуды без существенного влияния на системную гемодинамику.

Ведётся поиск и синтез доноров NO с заданными свойствами. Так, не содержащий железа стабильный S-нитрозильный комплекс нитрозоацетилпеницилламин (SNAP) в модели на кроликах значительно ослабляет выраженность экспериментального вазоспазма без системной гипотензии и не вызывает оксидативного повреждения мозга [Kiris T. et al., 1999]. Применение у крыс после САГ N-нитрозоглутатиона (GSNO) по сравнению с контролем улучшает церебральный кровоток, увеличивает диаметр внутренней сонной артерии, уменьшает толщину сосудистой стенки и содержание внеклеточного глутамата. Этот препарат вызывает преходящее снижение артериального давления, в то время как показатели интракраниального и перфузионного давления не изменяются [Sehba F.A. et al., 1999].

Диазодиалаты («NONOates») – новый класс доноров оксида азота, содержащих X-[N(O)NO](-)-структурные единицы. «X-» является вторичной аминогруппой, способной спонтанно генерировать более двух молекул NO на -[N(O)NO](-)- единицу при распаде в водной среде. Эти соединения имеют относительно малый провоспалительный эффект и оказывают незначительное влияние на метаболизм. Они эффективны для лечения и предупреждения церебрального вазоспазма в экспериментах на животных [Fitzhugh A.L., 2000; Pluta R.M., 1997].

Новые доноры NO, металлосодержащие нитросоединения $CpCr(NO)_2Cl$ и $CpMo(NO)_2Cl$ вызывают дозозависимую вазорелаксацию колец аорты in vitro эффективнее нитроглицерина, и в отличие от последнего при их длительной экспозиции не развивается толерантность [Wang Y.X., et al., 2000].

Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) имеет важное преимущество перед другими известными донорами NO, так как представляет собой естественное биологическое соединение, которое образуется в результате взаимодействия NO, железа и белков, содержащих SH-группы. С помощью ДНКЖ

возможно направленное модулирование формирования физиологически активного депо NO в стенке кровеносного сосуда [Ванин А.Ф., 1998].

*6. Влияние на эффекторную систему NO/цГМФ*

При вазоспазме регистрируются недостаточная экспрессия гена гуанилат циклазы и пониженные уровни цГМФ, что приводит к ухудшению релаксации сосудв мозга в ответ на NO. Ингибиторы растворенной гуанилатциклазы используются в исследовании церебральной циркуляции, хотя некоторые из них могут иметь неспецифические эффекты [Marshall J.J., 1988]. Важным патогенетическим фактором ухудшения нитроксидергической вазодилатации является повышенный гидролиз цГМФ специфическим ферментом ФДЭ. В опытах с изолированными основными артериями свиней ингибиторы ФДЭ I типа (8-ММ-IBMX) и V типа (запринаст, дипиридамол) вызывали вазодилатацию, которая исчезала при удалении эндотелия и восстанавливалась донором NO – нитропруссидом натрия [Kruuze C. et al., 2001]. Роль ФДЭ IV типа в регуляции цереброваскулярного тонуса изучена на собаках. Ингибиторы данного изоэнзима полипрам и денбуфиллин вызывают быструю и полную релаксацию изолированных колец основной артерии экспериментальных животных [Willette R.N., 1997]. Милринон является мощным инотропом и вазодилататором, который расширяет сосуды за счёт ингибирования цАМФ-специфической ФДЭ IV типа по механизму, сходному с эффектом папаверина. Интраартериальное (в дозе 0,25 мг/мин, общая доза 2,5-15 мг) или внутривенное (0,5-0,75 мкг/кг в 1 мин) применение данного препарата эффективно для лечения пациентов с симптоматическим церебральным вазоспазмом [Arakawa Y. et al., 2001]. Олпринон (ингибитор ФДЭ III типа) при внутривенном введении в дозе 0,2 мкг/кг в 1 мин улучшает церебральный кровоток у пациентов после ишемического инсульта и аневризматической САГ [Sato K., Yoshimoto A., 2001].

Необходимо отметить, что не только стимуляция, но и ингибирование активности NO может быть полезным у пациентов с острой нейрохирургической патологией. Во-первых, резкое снижение синтеза или активности NO, которое наблюдается на

3-7-е сутки заболевания и способствует вазоспазму, всегда следует после короткого периода его гиперпродукции в первые сутки [Карпюк В.Б., 2001]. Скорее всего, это происходит из-за срабатывания регуляторного механизма отрицательной обратной связи и/или истощения системы генерации оксида азота [Малышев И.Ю, 1998]. Можно предположить, что если с помощью ингибиторов NO вовремя предотвратить первую фазу, вторая не разовьётся вовсе или будет менее выражена. Во-вторых, наблюдаемый у некоторых пациентов на 2-3-й неделе заболевания избыточный синтез NO может оказывать вредные эффекты за счёт цитотоксичности его метаболитов, атонии сосудов, гиперпродукции ликвора и повышения внутричерепного давления.

Таким образом, в фармакологической коррекции, очевидно, наиболее перспективными являются изучение NO-зависимых механизмов в действии уже известных вазоактивных препаратов, а также поиск новых лекарственных средств, способных целенаправленно воздействовать на генерацию оксида азота в организме.

# ГЛАВА 3.

# СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА ОКСИДА АЗОТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ, ИХ ДОСТОИНСТВА И НЕДОСТАТКИ

Основные трудности, связанные с изучением и определением оксида азота – это малая величина времени его полужизни в физиологических условиях (~ 6 с) и высокая биологическая и химическая активность. Вследствие этого, большинство методов, направленных на определение уровня оксида азота, являются косвенными и основаны на регистрации продуктов окисления, выделяемых в биологических системах, ферментов - «маркеров», либо вызываемых им физиологических эффектов.

В настоящее время в биомедицинских исследованиях разработаны и применяются следующие методы, позволяющие оценить функциональный статус нитроксидергической системы:

1). *Определение ближайших стабильных метаболитов NO* – нитрита и нитрата в различных биологических жидкостях организма – кровь, моча, слюна и др. [Карпюк В.Б. и соавт., 2000; Голиков П.П. и соавт., 2000]. Является одной из наиболее популярных методик, но главным её недостатком является отсутствие доказанной прямой коррелятивной связи между содержанием оксида азота и его метаболитов в организме. Низкую точность и большую ошибку определения может обусловливать возможность восстановления экзогенных нитратов, что имеет место при терапии нитросодержащими препаратами, либо при поступлении нитратов с пищей. Кроме того, не весь оксид азота, синтезируемый в организме, окисляется до нитритов и нитратов, часть его связывается редуцированным гемоглобином с образованием метгемоглобина, а остальное количество реагирует с молекулами активного кислорода с образованием

пероксинитрита, нитрогендиоксида, гидроксильного радикала и других производных. Также эта методика не позволяет оценить уровень оксида азота в режиме реального времени, т.к. содержание метаболитов является скорее результирующим показателем, нежели отражает мгновенное содержание NO в организме. Главными достоинствами являются относительная простота и дешевизна метода, отсутствие потребности в дорогостоящей аппаратуре.

Чаще всего используют фотоэлектроколориметрические методы, основанные на окрашивании нитрита в присутствии реактива Грисса, а уровень нитрита определяют по калибровочной кривой. При определении нитрата, являющегося одним из конечных метаболитов оксида азота в организме, производят его восстановление до нитрита с использованием кадмиевых колонок с медным покрытием [Chamandari E. et al., 2001], либо нитратредуктазы [Вавилова Т.П., 1991; Bories P.N. et al., 1999].

Определённое научно-практическое значение имеют методы определения стабильных метаболитов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [Everett S.A. et al., 1995] и капиллярного электрофореза [Bories P.N. et al., 1999].

2). *Изучение различных изоформ NO-синтаз* (конститутивных и индуцибельных) в качестве ферментов, осуществляющих биосинтез оксида азота в организме. Иммуногистохимический метод достаточно точен и удобен, однако не позволяет проводить измерение in vivo, поскольку требует исследования гистологических препаратов (срезы органов и тканей), поэтому чаще используется в экспериментальных исследованиях на лабораторных животных [Гервазиев Ю.В., 1999; Зенков Н.К., 2000; Меньщикова Е.Б., 2000; Реутов В.П., 2000 и др.; Furakawa K., 1996].

3). *Определение НАДФН-диафоразы,* которая может служить маркером для конститутивных NO-синтаз (эндотелиальной и нейрональной) – гистохимический тетразолиевый метод [Kelm M., 1991; Loesh A., 1993; Сахарова А.В., 2000]. Имеет недостатки, присущие предыдущему методу, кроме этого не является достаточно селективным по отношению к оксиду азота. Наиболее широко применяется в экспериментальных иссле-

дованиях, посвящённых изучению нейротропных эффектов оксида азота (протекторное и токсическое действие в мозговой ткани).

4). *Выявление депо оксида азота гистохимическим окрашиванием по двухвалентному железу,* основанное на образовании в организме динитрозильных комплексов железа [Манухина Е.Б., 1997; Flitney F.W., 1992]. Метод также требует изучения срезов органов и тканей, и, следовательно, не применим в клинической практике.

5). *Метод фоторелаксации,* основанный на разрушении депо NO введением N-ацетилцистеина или диэтилтиокарбамата с образованием вазоактивных продуктов; при этом объем депо оценивают по степени расслабления сосуда [Ванин А.Ф., 1999, Muller B., 1996]. Применяется в экспериментальных исследованиях для изучения регулирующего влияния оксида азота на местный кровоток и сосудистый тонус.

6). *Определение уровня метгемоглобина (Hb-NO)*, являющегося продуктом взаимодействия оксида азота с восстановленным железом гема, основано на физико-химических свойствах оксида азота, имеющего сродство к гемоглобину, в 20 раз превышающее таковое для кислорода. Имеет большую ошибку, низкую чувствительность, невысокую селективность, требовательно к условиям забора и транспортировки пробы крови. Кроме этого, метгемоглобин может определяться в крови пациентов при ряде патологических состояний (острые отравления, терапия метгемоглобинобразующими препаратами и др.).

7). *Метод стимулирования гуанилатциклазы,* основанный на биорегуляторном влиянии оксида азота на активность этого фермента, предполагает изучение вызываемых им физиологических эффектов. Сложен в воспроизводстве и неоднозначен в интерпретации результатов, поскольку до настоящего времени до конца не изучен комплекс механизмов регуляции сложных внутриклеточных реакций [Северина И.С., 2000].

8). *Антиагрегационный метод,* в основе которого лежит способность оксида азота тормозить агрегацию тромбоцитов и влиять на гемокоагуляционный потенциал. Его применение в клинической практике практически не осуществимо, а также

ограничено в экспериментальных работах. Как известно, помимо оксида азота, достаточно большое количество различных метаболитов, низко- и крупномолекулярных соединений, гормонов способно оказывать аналогичное воздействие, что резко снижает селективность определения.

9). *Измерение концентрации L-цитруллина,* образующегося в результате биосинтеза NO, в ряде исследований используется для оценки продукции оксида азота в организме, однако не является достаточно точным и достоверным, в связи с чем не получило широкого распространения.

10). *Хемилюминесцентный метод* считается одним из наиболее чувствительных и позволяет вести измерения в режиме реального времени [Харитонов С.А. и др., 1997; Вознесенский Н.А. и др., 1998; Малышев И.Ю., 1999; Akiyama K, 1998]. При этом проводят спектрофотометрическое определение содержания нитритов в конденсате выдыхаемого воздуха. При этом в результате реакции NO с озоном, генерируемым анализатором, образуется молекула нитрита с высокоэнергетическим электроном, испускающим фотон, который и регистрируется датчиком. Хемилюминесцентные анализаторы позволяют проводить измерения NO в выдыхаемом воздухе с точностью до десятых долей ppb в пределах от 1 ppb до десятков ppm. Метод перспективен при ингаляционной терапии экзогенным оксидом азота, позволяя проводить его мониторинг во вдыхаемой и выдыхаемой смеси при лечении синдрома легочной гипертензии в кардиохирургии и интенсивной терапии синдрома острого повреждения лёгких. Недостатком, как и для всех вышеперечисленных методов, является косвенное определение оксида азота, основанное на регистрации его метаболитов.

11). «Золотым стандартом», на который ориентируются большинство исследователей, в настоящее время является разработанный Ваниным А.Ф. (1984 г.) прямой количественный метод, позволяющий оценивать скорость генерации оксида азота по включению последнего в комплексы с двухвалентным железом и диэтилтиокарбаматом. Вводимый в организм в диамагнитной форме динитрозильный комплекс железа под действием оксида азота в организме превращается в парамагнитную

форму, что позволяет использовать для его детекции *метод электронного парамагнитного резонанса* (ЭПР). К недостаткам данного метода относятся техническая сложность методики; дороговизна используемой аппаратуры, а также необходимость введения в организм экзогенных субстратов (Na-ДЭТК, раствор цитрата железа), что исключает возможность его использования в клинической практике. Главным недостатком является воспроизводимость указанной методики только в экспериментах на лабораторных животных, поскольку она предполагает ЭПР-анализ образцов, взятых из замороженных в жидком азоте органов и тканей. Тем не менее, метод электронного парамагнитного резонанса в силу высокой точности и надёжности является одним из наиболее достоверных в биомедицинских исследованиях.

Часть отмеченных трудностей позволяет преодолеть запатентованный в 1999 году усовершенствованный вариант метода, согласно которому комплекс двухвалентного железа, способный связывать NO, помещается в пакет из полупроницаемой полимерной мембраны, например, из полидиалкилсилоксана (силиконовая резина). Этот зонд доставляется в организм пациента (либо хирургическим путем, либо под язык) и выдерживается там определенное время, необходимое для проникновения оксида азота через мембрану и образования адекватного количества нитрозильного комплекса железа. Затем зонд извлекается и производится определение *ex vivo* содержания оксида азота методом ЭПР-анализа. К сожалению, подобные исследования доступны лишь в крупных научно-исследовательских институтах, оснащённых дорогостоящей аппаратурой.

12). *Квантовые (лазерные) методики,* основанные на регистрации спектра, вызванного облучением исследуемого объекта волнами определенной длины и частоты, несомненно, заслуживают большого внимания, но в литературных источниках нет указаний на их успешное применение в биологических объектах. В настоящее время они находятся в стадии экспериментальной разработки.

13). Рост интереса к определению уровня оксида азота непосредственно в биологических системах *(in vivo)* требует чувствительного и селективного метода для измерения его малых концентраций. С учётом этих позиций, *электрохимический метод* является одним из наиболее перспективных среди аналитических подходов к мониторингу уровня оксида азота, а использование сенсорных электродов позволяет вести подобные измерения.

Известны несколько работ, нацеленных на создание электрохимических датчиков, пригодных для прямого определения содержания оксида азота в биологических объектах. Так, в работе Shibuki K. (1990) сообщено о создании датчика, основанного на миниатюрном электроде Кларка, в котором платиновый рабочий электрод и серебряный электрод сравнения помещены внутри микропипетки, заполненной электролитом. Открытый конец пипетки запечатан тонкой мембраной из хлоропренового каучука, допускающей проникновение газов (в том числе NO) к рабочему электроду, одновременно исключая доступ других веществ. Использование такого датчика позволило получить данные о синтезе оксида азота в срезе ткани мозжечка крысы. Имеются, однако, некоторые существенные недостатки в этом проекте, среди которых трудность подготовки и недолговечность датчика являются наиболее существенными.

В 1997 г. был запатентован сенсор на оксид азота, в котором аналитическим сигналом служит ток окисления NO на рабочем электроде из углеродных материалов, модифицированных электрополимеризацией на поверхности пленки тетракис-(3-метокси-4-гидроксифенил)-порфирина никеля и затем покрытых слоем Nafion® [Malinski T., 1997]. Были предприняты попытки продемонстрировать возможность использования таких датчиков для определения NO в биологических системах, однако чувствительность сенсорного электрода была недостаточно высокой [Espadas-Torre C. et al., 1997]. Так, концентрация NO, соответствующая нормальному физиологическому уровню, была ниже предела обнаружения. Выделение NO удавалось обнаружить только при добавлении в систему вещества, стимулирующего его синтез.

Электрохимические датчики для определения оксида азота постоянно совершенствуются. Важными задачами являются повышение чувствительности, селективности и стабильности сенсорных электродов, а также их миниатюризация. В последние годы появились коммерческие продукты, представляющие собой электрохимические сенсоры на NO в сочетании с приборным и программным обеспечением. Например, фирма World Precision Instruments (WPI) предлагает линейку сенсоров на NO, обеспечивающих предел обнаружения 0.3-0.5 nM NO. Следует отметить, однако, что столь низкие пределы обнаружения были достигнуты при исследовании характеристик датчиков в модельных системах – фосфатных буферных растворах. В имеющейся литературе пока отсутствуют данные о результатах применения этих коммерческих продуктов в реальных биологических системах.

Физико-химические свойства NO позволяют проводить его окисление при потенциалах, близких к +0.80 В (Ag/AgCl) на гладких электродах, однако использование катализаторов, модифицирующих их поверхность, позволяет улучшить как чувствительность, так и стабильность сенсоров. Существенным требованием к амперометрическому датчику является покрытие поверхности электрода тонким слоем модификатора, который позволяет ионный транспорт, чтобы обеспечить электропроводимость. Это условие делает необходимым использование для модификации ионообменников или композитных материалов, где, по крайней мере, один из компонентов ионный. Также необходимо, чтобы модифицирующие агенты были водонерастворимы.

Нитрит, аскорбат и другие (обычно анионные) вещества, содержащиеся в биологических средах, могут серьезно мешать количественному определению. Влияние нитрита наиболее серьезно, так как он не только окисляется при потенциалах, близких к таковым для оксида азота, но и, кроме того, является одним из преобладающих продуктов его окисления. Аскорбат, с другой стороны, окисляется при значительно менее положительных потенциалах и, таким образом, обусловливает высокий фоновый ток. Кроме того, адсорбция белков, содержащихся в

биологических жидкостях в значительном количестве, может также представлять трудности, блокируя поверхность электрода. Учитывая, что большинство веществ, мешающих определению оксида азота, являются анионами или отрицательно заряжены при физиологических значениях pH, использование анионных модификаторов представляется желательным и оптимальным. Нанесение на электродную поверхность нафионовой мембраны, препятствующей проникновению к рабочей области электрода отрицательно заряженных ионов, предотвращает побочные процессы их окисления, которые затрудняют определение оксида азота.

В сравнении с перечисленными прямыми и непрямыми методами определения оксида азота в биологических системах, электрохимический мониторинг имеет существенные преимущества. Основанный на окислении оксида азота на электроде под воздействием электрохимических процессов, он является прямым, не зависит от присутствия посторонних субстратов и не предполагает введения в организм каких-либо веществ и соединений, способных оказать отрицательное влияние на метаболические процессы. Имеется возможность проводить определение оксида азота в динамике и исключается этап предварительной подготовки образцов органов и тканей (введение экзогенных субстратов, взятие образцов, их заморозка). Эти обстоятельства, а также относительная доступность оборудования делают электрохимический метод одним из наиболее перспективных для оценки продукции оксида азота в организме.

Таким образом, большое количество разнообразных подходов к мониторингу оксида азота, применяемых в настоящее время в биомедицинских исследованиях, свидетельствует об отсутствии простого, точного и доступного метода, позволяющего проводить подобные измерения. Одни из них позволяют достичь высокой степени надежности и воспроизводимости, однако отличаются технической сложностью и дороговизной. Другие относительно просты и доступны, но точность определения далека от желаемой для подобного рода исследований. Большинство из разработанных методов по своей сути являются косвенными, прямые же либо получили сугубо эксперимен-

тальное применение, либо отличаются технической сложностью и требуют дорогостоящей аппаратуры и высококвалифицированного персонала.

В клинической практике наиболее доступны методы, основанные на регистрации метаболитов оксида азота, однако до сих пор отсутствует доказательная база, позволяющая интерпретировать получаемые данные нитритов и нитратов в качестве маркеров нитроксидергической системы и не изучено их соотношение в биологических жидкостях организма.

# ГЛАВА 4.

# ПРЯМОЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКСИДА АЗОТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ОРГАНИЗМА

## 4.1. Методика прямого электрохимического определения оксида азота [4]

При определении содержания оксида азота в биологических средах организма (цельной крови, плазме и ультрафильтрате крови) нами был использован прямой электрохимический метод, в основе которого лежит процесс окисления оксида азота на модифицированных стеклоуглеродном и углеволоконном электродах. С целью тестирования чувствительности и селективности сенсорного электрода применяли циклическую вольтамперометрию, которая предполагает линейное изменение потенциала во времени. При наложении на рабочий электрод линейной развертки потенциала получали вольтамперную кривую с характерным максимумом тока. Форма кривой зависит, как правило, от материала электрода, значение потенциала максимума – от природы реагента, а величина тока максимума – от его концентрации в растворе.

Для количественной оценки применяли метод амперометрии, заключающийся в измерении зависимости величины тока от времени при постоянном потенциале рабочего электрода. Значение потенциала выбирали таким, чтобы при нём происходило окисление оксида азота. При введении в ячейку раствора пробы происходило изменение величины тока, пропорциональ-

[4] Исследования проводились на базе кафедры общей и неорганической химии Иркутского государственного университета (зав. кафедрой – доктор химических наук, профессор А.Ю. Сафронов) совместно со старшим научным сотрудником А.В. Кашевским.

ное концентрации исследуемого субстрата, которое регистрировали с помощью автоматического самописца.

Потенциодинамическая установка, на которой проводили измерения оксида азота, включала потенциостат ПИ-50-1, двухкоординатный потенциометр ЛКД4-003, вольтметр цифровой III-1413, программатор ПР-8 и рабочую электрохимическую ячейку **(рис. 7)**.

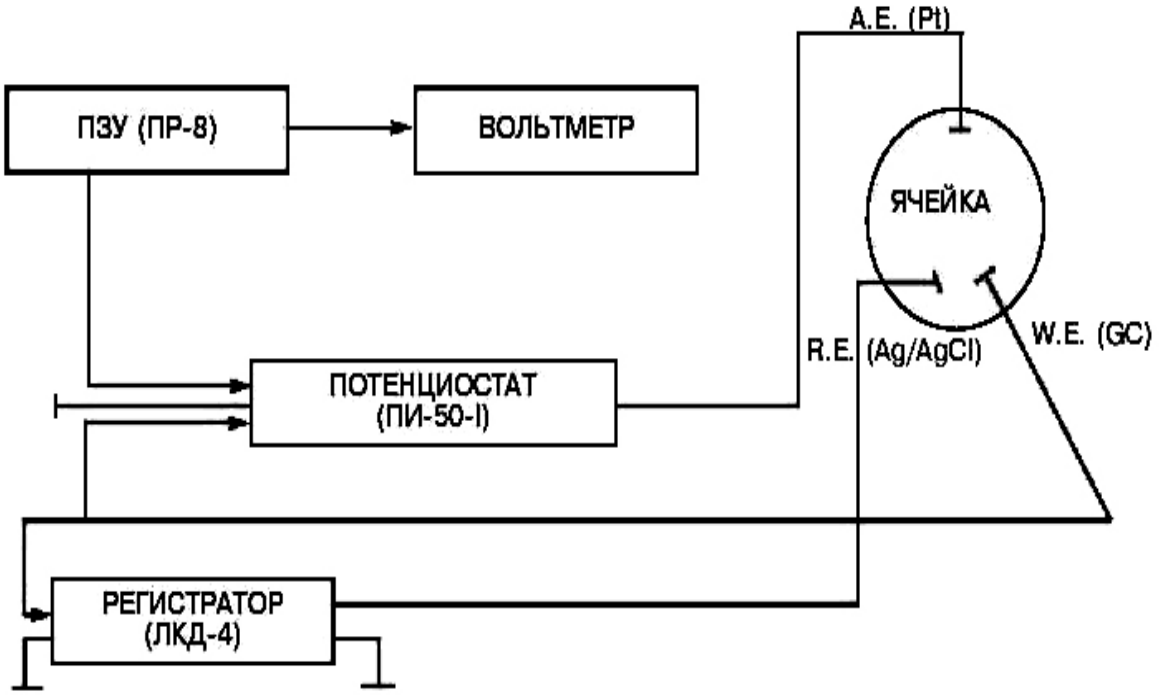



**Рис. 7. Потенциодинамическая установка**

Оксид азота для эксперимента получали по реакции:

$$Fe^{2+}+NO_2^-+2H^+ \rightarrow Fe^{3+}+\mathbf{NO}+H_2O$$

При этом проводили медленное добавление 40% раствора нитрита калия к смеси, содержащей равные объёмы 20% раствора сульфата железа (II) и раствора концентрированной соляной кислоты. Очистку полученного газа проводили путём последовательного пропускания его через две склянки с крепким раствором NaOH и склянку с бидистиллированной водой.

Для получения насыщенного раствора полученный оксид азота пропускали через фоновый раствор в течение десяти минут при измерениях в стационарных и двадцати минут в динамических условиях. Согласно литературным данным, концен-

трация насыщенного раствора оксида азота составляет 2 ммоль [Zhang X. et al., 2000].

Образец биологической жидкости помещали в электрохимическую ячейку, состоявшую из трёх электродов - рабочего (W.E.), вспомогательного (R.E.) и сравнения (A.E.), объём которой составлял 25 мл **(рис. 8)**.

Рабочий электрод представлял собой стеклоуглеродный стержень, помещённый в инертное тело электрода таким образом, что рабочей поверхностью являлась только торцевая часть стержня площадью 7,7 мм$^2$. Электродом сравнения служил хлорсеребряный (Ag/AgCl) электрод BAS RE-1B. В качестве вспомогательного электрода использовали платиновую пластину, опущенную в исследуемый раствор. Фоновым электролитом являлся фосфатный буферный раствор с концентрацией $KH_2PO_4$ 0,1 М и pH=7,0. Величину pH определяли при помощи иономера ЭВ-74.

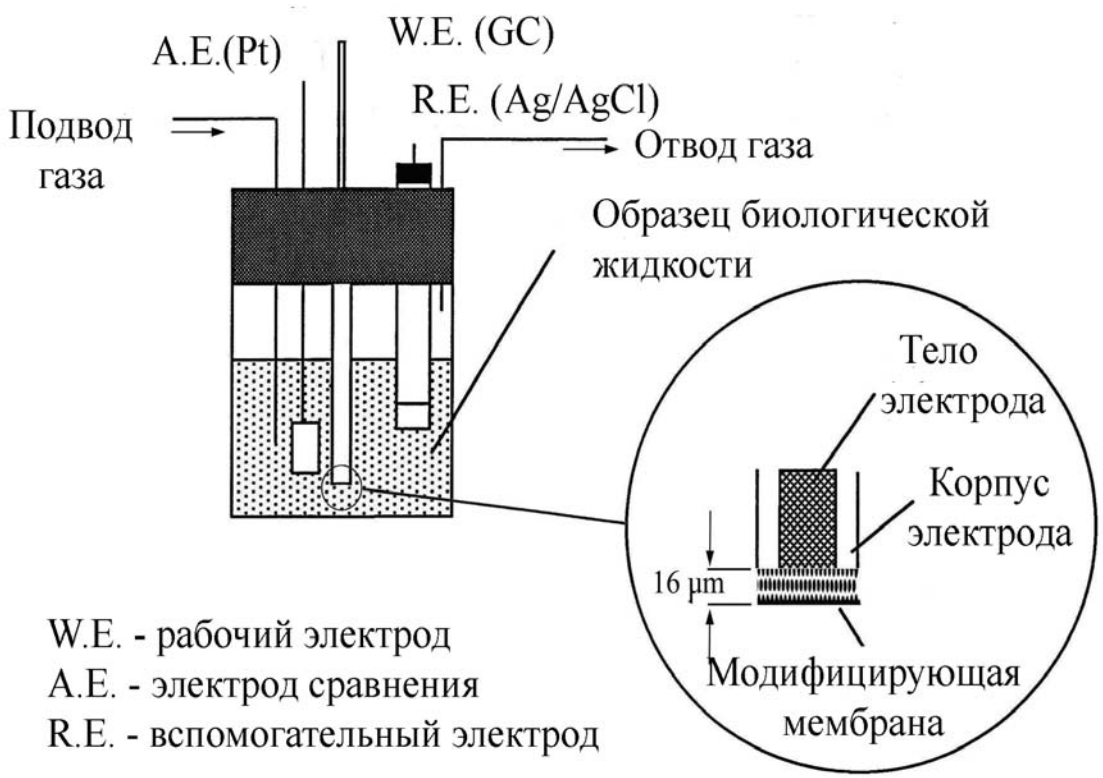



**Рис. 8. Рабочая электрохимическая ячейка**

Перед каждым экспериментом подготовку стеклоуглеродного электрода проводили следующим образом: рабочую поверхность полировали с помощью порошка оксида алюминия, затем выдерживали электрод в ультразвуковой ванне в течение 7 минут для удаления с поверхности твёрдых частиц и промывали бидистиллированной водой. Ячейку и другую стеклянную посуду обрабатывали горячей смесью концентрированной серной кислоты с 30% раствором пероксида водорода, затем многократно промывали горячей проточной и бидистиллированной водой.

Для создания инертной атмосферы через раствор в электрохимической ячейке пропускали аргон в течение десяти минут для измерений в стационарных и двадцати минут в динамических условиях.

Измерения проводили в интервале потенциалов от 0 до +1,0В. Скорость развертки потенциалов во всех экспериментах составляла 20 мВ/с. Значения потенциалов указаны в шкале хлорсеребряного электрода сравнения. Измерения проводили при комнатной температуре, а также в термостате при температуре 37°С.

## 4.2. Изучение свойств электрохимической ячейки в статическом и динамическом режимах

Для получения первичной информации об электрохимических свойствах исследуемой системы были измерены вольтамперограммы в чистом буферном растворе и в насыщенном растворе оксида азота **(рис. 9)**.

На вольтамперной кривой, измеренной в буферном растворе *(кривая 1)*, никаких эффектов не наблюдалось, что свидетельствует о том, что в данной области потенциалов никаких электрохимических процессов в системе не происходит. На вольтамперограмме, измеренной в насыщенном растворе NO *(кривая 2)*, наблюдался рост тока, имевший два участка с разным наклоном. Первый, от +0,58 до +0,79В, соответствует окислению оксида азота, так как, согласно литературным данным, потенциал его окисления по шкале хлорсеребряного элек-

трода составляет +0,8В [Lantoine F., 1995]. Второй участок соответствует окислению $NO_2^-$, потенциал окисления которого +1,0В. Поскольку потенциалы окисления NO и $NO_2^-$ близки, их раздельное определение затруднено.

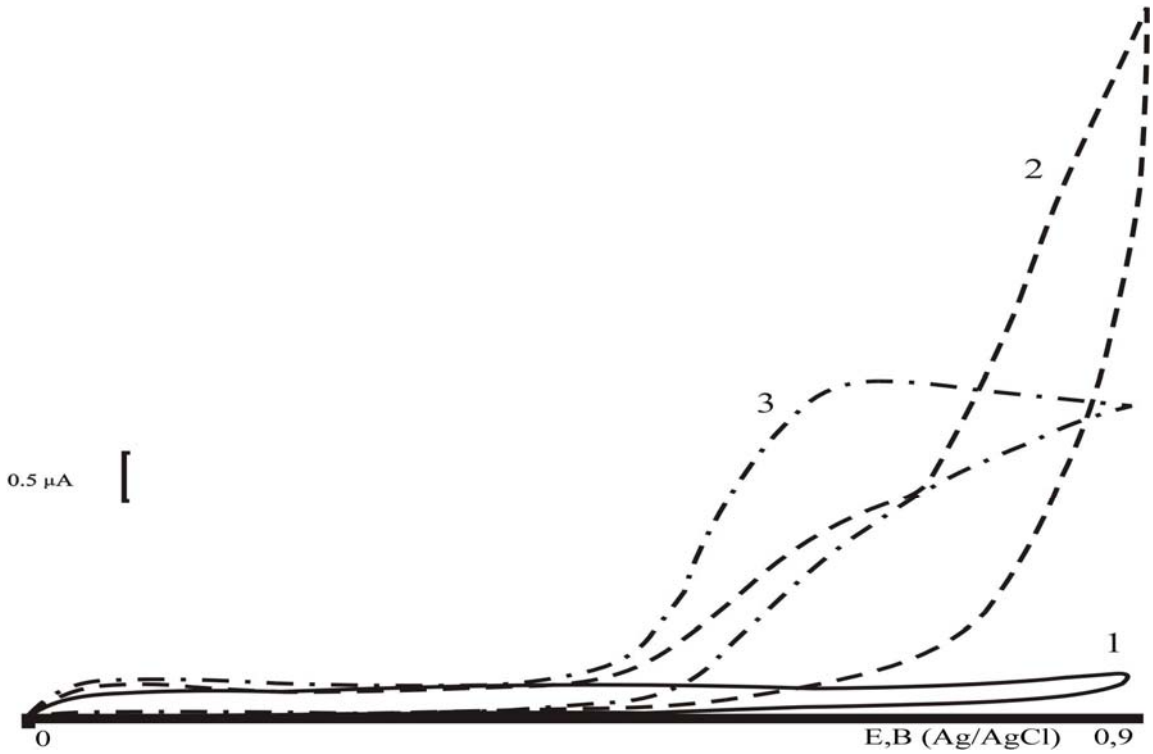



**Рис. 9. Циклические вольтамперограммы для системы NO-фоновый раствор в статических условиях**
(1 - фон, 2 – гладкий электрод, 3 – модифицированный электрод)

Чтобы избавиться от мешающего влияния нитрита, поверхность электрода модифицировали анионообменным полимером – нафионом:

$$[(CF_2CF_2)_nCFCF_2]_x$$
$$|$$
$$(OCF_2CF)_mOCF_2CF_2SO_3H$$
$$|$$
$$CF_3$$

Модифицирование проводили путем нанесения на поверхность электрода 5% водно-спиртового раствора нафиона объёмом 10 мкл. Электрод сушили при комнатной температуре в течение 40 минут, а затем в сушильном шкафу при 60°С в те-

чение того же времени. После этого электрод выдерживали в буферном растворе в течение суток для набухания полимера. В результате происходит депротонирование нафиона и полимерная плёнка приобретает равномерный отрицательный заряд по всей поверхности.

На модифицированном электроде была измерена вольтамперограмма для насыщенного раствора NO *(кривая 3)*. На ней наблюдалась волна анодного тока при потенциале +0,8В. Рост анодного тока, соответствующий окислению нитрит-ионов, отсутствовал вследствие того, что $NO_2^-$ не проникает к поверхности электрода по причине электростатического отталкивания. Таким образом, нафионовая плёнка помогает избавиться от мешающего влияния нитрит-ионов, но не препятствует окислению оксида азота.

Реальные биологические системы являются динамическими, поэтому для приближения к ним была изготовлена установка с проточной электрохимической ячейкой, в боковую поверхность которой на разных уровнях были впаяны вводная и выводная стеклянные трубки, соединённые посредством силиконовых шлангов с роликовым насосом марки АКСТ, обеспечивавшим циркуляцию раствора. Проточная ячейка моделировала ток крови в кровеносном сосуде. Скорость движения раствора составляла 80 мл/мин, объём системы – 34 мл.

Изучение системы NO-фоновый раствор проводили по той же схеме, что и в статических условиях. Были измерены вольтамперограммы для фонового раствора, а также в присутствии NO **(рис. 10)**.

На вольтамперограмме, измеренной в насыщенном растворе NO на немодифицированном электроде *(кривая 2)*, наблюдался рост тока при потенциалах, анодnее +0,65В. Это соответствует, вероятно, окислению как самого оксида азота, так и нитрита. Если сравнить эти данные с результатами, полученными в статических условиях, то можно отметить незначительное смещение начала роста тока в анодную область потенциалов и, одновременно, изменение формы эффекта (отсутствие двух участков с разным наклоном).

Такие отличия можно объяснить тем, что в проточной ячейке происходит перемешивание раствора и, поэтому, невозможно отделить процесс окисления NO и $NO_2^-$.

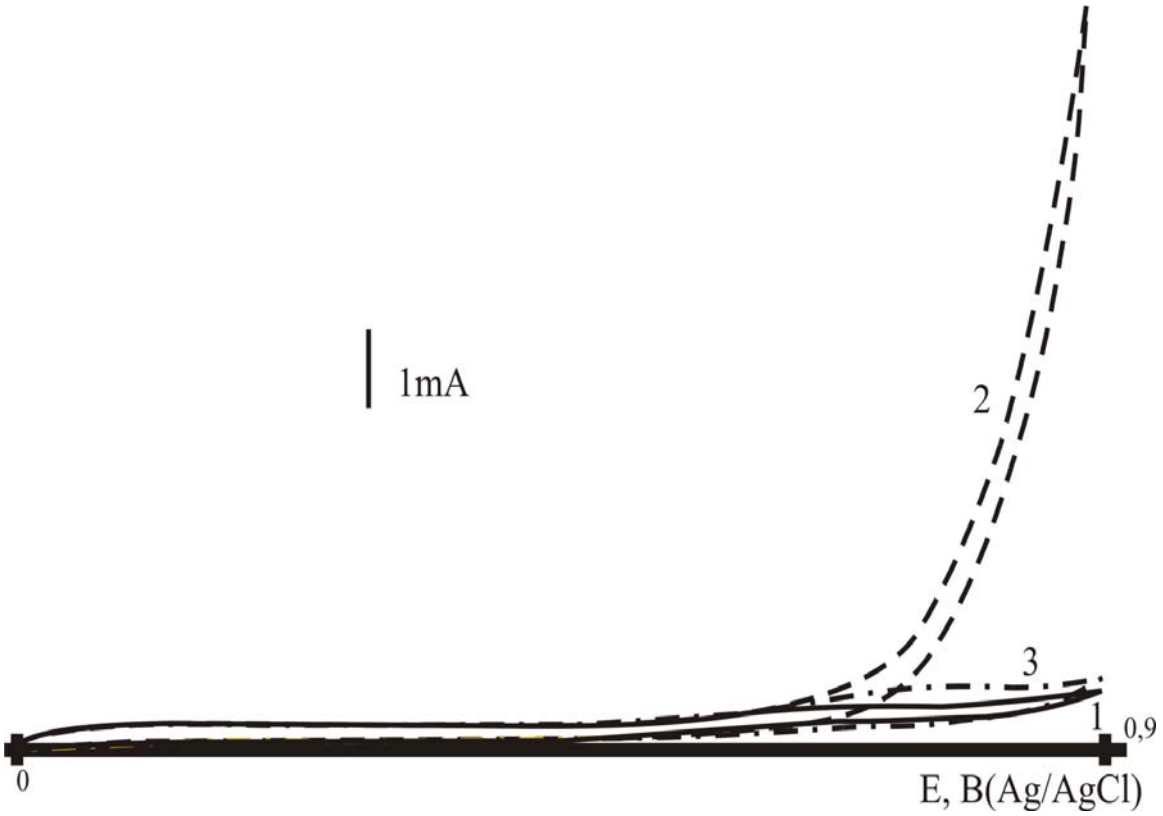



**Рис. 10. Циклические вольтамперограммы для системы NO-фоновый раствор в динамических условиях**
(1 - фон, 2 – гладкий электрод, 3 – модифицированный электрод)

Далее электрод был покрыт нафионовой плёнкой по описанной выше методике для снижения мешающего влияния нитрит-ионов. На вольтамперограмме *(кривая 3)* наблюдалась волна анодного тока при потенциале +0,75В, соответствующая окислению оксида азота и отсутствовал сигнал, соответствующий окислению нитрит-ионов. Небольшая величина тока окисления оксида азота объясняется тем, что масштаб выбран таким образом, чтобы на кривой 2 было видно, есть ли точка перегиба при увеличении потенциала до +0,9В.

Полученные в проточной ячейке данные согласуются с теми, что получены по стационарной схеме, что подтверждает возможность проведения мониторинга оксида азота в динамических условиях.

## 4.3. Модифицирование поверхности сенсорного электрода для повышения чувствительности и селективности измерений

Кровь, как и любая биологическая система, содержит в своём составе не только анионы, но и катионы. Примером катиона в эксперименте служил протонированный по аминогруппе дофамин, являющийся постоянным компонентом крови, который был использован как модельное соединение при оценке селективности датчиков на оксид азота. Для оценки Redox-свойств дофамина в исследуемой модельной системе были измерены вольтамперограммы в фоновом растворе и растворе с концентрацией дофамина 0,35 мкмоль/л **(рис. 11)**. На вольтамперной кривой для системы дофамин - фоновый раствор *(кривая 2)* наблюдались два пика. Анодный, при потенциале +0,2В, соответствовал обратимому окислению дофамина, а катодный, при потенциале +0,2В – восстановлению продуктов его окисления.

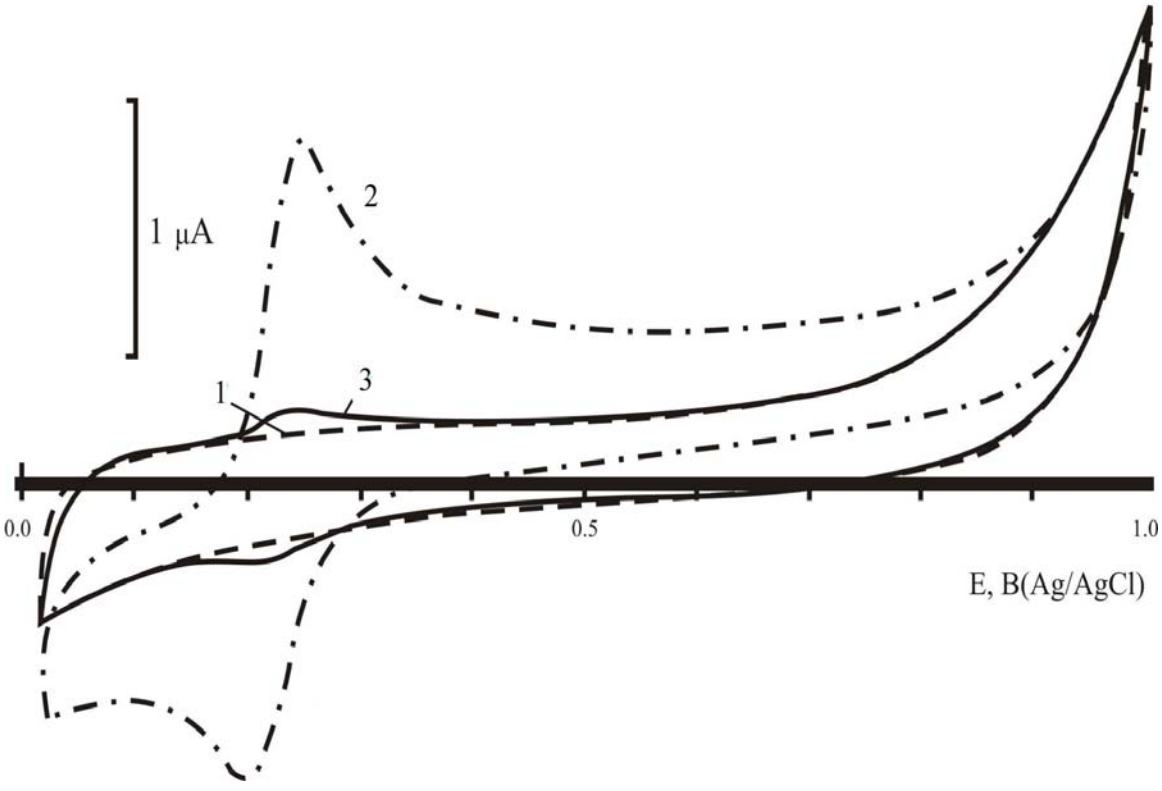
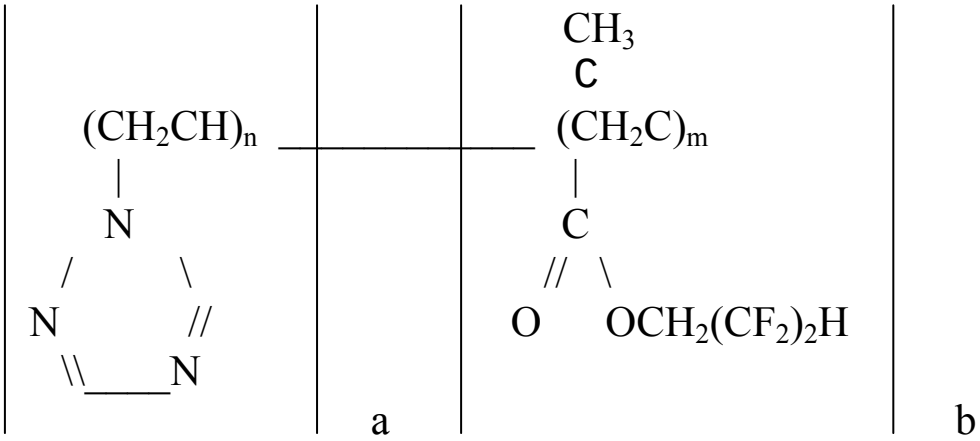



**Рис. 11. Циклические вольтамперограммы для системы дофамин - фоновый раствор**
(1 - фон, 2 – гладкий электрод, 3 – модифицированный электрод)

Тот факт, что дофамин окисляется при потенциалах, менее положительных, чем NO, затрудняет количественное определение оксида азота при совместном их присутствии. Для подавления мешающего влияния катионов, в том числе дофамина, поверхность электрода мы покрыли катионообменным полимером, обладающим хорошей адгезией к нафиону. Модифицирование электрода проводили таким же способом, как и в случае нафиона. 5% ацетоновый раствор сополимера наносили на поверхность электрода и сушили в течение 40 минут при комнатной температуре, а затем при 60°С в течение того же времени в сушильном шкафу. Затем электрод выдерживали в течение суток в буферном растворе для набухания плёнки сополимера, при этом последняя приобретала равномерный положительный заряд. В качестве такого полимера нами был использован сополимер поливинилтриазола и 1,1,3-тригидротетрафторпропилметакрилата с соотношением мономеров 0,41:0,59:




На модифицированном электроде была измерена вольтамперограмма для раствора дофамина *(кривая 3)*. На ней также наблюдались два пика, но их величина значительно снижена по сравнению с измеренной на немодифицированном электроде.

Таким образом, нанесение на поверхность электрода катионообменного сополимера значительно снижает ток окисления дофамина. Результаты, полученные с исследованным сополимером, позволяют предположить, что он будет эффективно

препятствовать окислению и других катионов, мешающих определению оксида азота.

## 4.4. Разработка и применение углеволоконного микроэлектрода для количественной оценки содержания оксида азота

Выбор материала для изготовления микроэлектрода обусловлен необходимостью определения малых концентраций оксида азота в небольших объёмах раствора. Следовательно, электрод должен обладать большой удельной поверхностью. Эти требованиям удовлетворяет углеволоконный материал **(рис. 12)**.

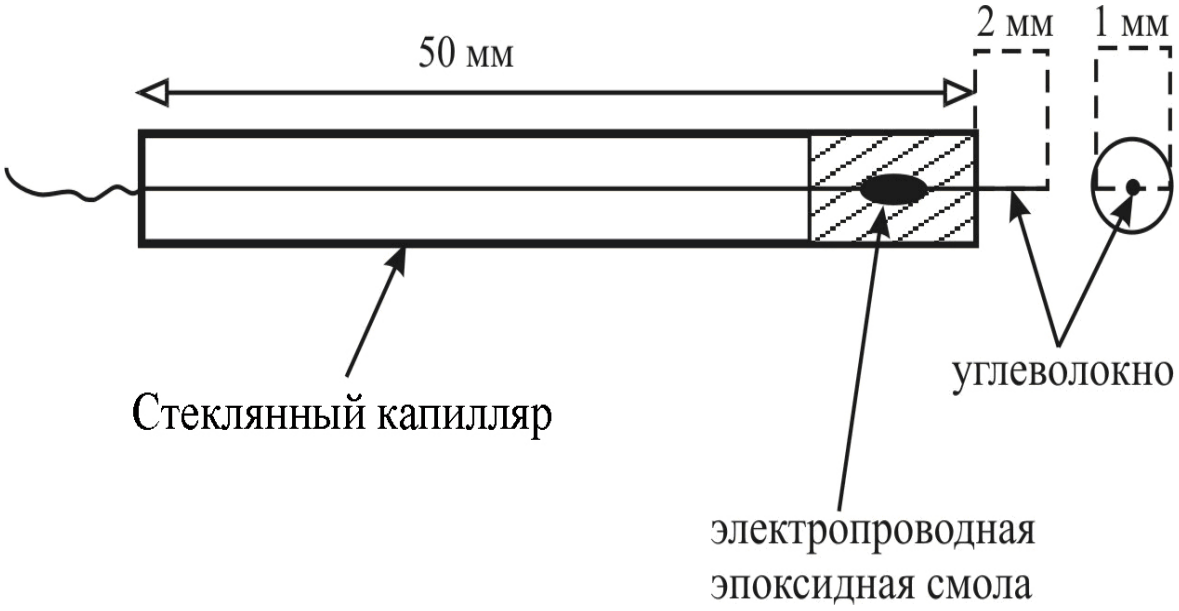



**Рис. 12. Углеволоконный микроэлектрод**

Исходное углеволокно было обработано разбавленной азотной кислотой (1:1) для удаления с его поверхности различных чужеродных частиц, после чего промыто бидистиллированной водой и подвергнуто доочистке в ультразвуковой ванне в течение 5 минут, а затем снова промыто бидистиллированной водой и высушено в сушильном шкафу при температуре 60°С. Токопроводящим материалом для электрода служила медная проволока. Пять-шесть волокон углеволокна длиной 15-20 мм присоединяли к проволоке посредством электропроводящей основы, которая представляла собой эпоксидную смолу, смешанную с порошком серебра. После затвердевания смолы систему проверяли на электропроводность с помощью тестера.

Корпусом электрода служил полый стеклянный капилляр длиной 50 мм и внутренним диаметром 1 мм. Токопроводящие заготовки помещали в капилляр таким образом, чтобы снаружи находилось углеволокно с длиной рабочей поверхности 2 мм. Далее капилляр герметизировали со стороны углеволокна с помощью эпоксидной смолы без наполнителя, после затвердевания которой проводили тестирование микроэлектрода путём сравнения с данными, полученными на гладком стеклоуглеродном электроде. Для этого были повторены основные этапы исследований, проведённых на гладком стеклоуглеродном электроде.

Следуя логике исследований, проведённых на гладком электроде, были проведены эксперименты по изучению системы NO-фоновый раствор. При этом использовали углеволоконный микроэлектрод, покрытый нафионовой плёнкой. Вольтамперограмма, измеренная на модифицированном микроэлектроде, представлена на **рис. 13**.

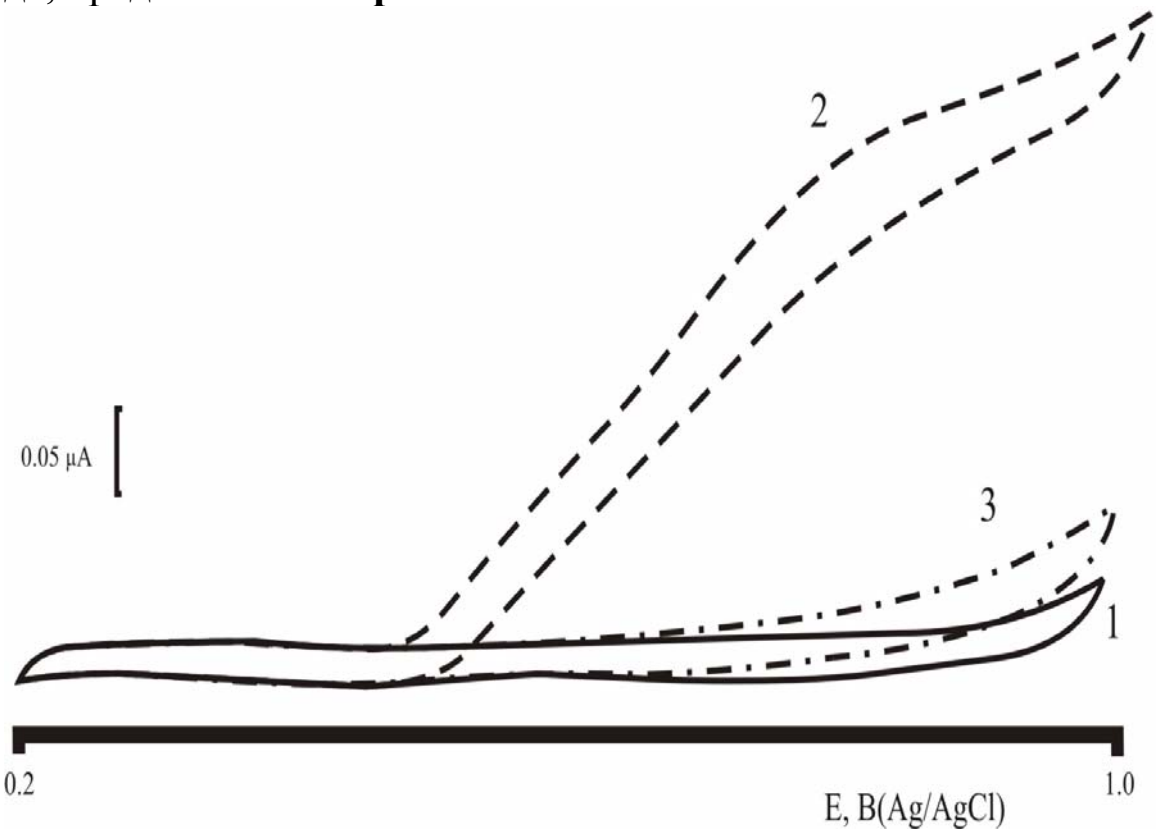



**Рис. 13. Вольтамперограммы для системы фон-NO на углеволоконном микроэлектроде**
(1 - фон, 2 – фон+NO, 3 – фон+NO+$NO_2^-$ после продувания аргоном)

На кривой 2 наблюдался рост анодного тока при потенциалах выше 0,3В. Чтобы точно идентифицировать этот эффект, через раствор в ячейке продували аргон в течение 10 минут для удаления оксида азота из системы, а затем вводили раствор нитрита калия с концентрацией 25 ммоль/л. Измеренная после этого вольтамперограмма практически не отличалась от фоновой, что свидетельствует о том, что наблюдаемый эффект обусловлен окислением оксида азота. Таким образом, углеволоконный микроэлектрод, модифицированный нафионом, селективен по отношению к NO.

Аналогичные опыты были проведены в динамических условиях и показали, что изменение режима проведения эксперимента не влияет на полученные результаты.

Чтобы проверить пригодность электрода для количественных определений, была измерена амперограмма окисления NO на микроэлектроде. Амперометрические измерения проводили при потенциале +0,8В. Различные концентрации NO создавали путём разбавления насыщенного раствора. В рабочую ячейку вводили раствор NO и фиксировали отклик тока. После снижения тока до фонового уровня вводили раствор NO другой концентрации. Фрагмент полученной амперограммы представлен на **рис. 14**.

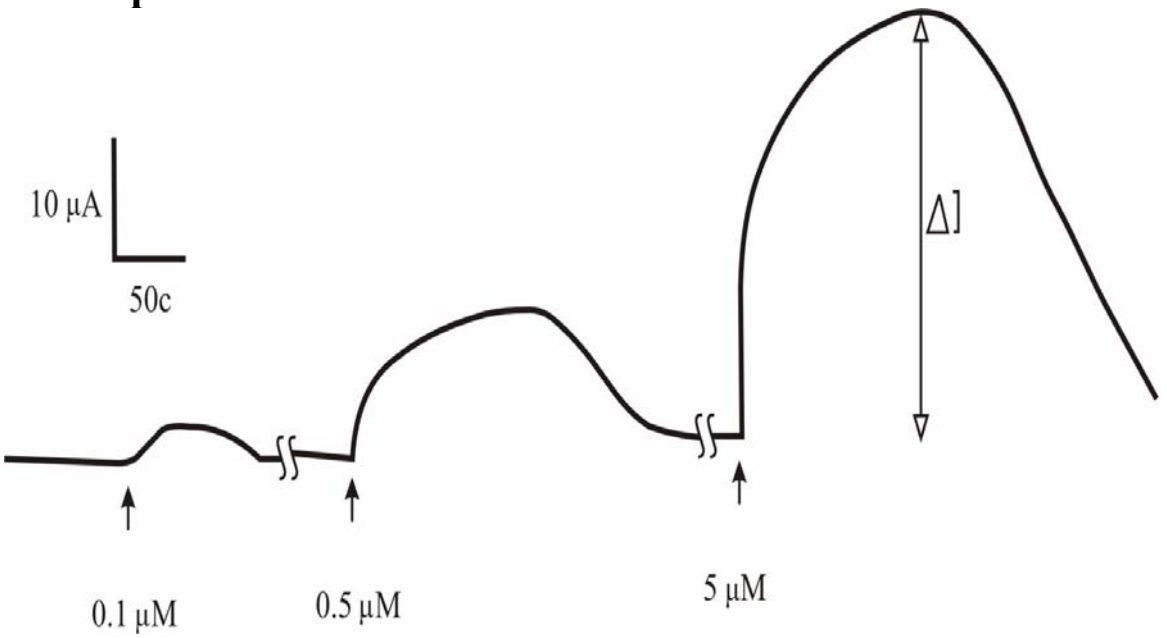



**Рис. 14. Амперограмма окисления NO на углеволоконном микроэлектроде**

По данным амперометрических измерений была построена зависимость отклика тока от концентрации NO в растворе. В изученном интервале концентраций данная зависимость имела линейный вид **(рис. 15.А)**. Аналогичные исследования были проведены на других образцах изготовленных электродов, полученные зависимости также были линейными **(рис. 15.Б,В)**.

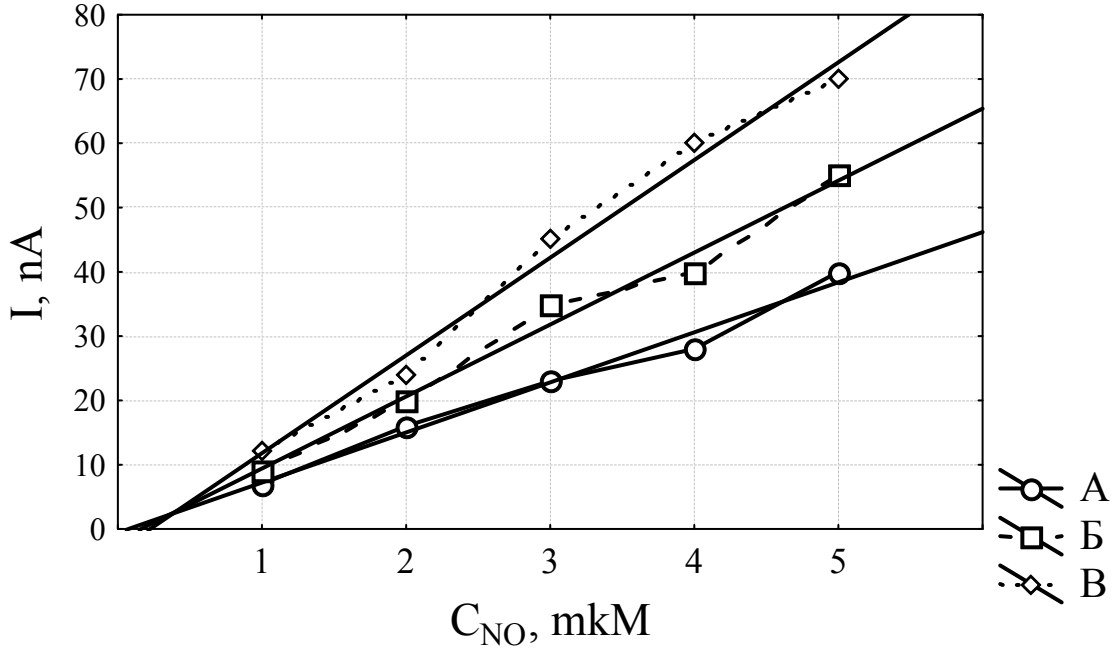



**Рис. 15. Зависимость отклика тока от концентрации NO в растворе** (А, Б, В – образцы микроэлектродов)

Исходя из результатов опыта, можно сделать вывод о возможности использования модифицированного углеволоконного микроэлектрода для количественных измерений NO.

## 4.5. Измерение уровня оксида азота и изучение его соотношения с нитритом в реальных биологических системах

Выполненное на модельной системе исследование показало, что послойное модифицирование поверхности стеклоуглеродного и углеволоконного электродов ионообменными мембранами защищает его как от анионов, так и от катионов, не препятствуя при этом окислению NO. Чтобы проверить эффек-

тивность NO-чувствительных электродов в реальных биологических системах, были проведены эксперименты в образцах биологических жидкостей: цельная кровь, плазма и ультрафильтрат крови.

*Пример 1*. Амперометрическое определение NO в образце плазмы крови человека.

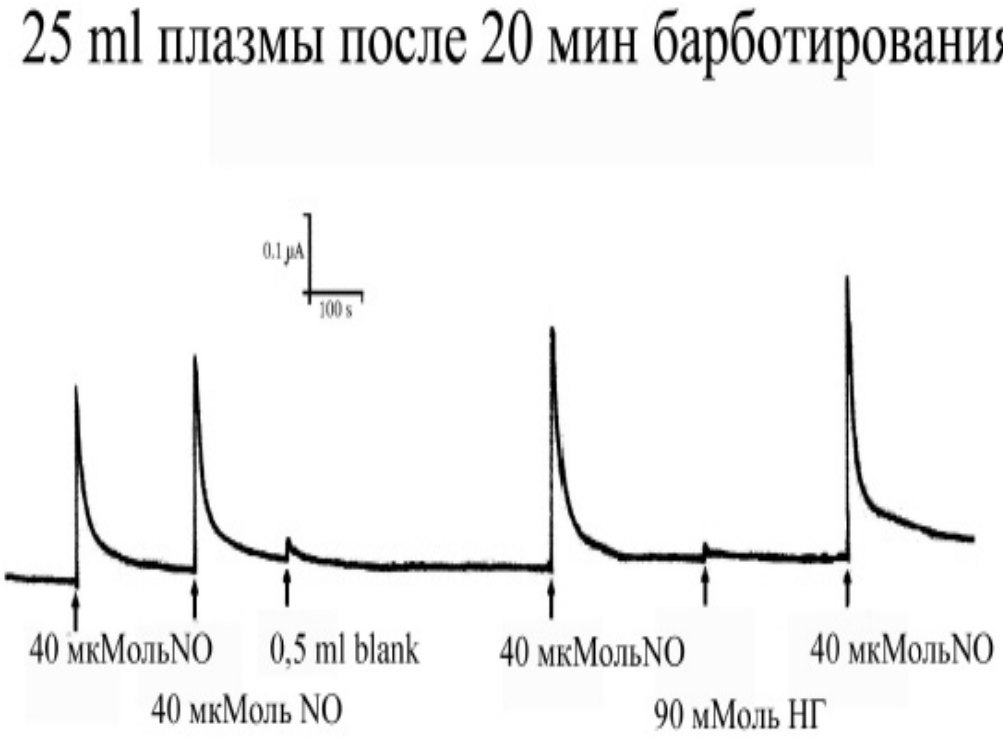



**Рис. 16. Амперограмма образца плазмы крови**

Для определения оксида азота использовали образец плазмы крови здорового донора Н., 29 лет, который получен путем забора 50 мл крови из локтевой вены, последующего центрифугирования при 2000g в течение 15 мин, отделения эритроцитарной массы и использования оставшейся плазмы для исследования. Рабочая ячейка была заполнена 25 мл плазмы и помещена в термостат с температурой 36°С. В течение 20 минут проведено барботирование рабочей ячейки аргоном. Потенциал электрода поддерживали равным +0,8В (Ag/AgCl).

На двухкоординатном регистраторе зафиксирован отклик тока на впрыск фосфатного буферного раствора, содержащего оксид азота, холостой пробы (blank –дистиллированная вода) и раствора тринитрата глицерина (НГ); Так, на **рис. 16** стрелки

соответствуют впрыскиваниям проб, числа под стрелками показывают объем впрыскиваемого раствора. Измерение концентрации оксида азота в образце плазмы крови производили по калибровочному графику.

*Пример 2*. Амперометрическое определение NO в образце цельной крови человека.

Образец цельной крови был получен путем забора 25 мл из локтевой вены практически здорового донора К., 34 лет. Рабочая ячейка была заполнена 22,5 мл крови и 2,5 мл цитрата натрия в качестве стабилизатора и помещена в термостат с температурой 37°С. Исследования были проведены в аэробной среде **(рис. 17, А)** и после 20 мин барботирования рабочей ячейки аргоном **(рис. 17, В)**.

Аналогично примеру 1, получен отклик тока на впрыск рабочего раствора и холостой пробы (blank – дистиллированная вода). Измерение концентрации оксида азота в образце цельной крови производили по калибровочному графику.

Калибровку сенсорного микроэлектрода предварительно проводили с использованием буферных растворов, содержащих известные концентрации оксида азота.

При анализе проб, проведенных в образцах цельной крови, обращает на себя внимание более низкая амплитуда сигнала (отклика тока), получаемого в ответ на введение раствора, что можно объяснить активным связыванием оксида азота с гемоглобином эритроцитов, и как следствие, уменьшением количества NO, достигающего поверхности сенсорного электрода. Тем не менее, как и в образцах плазмы крови, селективность определения была достаточно высокой и не зависела от присутствия посторонних веществ.

*Пример 3.* Амперометрическое определение оксида азота в образце ультрафильтрата крови человека.

Для определения оксида азота использовали образец ультрафильтрата крови больного М., 46 лет, полученный методом изолированной ультрафильтрации при проведении программного гемодиализа по поводу хронической почечной недостаточности III ст., на аппарате «Fresenius». Объем рабочей

ячейки - 25 мл, температура - 37°С. Барботирование рабочей ячейки аргоном в течение 20 мин. Зарегистрирован отклик тока на впрыск рабочего раствора; стрелки соответствуют впрыскиваниям проб, числа под стрелками показывают возрастание концентрации NO в образце **(рис. 18, А)**. На **рис. 18, В** приведен калибровочный график, по которому устанавливали количественное содержание оксида азота в исследуемом образце.

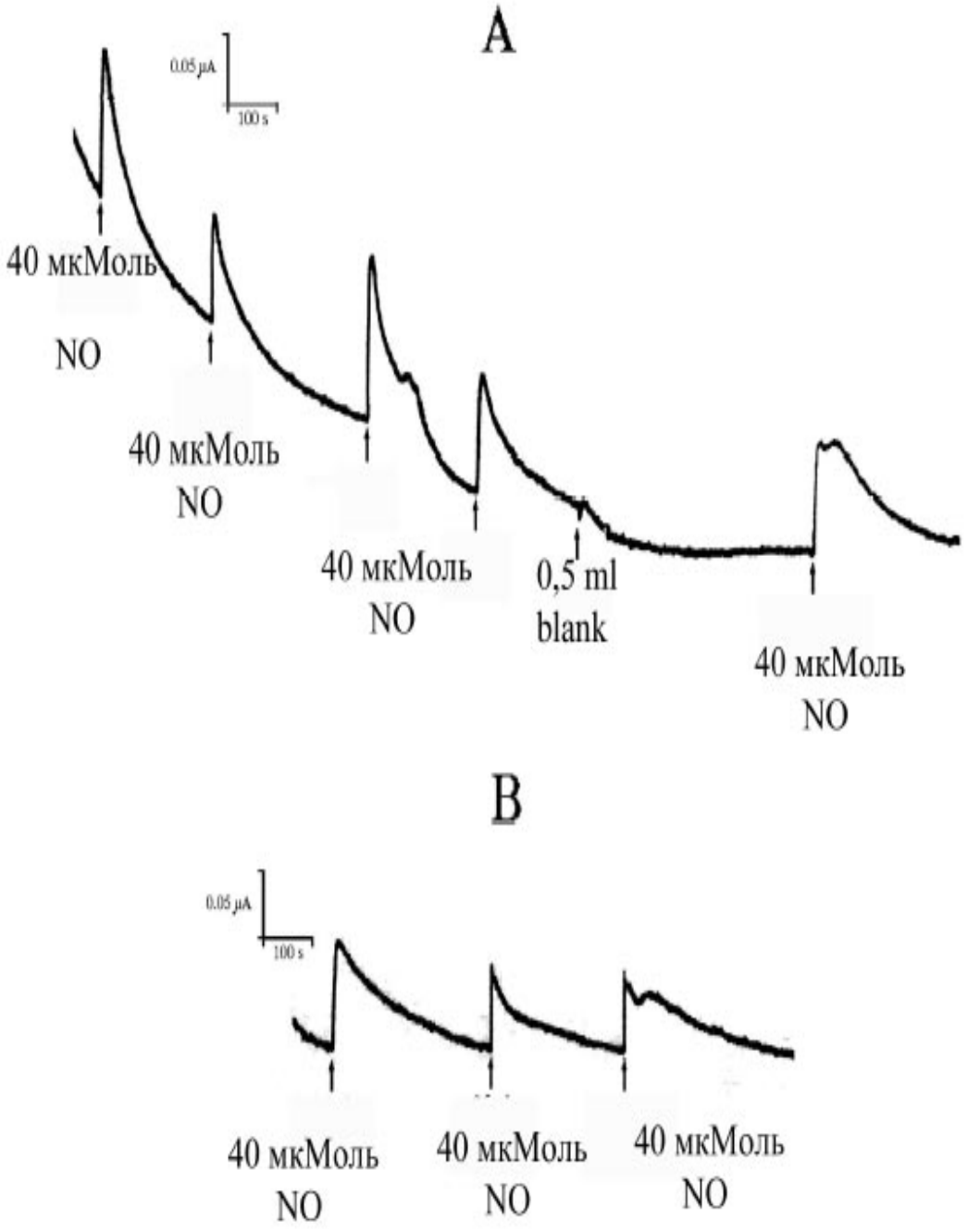



**Рис. 17. Амперограмма образца цельной крови**

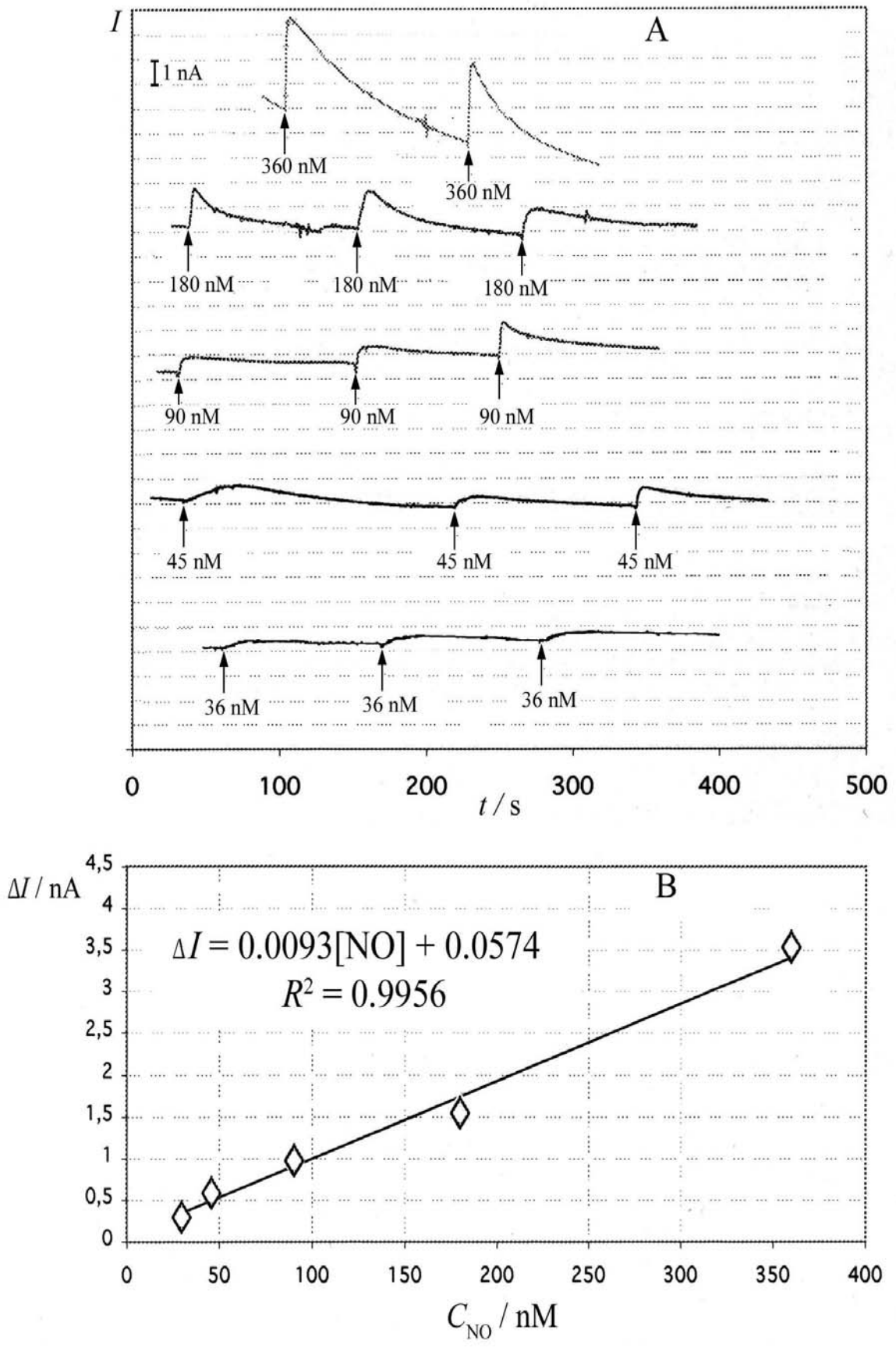



**Рис. 18. Амперограмма образца ультрафильтрата крови**

Проведённые амперометрические измерения позволили дать оценку селективности электрода и воспроизводимости результатов. Селективность проверяли путём последовательного введения в образец ультрафильтрата крови растворов NO (5 мкмоль), нитрита калия (94 мкмоль), дофамина (33 мкмоль). На амперограмме фиксировали отклик тока только на введение раствора NO **(рис. 19)**. Для оценки воспроизводимости измеряли отклик тока на многократное введение в систему одного и того же количества насыщенного раствора оксида азота с концентрацией 5 мкмоль.

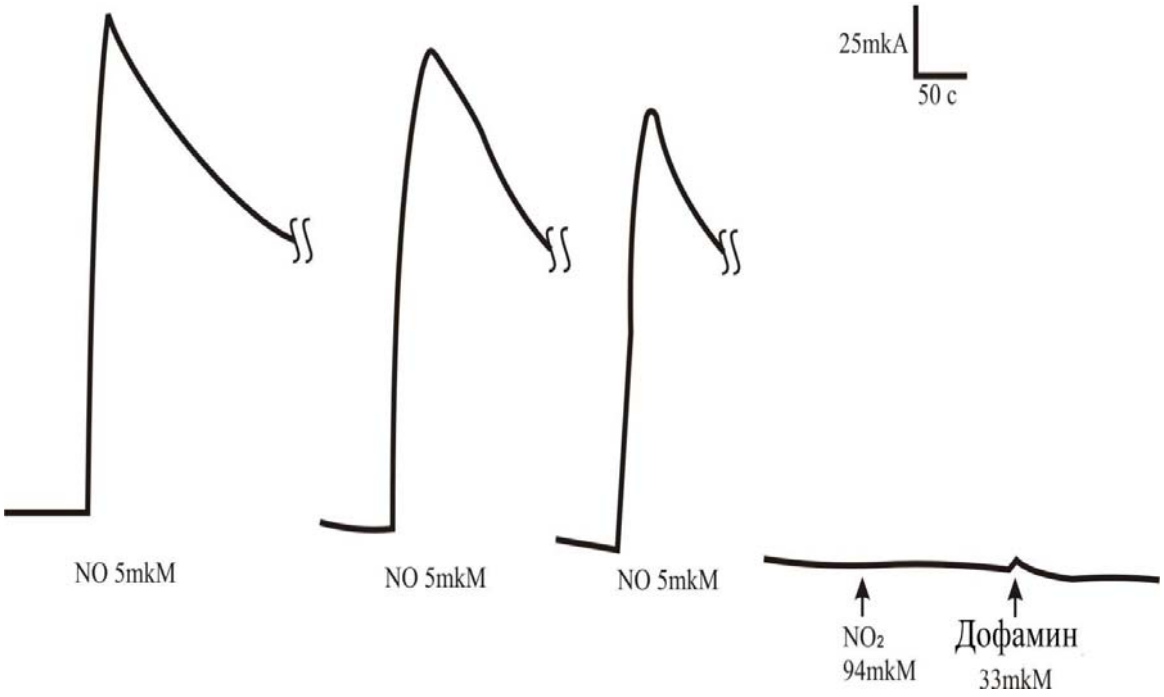



**Рис. 19. Фрагменты амперограммы окисления NO на модифицированном углеволоконном микроэлектроде в образце ультрафильтрата крови**

Параллельно с определением концентрации оксида азота в биологических жидкостях проводили последующие измерения уровня его метаболита - нитрита в опытных образцах проб, использованных при прямом определении.

Результаты анализа показали, что содержание нитрита в образцах биологических жидкостей пропорционально уровню оксида азота, зарегистрированному с помощью прямого электрохимического метода ($r_S$=0,87, $p<0,001$). Данные об измерен-

ном содержании NO и нитрита, а также ошибка определения представлены в **табл. 2**.

*Таблица 2*

**Результаты определения оксида азота и нитрита в образцах биологических жидкостей**

| Образец | Содержание NO | Измеренный уровень NO | Концентрация нитрита | σ |
|---|---|---|---|---|
| Цельная кровь (n=25) | 4,0 мкмоль | 4,14 мкмоль | 4,29 мкмоль | 3,9% |
| Плазма крови (n=35) | 4,0 мкмоль | 4,11 мкмоль | 4,32 мкмоль | 3,7% |
| У/фильтрат (n=20) | 3,6 мкмоль | 3,68 мкмоль | 3,78 мкмоль | 4,3% |
| У/фильтрат (n=20) | 4,5 мкмоль | 4,45 мкмоль | 4,36 мкмоль | 4,6% |
| У/фильтрат (n=20) | 9,0 мкмоль | 9,12 мкмоль | 9,47 мкмоль | 3,9% |
| У/фильтрат (n=20) | 18,0 мкмоль | 18,2 мкмоль | 17,8 мкмоль | 4,5% |

Примечание: n – число определений, σ – ошибка определения, у/фильтрат – ультрафильтрат крови

Таким образом, для развития аналитических подходов к мониторингу оксида азота непосредственно в биологических системах главными характеристиками являются чувствительность и селективность определения его малых концентраций. Этим требованиям удовлетворяет электрохимический метод, позволяющий проводить прямые количественные измерения. Физико-химические свойства оксида азота позволяют проводить его прямое окисление при потенциалах, близких к +0.80В (Ag/AgCl) на стеклоуглеродном и углеволоконном электродах, а модификация их поверхности позволяет улучшить как чувствительность, так и стабильность сенсоров.

Разработанная нами методика измерения не предполагает введения в организм посторонних соединений, а также даёт возможность проводить мониторинг нитроксидергической системы в динамике. Благодаря внедрению в состав электрода покрытия из нафионовой пленки, играющей роль анионообмен-

ника и карбоцепного сополимера в качестве катионообменника, подавляются процессы окисления анионов и катионов, мешающих количественным измерениям. Однако возможность использования электрохимического метода в настоящее время ограничена достаточно сложной технологией изготовления и тестирования сенсорных электродов, а также проблемами недостаточной их стабильности в реальных биологических системах. Немаловажное значение играет стоимость аппаратуры для электрохимического определения и необходимость привлечения квалифицированного персонала для проведения подобных исследований.

В то же время, доказана возможность применения в клинической практике методов, основанных на регистрации не самого оксида азота, а его метаболита – нитрита в силу их меньшей затратности и большей доступности. Достаточно высокая чувствительность позволяет использовать их в большинстве клинических исследований, когда необходимо изучение нарушений, связанных с дисфункцией нитроксидергической системы. Эти методы могут получить распространение при проведении экспериментальных исследований в медицине и биологии.

# ГЛАВА 5.
# НАРУШЕНИЯ В НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Для оценки влияния нарушений, развивающихся в звене нитроксидергической регуляции, на клиническое течение черепно-мозговой травмы, а также на состояние системной гемодинамики и транскапиллярного обмена, было изучено содержание нитрита в крови и цереброспинальной жидкости в зависимости от степени угнетения сознания, характера повреждения головного мозга и интенсивности субарахноидальной геморрагии на протяжении двух недель острого периода черепно-мозговой травмы.

## 5.1. Характеристика групп клинических наблюдений

Исходя из цели исследования, в клинический раздел были включены 99 больных, отбор которых для анализа и сопоставления материала осуществляли по следующим критериям:

- выставление диагноза острой изолированной тяжелой черепно-мозговой травмы, с поступлением в стационар не позднее 24-х часов после получения травмы;
- уровень сознания при поступлении менее 11 баллов по шкале ком Глазго при наличии ушиба головного мозга тяжёлой степени, либо сдавления головного мозга внутричерепными гематомами различных локализаций;
- длительность наблюдения не менее 10-ти суток.

Исключение больных из исследования проводили в следующих клинических случаях:

- сочетание черепно-мозговой травмы с тяжёлым повреждением опорно-двигательного аппарата;
- наличие декомпенсированного геморрагического шока;

•сопутствующее повреждение органов грудной клетки и брюшной полости;

•указание в анамнезе на наличие декомпенсированной соматической патологии;

•использование в ходе лечения препаратов вазодилататорных нитратов (моно-, ди- и тринитраты).

Проведено исследование больных в возрасте от 14 до 75 лет на протяжении 14-ти суток острого периода травмы. Подавляющее большинство (78,8%) составили лица трудоспособного (20-60 лет) возраста, причём 80,8% из них – мужчины, а 19,2% - женщины **(рис. 20)**.

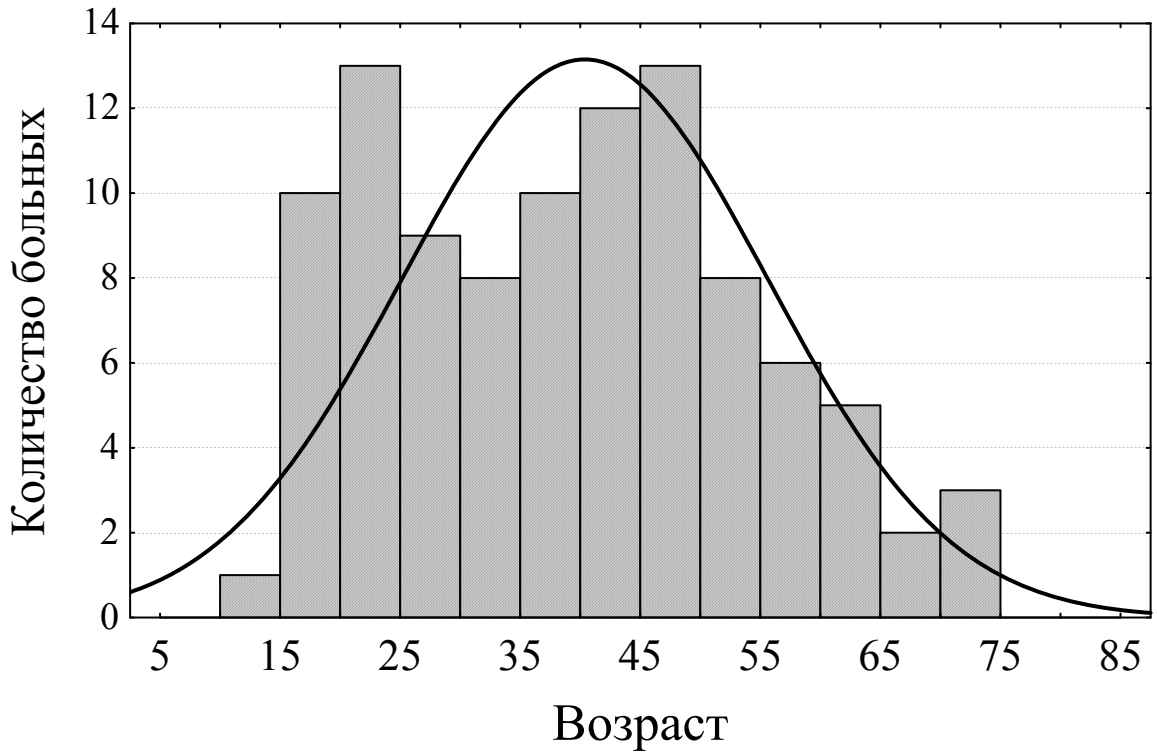



**Рис. 20. Распределение больных по возрасту**

В зависимости от глубины угнетения сознания при поступлении исследованные больные были распределены на три группы:

*I группу* составили 31 больных с оценкой по шкале ком Глазго (ШКГ) 8-11 баллов, уровень сознания которых соответствовал сопору или глубокому оглушению. Во *II группу* вошли 33 больных с исходной оценкой 6-7 баллов, находившиеся при

поступлении в состоянии поверхностной комы и в *III группу* были включены 35 больных, поступивших в стационар в глубокой и запредельной коме, с оценкой по ШКГ 3-5 баллов.

Значительную часть (71,7%) составили больные с компрессией головного мозга внутричерепными гематомами (эпи- и субдуральные, внутримозговые, а также с сочетанием 2-х и более гематом), которым было проведено хирургическое лечение – трепанация черепа, удаление гематомы, устранение источника кровотечения **(рис. 21)**.

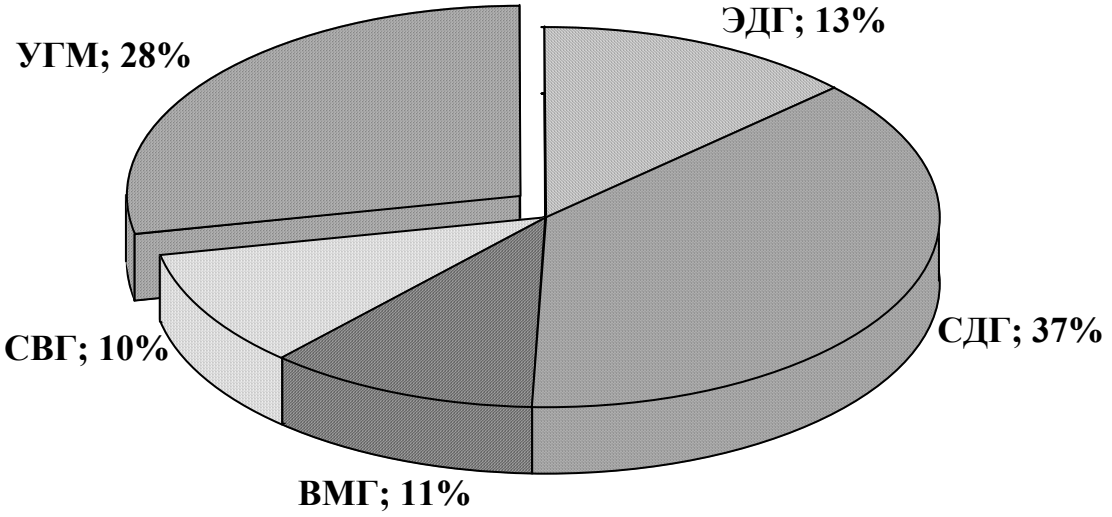



**Рис. 21. Распределение больных по характеру травмы**
(ЭДГ - эпидуральные гематомы, СДГ – субдуральные гематомы, ВМГ – внутримозговые гематомы, СВГ – сочетание внутричерепных гематом, УГМ – ушибы головного мозга)

При отсутствии противопоказаний предпочтение отдавали костно-пластической трепанации черепа. 28,3% больных, госпитализированных с изолированными ушибами головного мозга тяжёлой степени, оперативному лечению не подвергались. У этих больных травма, как правило, сопровождалась переломами свода и основания черепа и массивным субарахноидальным кровоизлиянием. В большинстве случаев (92%) локализация очагов ушиба затрагивала лобные и височные доли, а также конвекситальные участки коры головного мозга. Базальные и стволовые ушибы наблюдались в 8% случаев.

В группе больных с изолированными ушибами головного мозга тяжёлой степени летальность составила 39%, а при компрессии головного мозга – 24%.

78% больных был выставлен диагноз закрытой черепно-мозговой травмы. У остальных имелось открытое повреждение головного мозга (проникающие ранения, переломы основания черепа с явлениями ото- и назоликворреи). Двухстороннее повреждение выявлено у 12% больных.

В лечении всех больных использовали традиционный комплекс интенсивной терапии, включавший нормализацию газообмена, гемодинамики и водно-электролитного баланса с учётом доктрины профилактики вторичных ишемических повреждений головного мозга. ИВЛ проводили в режимах принудительной нормовентиляции ($p_aCO_2$ = 35-40 мм.рт.ст), контролируемой по объёму или давлению, а также в режиме синхронизированной перемежающейся принудительной вентиляции с использованием респираторов «Puritan-Bennett-7200», «Puritan-Bennett-760», «Newport-500» и «Newport-100» с переходом на вспомогательные режимы по мере улучшения состояния больного. Мониторинг насыщения крови кислородом осуществляли методом транскутанной пульсоксиметрии с применением прикроватных мониторов Philips M4, а газы артериальной и венозной крови ($pO_2$, $pCO_2$) определяли на аппарате AVL.

С целью нейровегетативной стабилизации использовали терапевтические дозы барбитуратов и бензодиазепинов. Нормализацию объёма циркулирующей крови и водно-электролитного обмена проводили в/в введением изо- и гиперосмолярных кристаллоидных солевых растворов и препаратов гидроксиэтилкрахмала.

В комплекс консервативной терапии включали антиагреганты – фраксипарин 0,3 мл (2850 МЕ Анти-Ха) 1-2 раза в сутки, трентал (100 мг 1-2 раза в сутки), по показаниям проводили антибактериальную терапию (как правило, цефалоспоринами III поколения).

В качестве плазмозамещающих средств, а также с целью улучшения реологии крови и микроциркуляции, церебрального и периферического кровотока, снижения вязкости крови,

уменьшения агрегации тромбоцитов и эритроцитов мы использовали препараты *Рефортан-ГЭК 6% и 10%* внутривенно в дозе 15мл/кг и 10 мл/кг соответственно.

Для улучшения процессов обмена в мозговой ткани, стимуляции процессов регенерации, повышения утилизации глюкозы и кислорода, а также стабилизации клеточных мембран назначали *Актовегин* в/в капельно на изотоническом растворе NaCl в дозе 400-800 мг/сут; *Цитофлавин* в/в в дозе 10 мл дважды в сутки на изотоническом растворе NaCl.

При гипердинамическом варианте реакции кровообращения для снижения артериального давления использовали стимулятор $\alpha_2$-адренорецепторов клофелин в дозе 0,05-0,15 мг в/м или в/в, а также нимодипин (нимотоп) путем в/в инфузии в дозе 1-2 мг/час под мониторным контролем показателей системной гемодинамики. При гиподинамическом варианте применяли адреналин и дофамин в соответствующих дозировках.

Всем больным с 1-2-х суток, при отсутствии противопоказаний со стороны органов желудочно-кишечного тракта, проводили зондовое энтеральное кормление полисубстратными смесями *«Берламин-Модуляр»* с помощью автоматических систем для дозированного введения *«Kangaroo»*, со скоростью 100-150 мл/час в течение 12-16 часов. С антисекреторной целью назначали омепразол в дозе 20 мг/ дважды в сутки, прокинетики – по показаниям.

В связи с необходимостью получения условно нормальных значений уровня нитрита крови была сформирована группа клинического сравнения (ГКС) из 32 здоровых добровольцев-доноров, а для оценки содержания нитрита в цереброспинальной жидкости обследованы 35 больных, прооперированных в плановом порядке под спинномозговой анестезией по поводу межпозвонковых грыж поясничного отдела позвоночника.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ “Statistica for Windows v.6.0”. Применяли общепринятые методы вариационной статистики и корреляционного анализа, используемые в медико-биологических исследованиях. Анализ проводили непараметрическими стати-

стическими методами, так как характер распределений подавляющего большинства исследуемых данных оказался ненормальным по указанным выше критериям. Данные представляли в виде медианы с верхним и нижним квартилями (25-й и 75-й процентили). Межгрупповое сравнение значимости различий полученных данных в связанных выборках проводили с помощью парного критерия Уилкоксона (W), а при сравнении независимых клинических групп – с использованием критерия Манна-Уитни (U).

В качестве уровня значимости, при оценке достоверностей различий показателей групп сравнения, принимали 0,1%, 1% и 5% уровни возможного совпадения [Боровиков В.П., 1997; Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2002].

## 5.2. Нарушения нитроксидергической регуляции и системной гемодинамики в зависимости от степени угнетения сознания

При исследовании нитрита в плазме крови забор пробы производили ежедневно утром натощак из центральной (подключичной) вены, после чего пробу центрифугировали при 2000g в течение 5 мин и замораживали сыворотку при температуре –30°С до исследования. После оттаивания образца сыворотку депротеинизировали добавлением 0,5N раствора NaOH и 10% раствора сульфата цинка. Содержимое пробирки перемешивали и центрифугировали в течение 15 мин при 9000g. Надосадочную жидкость смешивали с равным объемом реактива Грисса (1% сульфаниламида, 0,1% нафтилендиамина, 2,5% фосфорной кислоты) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Абсорбцию раствора измеряли при длине волны 546 нм. В качестве стандарта использовали нитрит натрия, а количественное содержание нитрита в крови определяли по калибровочной кривой.

Для определения уровня нитрита в цереброспинальной жидкости в положении больного на боку проводили люмбальную пункцию в типичном месте иглой типа QUINKE диаметром 21-25G, полученный ликвор центрифугировали при 2000g

в течение 5 мин и замораживали при температуре –30°С до исследования. После оттаивания образца методика не отличалась от определения нитрита в крови, при той же длине волны. Определение цитоза и белка ЦСЖ проводили стандартными методами. При проведении инвазивного мониторинга внутричерепного давления с использованием одноразовых систем «Hanny-Set», забор проб ликвора проводили из внутрижелудочкового катетера.

Значения нитрита крови в ГКС составили 4,02(3,8-4,4) мкмоль/л. У больных, поступивших в стационар в состоянии сопора и глубокого оглушения (I группа), в 1-2-е сутки после травмы уровень нитрита крови был ниже нормальных показателей на 75% - 2,33(1,84-2,42) мкмоль/л и постепенно повышался в ходе проводимой терапии. Однако даже к концу второй недели наблюдения значения нитрита оставались ниже нормы более чем в 1,5 раза – 2,57(2,2-2,84) мкмоль/л.

При угнетении сознания до поверхностной комы (II группа), а также в III группе уровень нитрита крови при поступлении существенно не отличался от показателей I группы. На фоне частичного повышения уровня нитрита на 3-5-е сутки у больных в I и II группах, у больных, поступивших в состоянии глубокой и запредельной комы, в этот временной период концентрация нитрита оставалась низкой, причём различия в показателях были статистически значимыми - $p_{U\ (III-I)}<0,05$. На 6-7-е сутки у больных с исходным угнетением сознания ниже 8 баллов (II и III группы) отмечалось снижение нитрита, совпадавшее с нарастанием неврологического дефицита на фоне выраженного отёка головного мозга, подтверждённого данными повторных КТ-исследований.

После купирования симптомов отёка мозга и частичного регресса очаговой неврологической симптоматики, у больных, поступивших в умеренной коме, появлялись элементы сознания, восстанавливалось адекватное самостоятельное дыхание и стабилизировались системные гемодинамические показатели, на 8-10-е сутки постепенно повышался уровень нитрита крови, но даже к 10-14-м суткам он достигал лишь 63% от нормы (2,56(2,1-3,15) мкмоль/л).

У больных в глубокой коме концентрация нитрита на этом этапе была существенно ниже ($p_{U\ (III-I)}<0,01$, $p_{U\ (III-II)}<0,05$), и лишь незначительно повышалась к концу второй недели наблюдения (до 53% от показателей референтной группы), при этом в клинической картине имели место длительное коматозное состояние и выраженный очаговый неврологический дефицит. Динамика нитрита крови приведена на **рис. 22**.

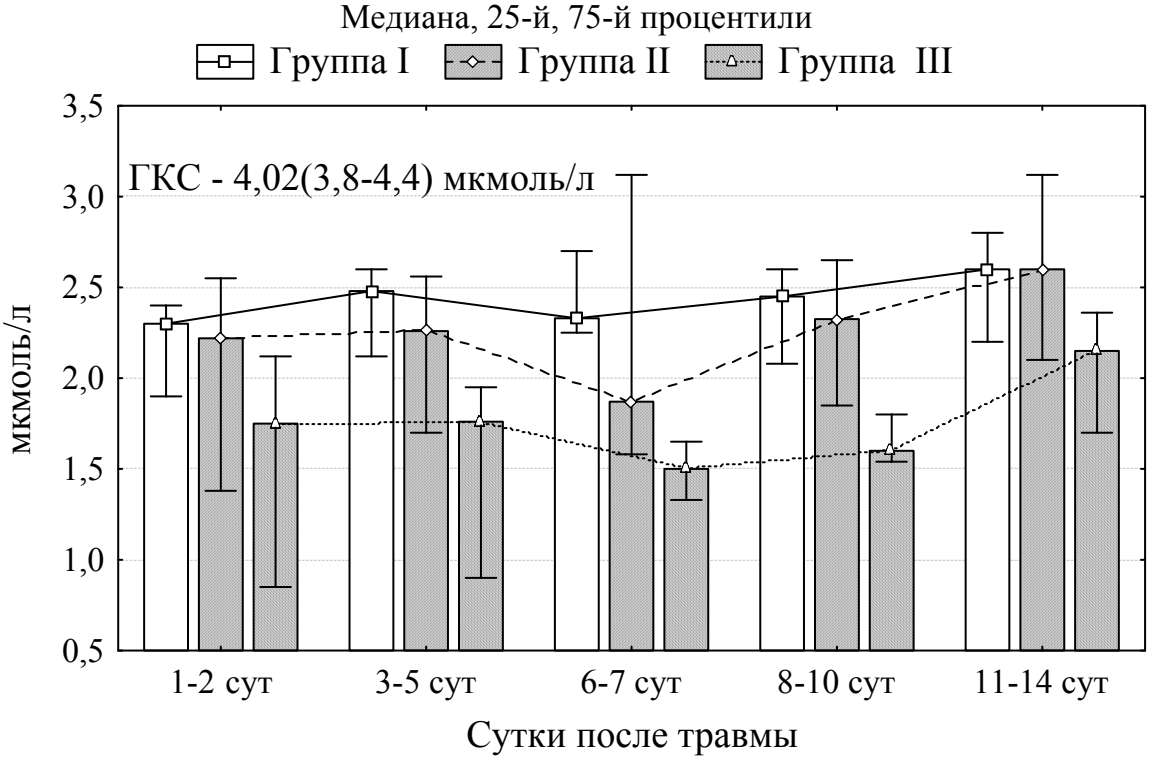



**Рис. 22. Уровень нитрита крови у больных с тяжёлой черепно-мозговой травмой**

Всем больным проводили определение показателей системной гемодинамики – среднего артериального давления (САД), минутного объема кровообращения (МО), ударного и сердечного индексов (УИ и СИ), а также общего периферического сосудистого сопротивления (ОПСС). Для оценки транскапиллярного обмена рассчитывали показатели коллоидно-онкотического и среднего капиллярного давления (КОД и СКД), а также их соотношение [Маневич А.З., 1981].

Ударный объём (УО) определяли эхокардиографически (определение конечно-диастолического и конечно-

систолического размеров левого желудочка). Основные показатели одномерной эхокардиограммы рассчитывались в позиции левого желудочка на аппарате Aloka-1700.

Конечно-диастолический размер (КДР) левого желудочка измеряли на уровне зубца R синхронно зарегистрированной ЭКГ от эндокардиальной поверхности межжелудочковой перегородки до эндокардиальной поверхности задней стенки левого желудочка (в норме 4,5-5,5 см). Конечно-систолический размер левого желудочка (КСР) измеряли на уровне нисходящего колена зубца Т синхронно записанной ЭКГ – в месте наибольшего сближения стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки (в норме 3,4-3,9 см).

Конечно-диастолический и конечно-систолический объёмы левого желудочка (КДО, КСО) определяли по формуле Тейхолза-Горлина [Морган Дж.Э., 2000].

Ударный объём *(УО) = КДО-КСО*.

Минутный объём *(МО) = УО*ЧСС*.

Для определения производных МО рассчитывали площадь поверхности тела Sт:

$Sт(м^2) = 0,0087*(A+P)-0,26,$

где: А - рост, см; Р - масса тела, кг.

Сердечный и ударный индексы рассчитывали по формуле:

*СИ = МО/S*т.

*УИ=СИ/ЧСС*1000*, (N=36-48 мл/м$^2$).

Общее периферическое сопротивление сосудов – расчётная величина, определяющая сопротивление между системными артериями и полыми венами; *ОПСС = [(САД-ЦВД)/СВ]*80*.

Наряду с нарушениями в нитроксидергической системе, в остром периоде черепно-мозговой травмы наблюдались изменения системных гемодинамических показателей и транскапиллярного обмена. Показатели ударного и сердечного индексов представлены в **табл. 3**.

У больных, поступивших в стационар в сопоре и глубоком оглушении, показатели УИ и СИ практически не выходили за рамки нормальных показателей, лишь в первые сутки отмечалось незначительное их повышение, как правило, в результате умеренной артериальной гипертензии либо тахикардии.

*Таблица 3*

**Показатели системной гемодинамики у больных с тяжёлой черепно-мозговой травмой**

| Сутки после травмы | Системные гемодинамические показатели (медиана, 25-й, 75-й процентили) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Сопор | | Поверхностная кома | | Глубокая кома | |
| | УИ | СИ | УИ | СИ | УИ | СИ |
| 1-2 | 48,9 (38,4-56,3) | 4,24 (4,12-4,87) | 54,3 (48,5-59,3) | 4,66 (4,23-4,77) | 56,2 (49,3-59,6) | 4,78 (4,33-5,07) |
| 3-5 | 46,5 (39,3-49,8) | 4,03 (3,66-4,22) | 52,5 (48,3-57,4) | 4,58 (3,86-4,74) | 55,3 (49,9-58,7) | 4,76 (4,32-4,97) |
| 6-7 | 38,5 (32,4-46,3) | 3,66 (3,22-3,78) | 50,5 (44,6-52,7) | 4,06 (3,62-4,47) | 55,6 (46,6-57,6) | 4,37 (3,96-4,55) |
| 8-10 | 42,5 (33,4-44,8) | 3,74 (3,22-3,87) | 47,3 (36,4-50,2) | 4,1 (3,82-4,38) | 51,9 (46,7-55,5) | 4,41 (3,88-4,55) |
| 11-14 | 40,7 (34,3-46,4) | 3,55 (3,1-3,75) | 46,1 (32,1-49,7) | 3,88 (3,23-4,16) | 45,4 (37,2-50,9) | 4,22 (3,62-4,56) |

Примечание: УИ – ударный индекс (мл/м$^2$), СИ – сердечный индекс (л/мин*м$^2$).

При угнетении сознания до поверхностной комы имелись сдвиги УИ и СИ в сторону их повышения, которые начинались с первых посттравматических суток и сохранялись в течение 3-7 дней. Аналогичная динамика наблюдалась у больных с более глубоким угнетением сознания, но повышение УИ и СИ регистрировалось более длительно – до 8-10-х суток после травмы.

Во всех трёх исследованных группах уже при поступлении был повышенный периферический сосудистый тонус, причём величина ОПСС зависела от тяжести полученной травмы **(рис.23)**. Так, у больных с менее тяжёлой травмой (I группа) ОПСС составляло от 130 до 141% нормальных показателей в 1-2-е и 3-5-е сутки, а в дальнейшем постепенно снижалось, однако и к концу второй недели наблюдения всё-таки несколько

превышало норму – 2780(2400-3240) дин*с/(см$^2$*м$^2$). Сдвиги у больных, поступивших в стационар в поверхностной коме были более выражены: на всех этапах исследования ОПСС было выше, а на 6-7-е и 8-10-е сутки, в отличие от сравниваемой группы, снижение было менее ощутимым, что свидетельствовало о сохраняющемся периферическом вазоспазме. К 10-14-м суткам ОПСС снижалось до 3010(2670-3250) дин*с/(см$^2$*м$^2$), что превышало норму почти в полтора раза.

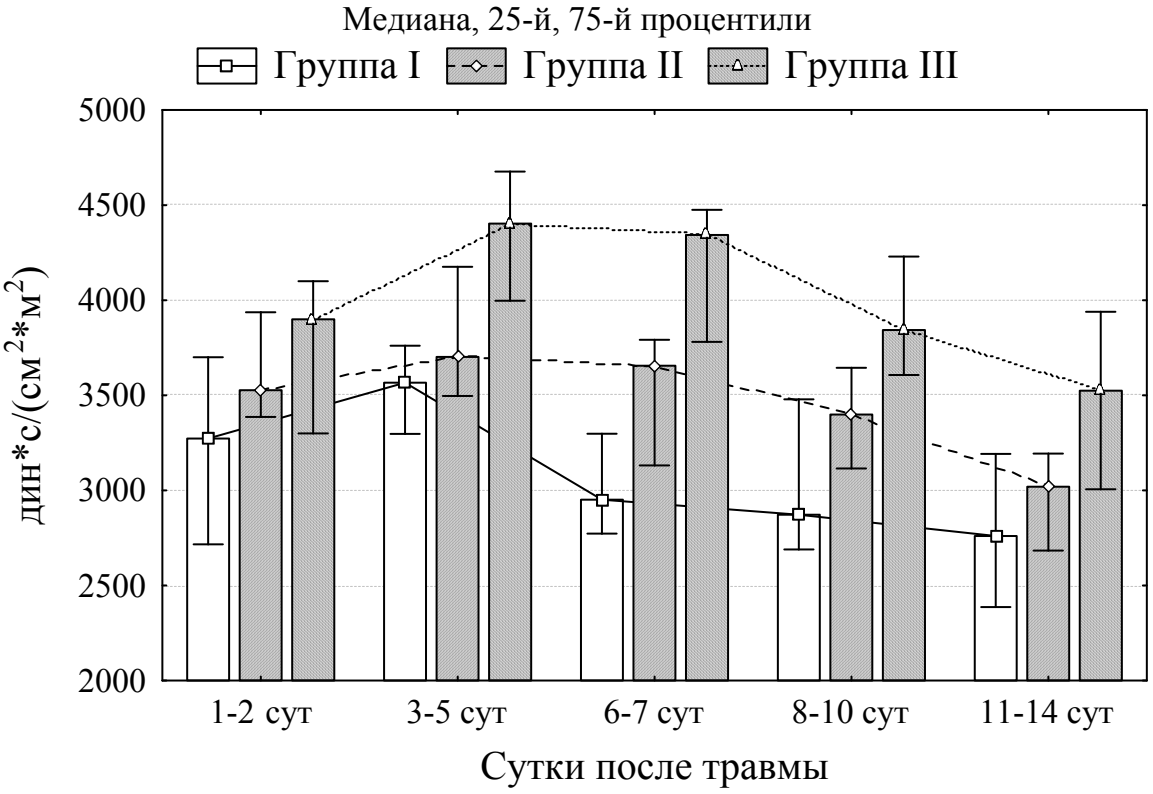



**Рис. 23. Общее периферическое сосудистое сопротивление у больных с тяжёлой черепно-мозговой травмой**

Наиболее значительное повышение периферического сосудистого сопротивления отмечалось у больных III группы, у которых уже с первых суток после травмы оно более чем в полтора раза превышало нормальные значения, а на 3-7-е сутки, на фоне развивающегося в ответ на травматическое воздействие отёка мозга, возрастало почти в два раза ($p_{U\ (III-I)}$<0,001). Несмотря на проводимую терапию, к исходу второй недели ОПСС оставалось значительно повышенным –

3520(3010-3920) дин*с/(см$^2$*м$^2$), хотя и имело тенденцию к снижению.

Среднее капиллярное давление, как показатель, характеризующий состояние транскапиллярного обмена, также варьировало на различных этапах течения травматической болезни и в определённой мере отражало тяжесть ЧМТ **(рис. 24)**. У больных I группы значимое повышение СКД отмечалось лишь на 3-5-е сутки, а в дальнейшем практически не выходило за рамки нормальных показателей.

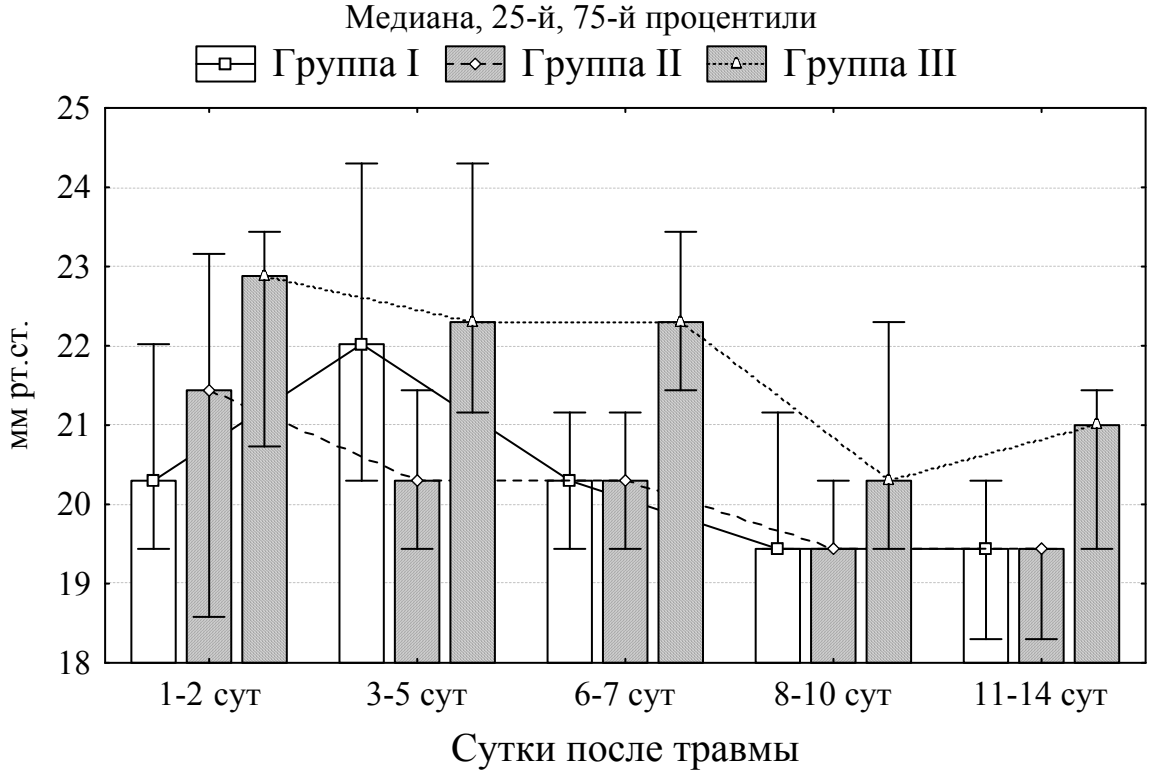



**Рис. 24. Среднее капиллярное давление у больных с тяжёлой черепно-мозговой травмой**

В то же время, у больных с более тяжёлой травмой уровень СКД оставался высоким вплоть до седьмых суток после травмы, ощутимо снижаясь лишь с начала второй недели.

Высокие цифры ОПСС и СКД, наряду со снижением нитрита крови, свидетельствуют об общности механизмов регуляции местного сосудистого тонуса и системных гемодинамических реакций. При этом повышение периферического сопротивления может способствовать усугублению гипоксических и

ишемических повреждений тканей и органов, нарушению церебральной гемодинамики, а вкупе с недостаточной нитроксидергической релаксацией мозговых сосудов может предопределять развитие и поддержание церебрального вазоспазма. Высокое СКД, в свою очередь, может приводить к нарушению транскапиллярного обмена жидкости и, соответственно, увеличению проницаемости сосудистой стенки с возможным усугублением отёка тканей, в.т.ч. и головного мозга.

Анализ показателей системной гемодинамики, транскапиллярного обмена и оценки неврологического статуса показал, что при тяжёлой ЧМТ существуют статистически значимые различия в зависимости уровня нитрита в плазме крови. Для выявления связи между этими показателями был проведён корреляционный анализ данных с применением непараметрического коэффициента Спирмена, данные которого представлены **в табл. 4**.

*Таблица 4*

**Результаты корреляционного анализа показателей в зависимости от уровня нитрита крови**

| Показатель | Значение коэффициента корреляции $r_s$ | T (N-2) | p-level |
|---|---|---|---|
| СИ, л/мин* $м^2$ | 0,23673 | 2,26499 | 0,10378 |
| УИ, мл/$м^2$ | 0,21564 | 2,00845 | 0,16445 |
| ОПСС, дин*с/($см^2$*$м^2$) | 0,46498 | 6,65721 | 0,001375 |
| СКД, мм рт.ст. | 0,37442 | 5,98326 | 0,00462 |
| КОД, мм рт.ст | -0,24894 | 3,14203 | 0,20465 |

Проведённые исследования выявили функциональную взаимосвязь между нарушениями системной гемодинамики и состоянием нитроксидергической системы у больных тяжёлой ЧМТ. Были выявлены статистически значимые корреляции различных показателей с уровнем нитрита крови. При этом наиболее тесными были корреляции нитрита крови с величиной ОПСС ($r_s$=0,46; p=0,001) и СКД ($r_s$=0,37; p=0,004). Уровень нитрита крови у пострадавших был значительно ниже, чем в группе клинического сравнения. Наиболее низкая его концен-

трация отмечалась у больных с угнетением сознания до глубокой комы (менее 6 баллов ШКГ). Таким образом, наблюдаемое снижение уровня нитрита в крови свидетельствует об усугублении дисфункции нитроксидергической системы на фоне неблагоприятного течения ЧМТ и позволяет рассматривать исследование этого показателя в качестве одного из информативных показателей оценки степени тяжести травмы.

Клиническое течение травмы характеризовали глубина и продолжительность угнетения сознания, а также выраженность и динамика очаговой симптоматики.

Для определения тяжести повреждения головного мозга у больных оценивали степень угнетения сознания по шкале ком Глазго [Teasdale G., Jennet B., 1974-1989].

Неврологический статус определялся с применением индекса очаговой симптоматики (А.А. Старченко, 2002), при этом учитывали стволовые (зрачковые и корнеальные рефлексы, нистагм, патологические знаки) и полушарные (двигательные, речевые, краниобазальные) симптомы:

I. Стволовые признаки:

1) *нет нарушений* – нет анизокории, корнеальные рефлексы сохранены, нет нистагма, живая прямая и содружественная реакция зрачков на свет – 1 балл;

2) *начальные нарушения* – корнеальные рефлексы снижены с одной или обеих сторон, клонический спонтанный нистагм, незначительная анизокория – 2 балла;

3) *выраженные нарушения* – выраженная анизокория, клоно-тонический нистагм, снижение реакции зрачков на свет с одной или обеих сторон, умеренный парез взора вверх, двусторонние патологические знаки – 3 балла;

4) *грубые нарушения* – грубая анизокория, глубокий парез взора вверх, тонический множественный спонтанный нистагм или плывущий взор, грубая дивергенция глазных яблок по горизонтальной или вертикальной оси, грубо выраженные двусторонние патологические знаки, частые экстензорные судороги – 4 балла;

5) *критические нарушения* – двухсторонний мидриаз с отсутствием реакции зрачков на свет, арефлексия, мышечная атония – 5 баллов.

II. Полушарные и краниобазальные признаки:

1) *нет нарушений* – сухожильные и кожные рефлексы нормальные с обеих сторон, нет патологических рефлексов и парезов конечностей -1 балл;

2) *начальные нарушения* – снижение (или отсутствие) брюшных рефлексов, одностороннее повышение сухожильных рефлексов, умеренно выраженные патологические знаки с одной стороны, мягкий моно- или гемипарез, мягкие речевые нарушения – 2 балла;

3) *выраженные нарушения* – выраженный моно- и гемипарез, выраженные парезы черепных нервов, выраженные речевые нарушения, пароксизмы клоно-тонические судороги в конечностях – 3 балла;

4) *грубые нарушения* – грубо выраженные моно– и гемипарезы или параличи, грубые речевые нарушения, часто повторяющиеся клоно-тонические судороги в конечностях – 4 балла;

5) *критические нарушения* – трипарез, триплегия, тетрапарез, тетраплегия, двухсторонний парез лицевого нерва, тотальная афазия, постоянные судороги в конечностях -5 баллов.

Суммарные числовые значения стволовых и полушарных признаков составили индекс очаговой неврологической симптоматики (максимум 10 баллов).

В I группе исходная оценка по шкале Глазго составила 9,25 балла и постепенно повышалась в ходе наблюдения до 14,1 балла к концу второй недели. У больных II и III групп при поступлении отмечался более низкий уровень сознания – 6,25 и 5,3 баллов соответственно ($p_U$ <0,01). На 3-5-е сутки лечения в этих группах средние величины, характеризующие уровень сознания, составили 6,45 баллов ШКГ, а к 6-7 суткам достигали 8,3 и 6,9 баллов соответственно ($p_{U\ II-III}$<0,05). В дальнейшем у больных, поступивших в умеренной коме, наблюдалось более быстрое восстановление сознания, и к концу второй недели его оценка по ШКГ составила 12,3 балла. В то же время, больные,

поступившие в стационар в состоянии глубокой комы, к 10-14-м суткам после травмы имели более низкий уровень сознания – 8,6 баллов ШКГ ($p_U$<0,001) **(рис. 25)**.

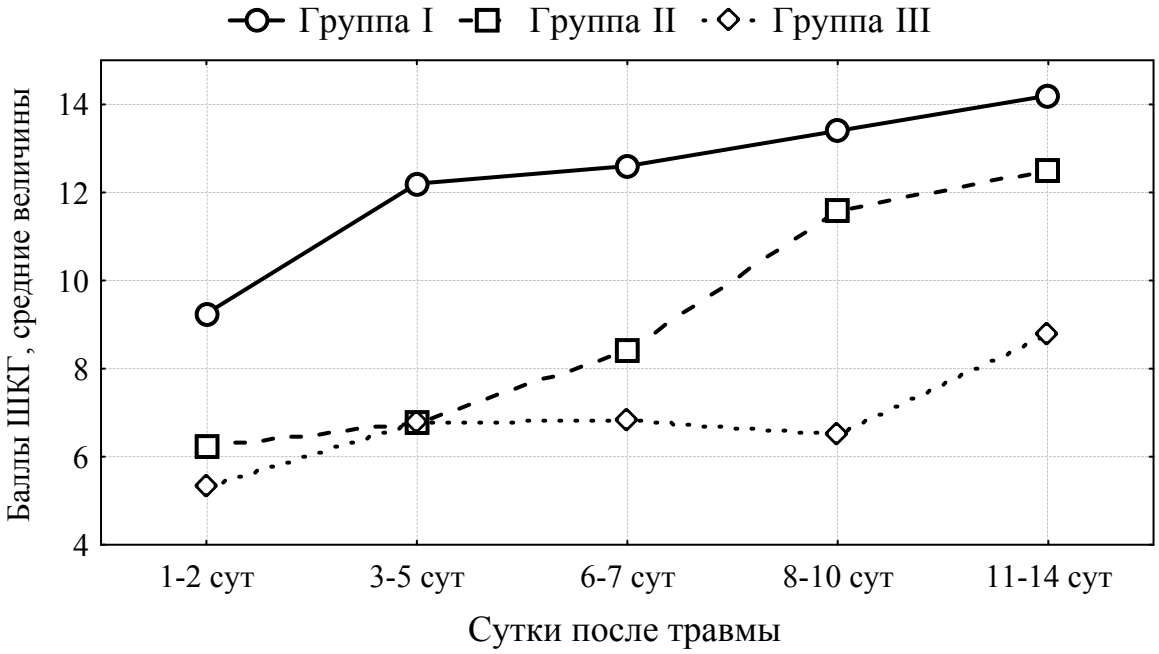



**Рис. 25. Уровень сознания у больных с тяжёлой черепно-мозговой травмой**

Соответственно возрастанию тяжести травмы у больных усиливалась степень неврологического дефицита и была более выражена очаговая симптоматика **(рис. 26)**.

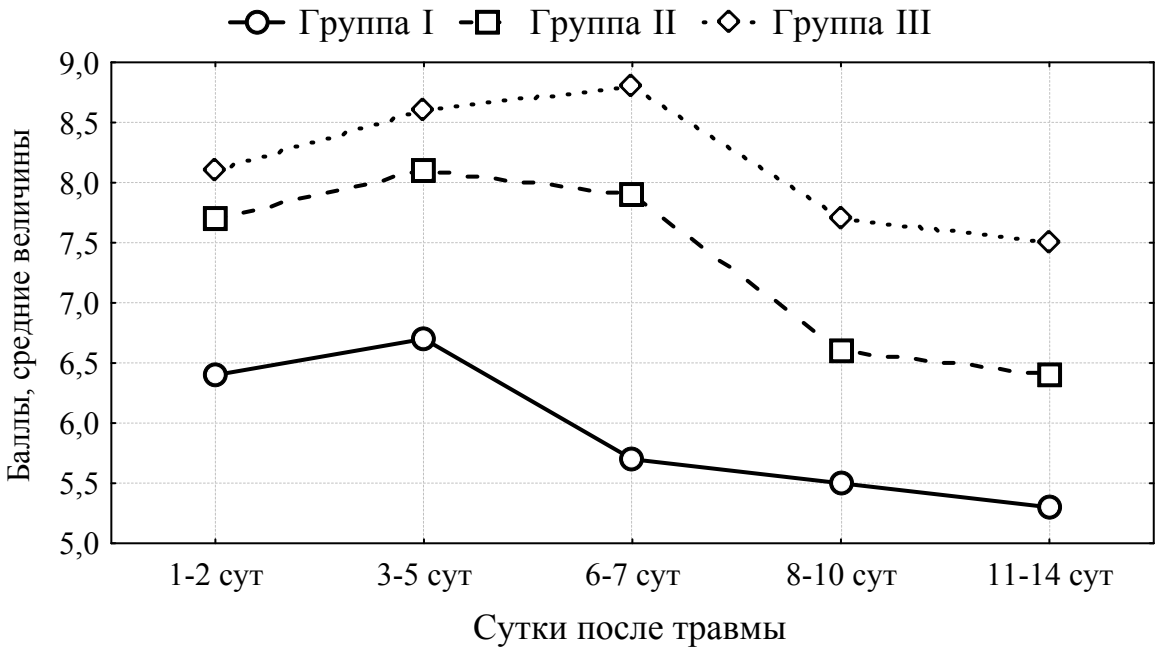



**Рис. 26. Индекс очаговой симптоматики у больных с тяжёлой черепно-мозговой травмой**

У больных с менее тяжёлой травмой (I группа) ИОС снизился с 6,45 усл.ед. в 1-2-е сутки до 5,3 усл.ед. к концу второй недели наблюдения. У больных II группы ИОС был более высоким на всех этапах, однако имел отчётливую тенденцию к снижению с 7,65 до 6,5 усл.ед (в начале и конце наблюдения). В III группе, представленной наиболее тяжёлыми больными, чаще встречались грубые очаговые признаки – стойкая анизокория либо двухсторонний мидриаз с отсутствием реакции зрачков на свет, парез взора, дивергенция глазных яблок по горизонтальной или вертикальной оси, глубокие парезы и параличи, двусторонние патологические знаки, экстензорные судороги и мышечная атония. Исходный ИОС у больных этой группы возрастал с 8,1 до 8,6 к третьим суткам и до 8,7 усл.ед. к 6-7-м суткам после травмы, при этом отмечались более выраженные клинические проявления отёка и дислокации головного мозга, подтверждённые контрольными КТ-исследованиями.

Таким образом, нарушения в звене нитроксидергической регуляции зависят от тяжести полученной ЧМТ и сопряжены с изменениями системной гемодинамики, транскапиллярного обмена и неврологической симптоматикой, отражая течение острого периода травмы. При этом уровень нитрита крови у

пострадавших значительно ниже, чем в группе клинического сравнения. Наиболее низкая его концентрация отмечалась у больных с угнетением сознания до глубокой комы (менее 6 баллов ШКГ). Наблюдаемое снижение уровня нитрита в крови свидетельствует об усугублении дисфункции нитроксидергической системы на фоне неблагоприятного течения ЧМТ и позволяет рассматривать исследование уровня нитрита крови в качестве одного из информативных показателей оценки степени тяжести и течения травмы.

### 5.3. Динамика нитрита крови и ликвора при тяжёлых ушибах и сдавлении головного мозга внутричерепными гематомами

При сочетании ушиба головного мозга тяжёлой степени со сдавлением его внутричерепными гематомами (ВЧГ) различных локализаций (эпи- и субдуральные, внутримозговые) уже в первые сутки после травмы наблюдались более низкие показатели нитрита крови – 1,59(1,19-1,9) мкмоль/л, чем у больных с изолированными ушибами головного мозга (УГМ) – 2,23(1,92-2,47) мкмоль/л ($p_U$<0,05). Значимые различия сохранялись до 3-5-х суток наблюдения, когда показатели нитрита крови составили соответственно 1,54(1,11-1,87) и 2,3(2,18-2,48) мкмоль/л ($p_U$<0,001). В дальнейшем уровень нитрита у больных с изолированными УГМ восстанавливался быстрее, достигая к 8-10-м суткам 2,4(2,17-2,61) мкмоль/л, в то время как у больных, которым было проведено удаление ВЧГ, он не превышал 1,83(1,6-2,48) мкмоль/л. К концу второй недели наблюдения у больных с ушибами головного мозга показатели нитрита крови были несколько выше, чем у тех, которым было проведено хирургическое лечение **(рис. 27)**. Возможно, что полученные результаты объясняются большей тяжестью травмы в группе больных с внутричерепными гематомами и сдавлением головного мозга, а также фактом перенесённого оперативного вмешательства.

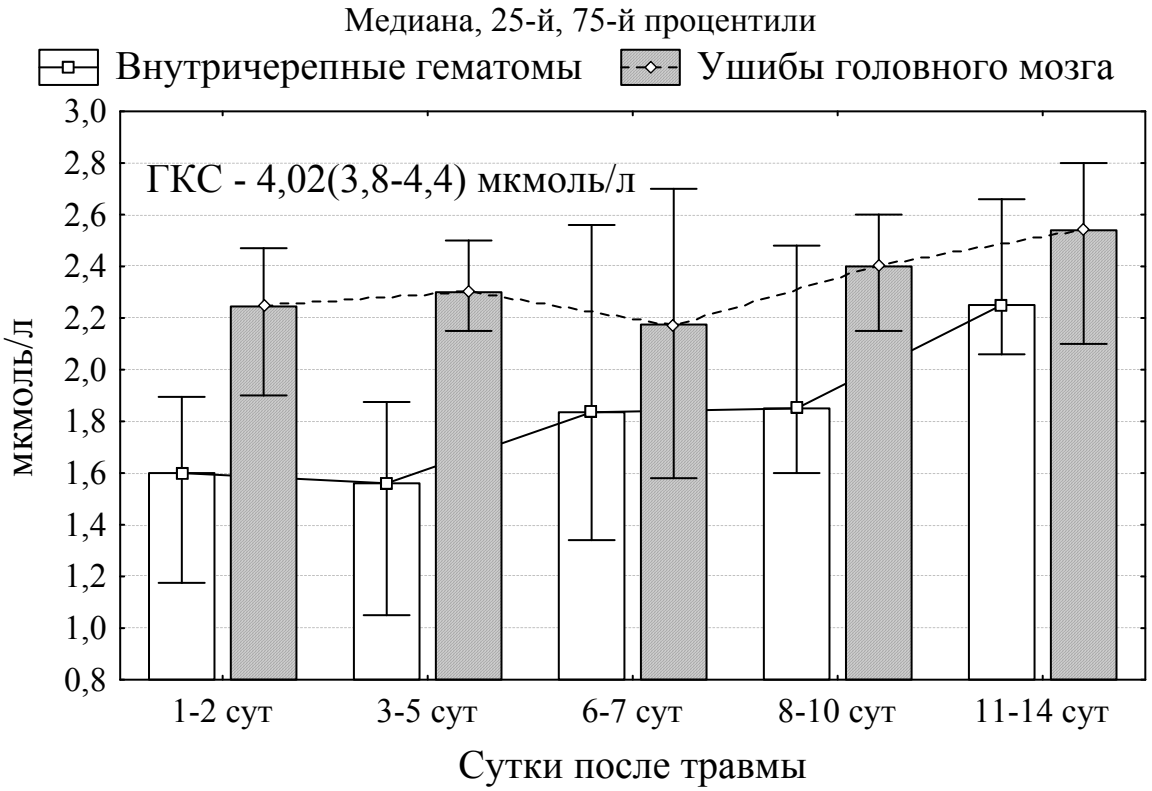



**Рис. 27. Уровень нитрита крови в зависимости от характера повреждения головного мозга**

Исследованию содержания метаболитов оксида азота в цереброспинальной жидкости посвящён ряд работ как отечественных, так и зарубежных авторов. Часть из них проводилась у больных с острой нейрохирургической патологией. В основном, определению подвергались суммарные конечные метаболиты NO.

В работе Голикова П.П. (2003) приведены интересные данные по исследованию содержания метаболитов оксида азота в цереброспинальной жидкости пациентов с тяжёлой черепно-мозговой травмой. Для оценки состояния нитроксидергической системы авторы применили методику определения NOx (нитрата + нитрита) путём восстановления нитрита до нитрата в присутствии ионов кадмия. При черепно-мозговой травме различной тяжести концентрация NOx в спинномозговой жидкости увеличивалась до 25±6,75 мкмоль/л (при норме 3-6 мкмоль/л), т.е. в 4-8 раз. Повышение концентрации нитри-

та/нитрата в ЦСЖ автор считает объективным критерием интенсивности воспалительного процесса в структурах мозга.

Сложность верификации нормального уровня нитрита в ЦСЖ связана с трудностями получения её у здоровых людей. Поэтому мы так же, как и другие авторы, за относительную норму принимали бесцветную цереброспинальную жидкость с нормальным цитозом и уровнем белка у обследуемых пациентов.

Несмотря на то, что в своей работе мы измеряли уровень нитрита, а не суммарные показатели (нитрит+нитрат), значения нитрита в ликворе также были приблизительно в 10 раз ниже, чем в крови - 0,42±0,12 мкмоль/л, что соответствует данным литературных источников. Согласно сообщениям ряда авторов, концентрация нитрита + нитрата (NOx) в спинномозговой жидкости здоровых волонтеров составляла 2-3 мкмоль/л, что на порядок ниже, чем в сыворотке крови [Голиков П.П., 2003; Suzuki Y., 1997; Yumite Y. et al., 2001].

Нами было проведено исследование цереброспинальной жидкости у 54 больных, из них у 33 были удалены внутричерепные объёмные образования, вызывающие компрессию головного мозга, а 21 получали комплекс консервативной терапии по поводу изолированных ушибов головного мозга тяжёлой степени **(рис. 28)**.

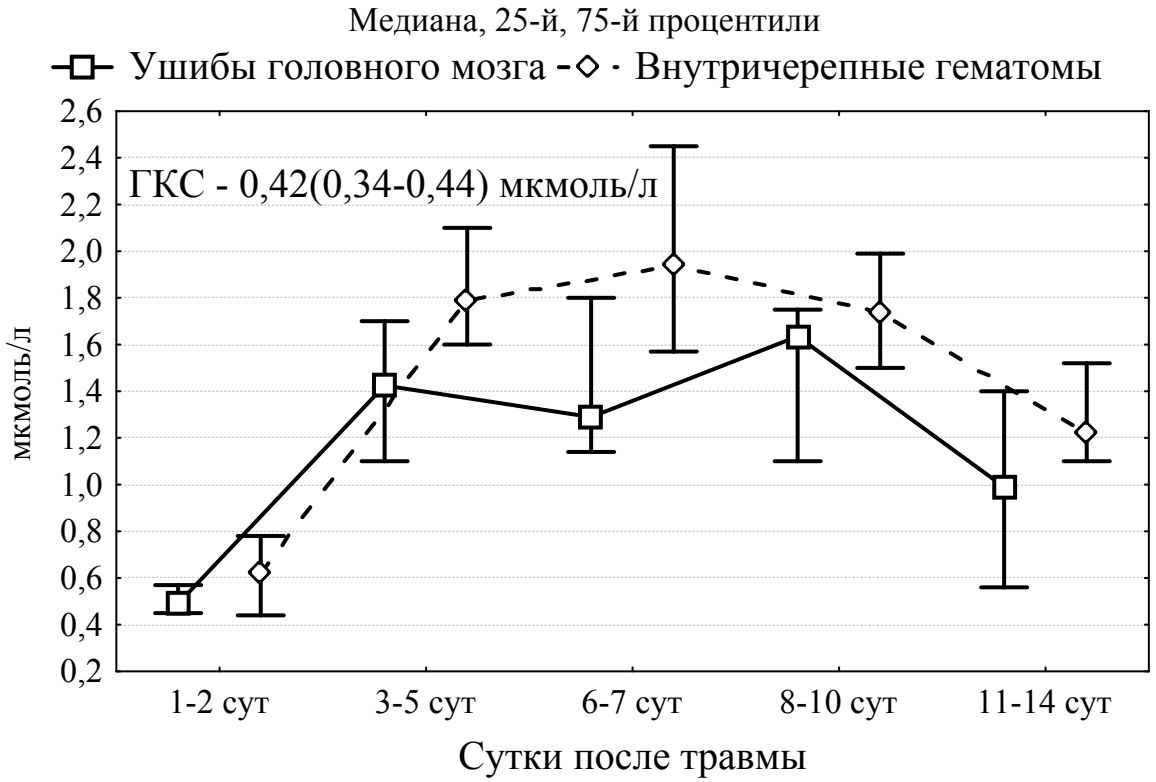



**Рис. 28. Уровень нитрита ликвора в зависимости от характера повреждения головного мозга**

В 1-2-е сутки после получения травмы у больных с изолированными ушибами головного мозга уровень нитрита ЦСЖ существенно не изменялся по сравнению с контрольными значениями и составлял 0,44(0,42-0,57) мкмоль/л, однако уже к 3-5-м суткам его концентрация возрастала в три раза – до 1,41(1,05-1,72) мкмоль/л, и оставалась повышенной вплоть до 8-10-х суток наблюдения. К концу второй недели уровень нитрита в ликворе у больных этой группы снижался до 1,0(0,57-1,4) мкмоль/л, что более чем в два раза превышало исходные значения.

В группе больных со сдавлением головного мозга внутричерепными гематомами регистрировались более высокие показатели нитрита в ЦСЖ: на 3-5-е сутки его уровень увеличивался до 1,78(1,6-2,11) мкмоль/л, а на 6-7-е – до 1,93(1,57-2,44) мкмоль/л. Уже к 8-10-м суткам после травмы намечалась тенденция к снижению концентрации нитрита в ликворе, также как и в случаях изолированных ушибов головного мозга,а к ис-

ходу второй недели наблюдения уровень нитрита превышал исходные значения в два раза, составив 1,21(1,05-1,52) мкмоль/л. На всех этапах наблюдения межгрупповые различия в показателях нитрита ЦСЖ не были статистически значимы, что указывает на отсутствие зависимости между характером травматического повреждения головного мозга и уровнем нитрита в ликворе. В то же время, прослеживается отчётливая тенденция к повышению концентрации нитрита в ЦСЖ с третьих-пятых суток, которое сохраняется вплоть до конца второй недели пребывания больного в стационаре.

В клинической картине у больных с тяжёлыми ушибами головного мозга зачастую доминировала первично-стволовая симптоматика, которая в первые дни после травмы затушевывала очаговые полушарные симптомы. У этих больных чаще наблюдались генерализованные и фокальные судорожные припадки, в большей степени было выражено психомоторное возбуждение.

При изучении системных гемодинамических показателей (СИ, УИ, ОПСС), а также показателей, характеризующих транскапиллярный обмен (КОД, СКД и их соотношение), значимых различий в сравниваемых группах не выявлено, что указывает на отсутствие существенного влияния характера травматического повреждения на механизмы их регуляции. Сдвиги в нитроксидергической системе и нарушение системной гемодинамики отражали в большей степени тяжесть полученной травмы, нежели характеризовали характер повреждения (ушиб или компрессия головного мозга).

Таким образом, сравнение данных с учётом характера травматического повреждения головного мозга позволило прийти к выводу, что значимые различия в показателях нитроксидергической системы наблюдались с первых до 3-5-х суток после получения травмы, а в дальнейшем уровень нитрита крови существенно не отличался.

При тяжёлых ушибах головного мозга, осложнённых его компрессией внутричерепными гематомами, регистрировались более низкие цифры нитрита крови, нежели у больных с изолированными ушибами, получавших консервативную терапию.

Одновременно на всех этапах наблюдения отмечалось значимое повышение концентрации нитрита в ликворе, начиная с 3-5-х суток, вплоть до конца второй недели пребывания больного в стационаре, которое не зависело от характера травмы.

Увеличение продукции NO в мозговой ткани объясняется активацией индуцибельной синтазы оксида азота, что сопровождается, как правило, усилением генерации супероксидного анион-радикала ($O_2^-$) и образованием высокотоксичного пероксинитрита ($ONOO^-$) и приводит к повреждению клеточных структур, мутациям ДНК и интенсивному апоптозу [Awasthi D., 1997; Fukai T., 2000; Johnson M.L. et al., 1998]. Нейротоксический эффект оксида азота при этом может приводить к расширению очага некроза мозговой ткани и вторичному повреждению прилежащих структур.

Прямое взаимодействие NO с такими активными формами кислорода, как супероксидный анион-радикал является важным моментом в механизме передачи сигнала в тканях. Это следует из высокой эффективности химической реакции между супероксидным анион-радикалом и оксидом азота, биомолекулярная константа которой составляет $7*10^9*M^{-1}*c^{-1}$ [Beckman J.S., 1996]. Поскольку скорость реакции оксида азота с супероксидным анион-радикалом в три раза выше, чем скорость генерации последнего супероксиддисмутазой, то NO успешно конкурирует с СОД за супероксидный анион-радикал. Продукт этой реакции – пероксинитрит, который обладает гораздо большей реакционной способностью, чем оксид азота или супероксидный анион-радикал. Он участвует во многих химических реакциях в биологических системах, в том числе в нитровании остатков тирозина в белках, инициации перекисного окисления липидов, инактивации аконитаз, подавлении транспорта электронов в митохондриях и в окислении биологических тиолов. Пероксинитрит также является сильным ДНК-расщепляющим агентом. Эти химические реакции могут вызывать такие серьёзные биологические последствия, как мутации различных клеток и апоптоз [Зенков Н.К. и др., 2001].

## 5.4. Влияние интенсивности субарахноидальной геморрагии на нарушения в нитроксидергической системе

Известно, что тяжёлая черепно-мозговая травма практически всегда сопровождается субарахноидальной геморрагией различной интенсивности от небольшого скопления крови в конвекситальных и базальных пространствах до прорыва в вентрикулярную систему мозга с тампонадой желудочков и блокадой путей ликворотока. Массивная САГ в этих случаях является фактором, определяющим тяжесть травмы и влияющим на её исход [Taneda H., 1996].

Нами было проведено исследование по оценке клинического течения тяжёлой ЧМТ и связанных с ней нарушений в нитроксидергической системе с учётом интенсивности субарахноидальной геморрагии.

Главными критериями для оценки тяжести субарахноидальной геморрагии считали изменение состава цереброспинальной жидкости, а также данные КТ головного мозга.

Для расчета объема излившейся крови в цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) при субарахноидальной геморрагии обычно используется следующая формула [Самойлов В.И., 1991]:

$$V_{(Эр.)} = \frac{Эр._{(ЦСЖ)} \times V_{(ЦСЖ)}}{Эр._{(Кр.)}}$$

*где $V_{(Эр.)}$ – объем субарахноидально излившихся эритроцитов,*

*$Эр._{(ЦСЖ)}$ - количество эритроцитов в ЦСЖ ($10^6$/л),*

*$Эр._{(Кр.)}$ - количество эритроцитов в крови ($10^{12}$/л),*

*$V_{(ЦСЖ)}$ – объем ЦСЖ у пациента, который обычно принимается за константу, равную 150 мл или 0,15 л.*

Однако по данной формуле рассчитывается только объем излившихся эритроцитов, без учета плазменной составляющей цельной крови. Для вычисления всего объема крови, попадающей в субарахноидальное пространство, целесообразно использование соответствующей поправки, учитывающей как клеточный, так и глобулярный компоненты. В качестве этой поправки наиболее правильно использовать такой показатель, как гематокрит. Формула в этом случае будет выглядеть следующим образом:

$$Эр._{(ЦСЖ)} \times V_{(ЦСЖ)} \times 100$$

$$V_{(Кр.)} = \frac{}{Эр._{(Кр.)} \ x \ Ht}$$

В рутинной лабораторной практике количество эритроцитов в ликворе обычно не считается, а производится подсчет лишь лейкоцитов. По уровню лейкоцитов достаточно сложно судить об объеме излившейся крови.

В начальной стадии кровоизлияния практически все лейкоциты ликвора можно отнести к попавшим извне, то есть вместе с кровью, так как в норме в цереброспинальной жидкости их содержится крайне незначительное количество, которым можно пренебречь в расчетах. С учетом вышеизложенного, нами предложена формула, позволяющая оценить количество субарахноидально излившейся крови по концентрации в ликворе лейкоцитов, то есть традиционно определяемого “цитоза”. Исходным для этого является предположение, что соотношение эритроцитов и лейкоцитов ликвора соответствует их соотношению в крови и, следовательно, количество эритроцитов в ликворе можно рассчитать как

$$Эр._{(ЦСЖ)} = (Лейк_{(ЦСЖ)} \ x \ Эр._{(Кр.)}) \ / \ Лейк_{(Кр.)}.$$

Модифицированная формула будет выглядеть следующим образом:

$$V_{(Кр.)} = \frac{Лейк_{(ЦСЖ)} \ x \ Эр_{(Кр.)} \ x \ V_{(ЦСЖ)} \ x \ 100}{Лейк_{(Кр.)} . \ x \ Эр._{(Кр.)} \ x \ Ht}, \text{ или } \frac{Лейк_{(ЦСЖ)} \ x \ V_{(ЦСЖ)} \ x \ 100}{Лейк_{(Кр.)} . \ x \ Ht}$$

Естественно, что данные расчетные формулы имеют высокую степень погрешности, и использовать их можно только для ориентировочной оценки интенсивности субарахноидального кровоизлияния в остром периоде заболевания, до появления в ликворе собственных фагоцитов субарахноидального пространства.

С учётом вышеперечисленных критериев, нами была выделена группа больных – САГ (1), у которых по данным КТ головного мозга отсутствовали признаки субарахноидального кровоизлияния или цитоз ликвора не превышал 500 клеток в мкл. Вторую группу – САГ (2) составили пациенты с наличием на компьютерных томограммах признаков субарахноидальной

геморрагии (повышение плотности в области базальных цистерн, боковой щели и субарахноидальных пространств), а также все больные с внутрижелудочковыми кровоизлияниями или уровнем плеоцитоза более 500 клеток в мкл.

В данных группах была проанализирована динамика нитрита крови **(рис.29)**.

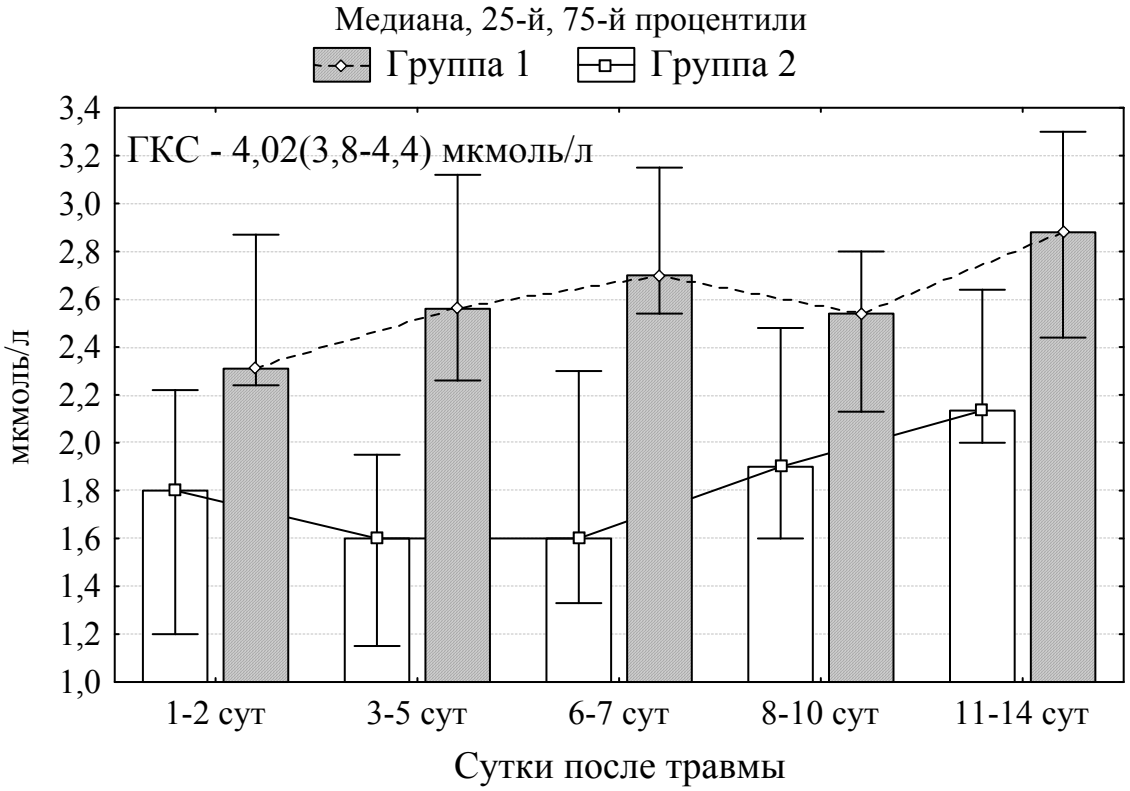



**Рис. 29. Уровень нитрита крови в зависимости от интенсивности субарахноидальной геморрагии**

В группе САГ (2) уже при поступлении и в первые сутки наблюдения отмечался более низкий уровень нитрита – 1,8(1,2-2,22) мкмоль/л, чем у больных группы САГ (1) – 2,31(2,24-2,87) мкмоль/л ($p_U$<0,01). Наиболее низкие показатели нитрита крови наблюдались с 3-5-х до 6-7-х суток после ЧМТ в группе больных с массивным кровоизлиянием в субарахноидальное пространство и желудочки мозга – 1,6(1,16-1,94) мкмоль/л, тогда как у больных с САГ меньшей интенсивности уровень нитрита составил 2,57(2,25-3,18) мкмоль/л ($p_U$<0,001). К концу второй недели лечения происходила постепенная нормализация этого показателя, однако у больных, перенесших интенсивную суб-

арахноидальную геморрагию, уровень нитрита крови оставался более низким – 2,13(2-2,64) мкмоль/л, чем у больных без кровоизлияния – 2,88(2,44-3,3) мкмоль/л.

Снижение нитрита крови, наблюдавшееся у больных группы САГ (2) с 3-5-х до 6-7-х суток, происходило параллельно с углублением комы и нарастанием очаговой неврологической симптоматики, причиной которых являлись посттравматический вазоспазм или отёк головного мозга, развивавшиеся в указанный временной период. В клинической картине присутствовали как стволовые, так и полушарные очаговые признаки: чаще возникали нарушения зрачковых рефлексов, отмечался нистагм и глазодвигательные нарушения, были более выражены патологические знаки, чаще возникал судорожный синдром, а также имелись нарушения в двигательной сфере (глубокие геми- и монопарезы, параличи), и грубые речевые нарушения (у 81% больных). У большинства больных (92%) выявлялись менингеальные симптомы различной интенсивности – светобоязнь, ограничение движений глазных яблок, ригидность затылочных мышц, симптомы Кернига, Брудзинского и др. Выраженность клинических признаков зависела от массивности САГ. Ряд больных этой группы предъявляли жалобы на интенсивные головные боли, усиливавшиеся при движении головы и сочетавшиеся нередко с тошнотой, рвотой, головокружением и вегетативными нарушениями (64%). В то же время, у больных группы САГ (1) с 3-5-х суток уровень нитрита крови начинал возрастать, отсутствовали симптомы отёка мозга и церебрального вазоспазма, раньше восстанавливалось сознание и отмечалось более благоприятное течение острого периода травмы.

Исследование содержания нитрита в ЦСЖ проведено у больных, разбитых на группы на основании вышеуказанных критериев оценки интенсивности САГ **(рис. 30)**.

В первые сутки после травмы у больных с группы САГ (1) уровень нитрита ликвора существенно не отличался от нормальных показателей и составил 0,47(0,43-0,54) мкмоль/л. К 3-5-м суткам его концентрация возрастала до 1,42(1,05-1,57) мкмоль/л, а в дальнейшем происходило постепенное снижение этого показателя, в результате к 10-14-м суткам наблюдения он

приблизился к исходным величинам и составил 0,59(0,47-0,64) мкмоль/л.

В группе САГ (2) исходная концентрация нитрита крови была несколько выше – 0,61(0,55-0,64) мкмоль/л, а к 3-5-м суткам после травмы возрастала менее существенно, составив 1,12(0,8-1,21) мкмоль/л. Однако, начиная с 6-7-х суток после травмы, у этих больных наблюдалось повышение концентрации нитрита в ЦСЖ в 3,9 раза, до 2,4(3,3-2,45) мкмоль/л ($p_W$<0,001). Высокий уровень нитрита сохранялся в ликворе и на 8-10-е сутки ($p_W$<0,01, $p_U$<0,001), и даже к концу второй недели наблюдения нормализации уровня нитрита не происходило и его концентрация превышала исходные показатели более чем в 2 раза ($p_W$<0,01).

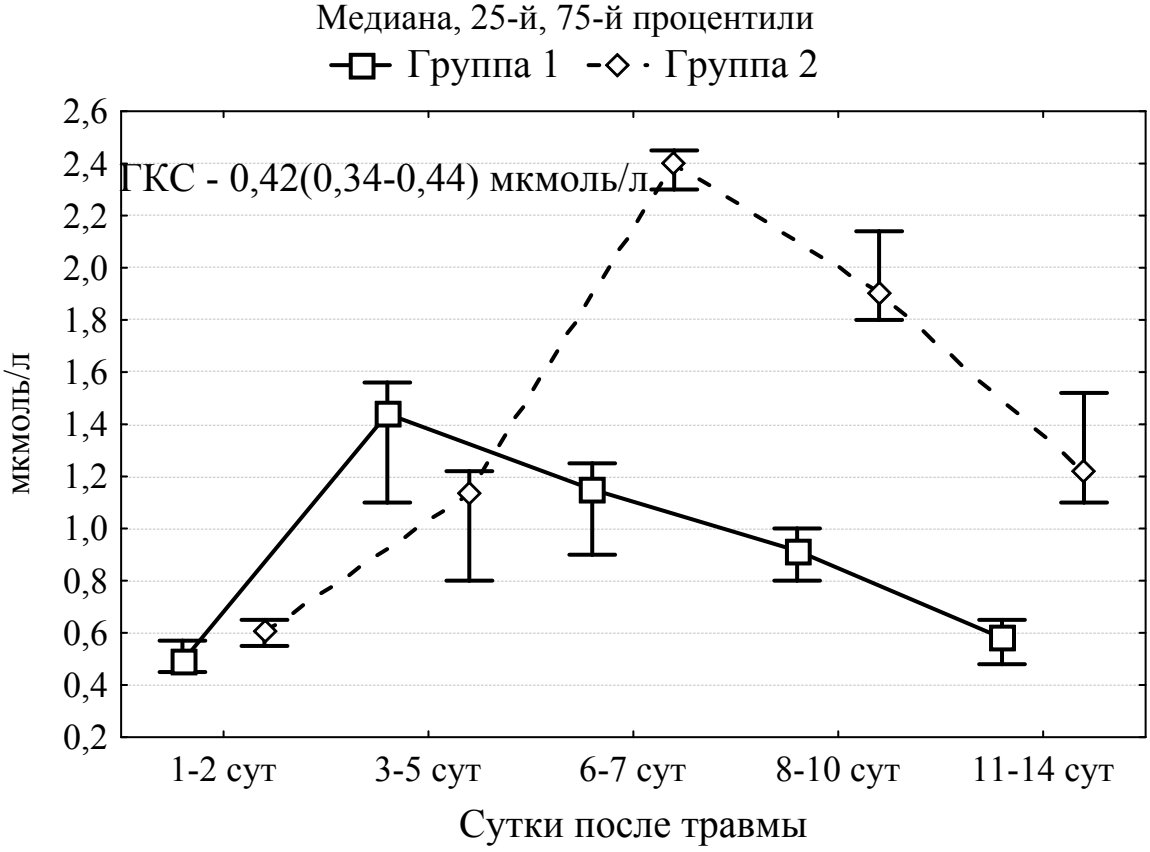



**Рис. 30. Уровень нитрита ликвора в зависимости от интенсивности субарахноидальной геморрагии**

При проведении инвазивного мониторинга ВЧД с использованием одноразовых систем «Hanny-Set» контроль содержания нитрита мы осуществляли путём забора пробы из внутри-

желудочкового катетера, т.к. при этом исключается опасность возникновения дислокации при наличии симптомов отёка-набухания головного мозга (особенно, в течение 3-7-х суток после травмы), возможно более частое исследование состава ЦСЖ, а также минимален риск развития внутричерепных гнойно-септических осложнений.

Наблюдаемое при черепно-мозговой травме повышение уровня нитрита в ликворе, объясняется, вероятно, развитием комплекса защитно-приспособительных реакций, в результате которых происходит компенсаторное увеличение продукции NO в мозговой ткани. При этом на фоне снижения общей продукции оксида азота в организме может наблюдаться повышение его синтеза в ткани мозга за счет нейрональной и индуцибельной изоформ NO-синтаз и реализация нейропротекторного эффекта путём адаптационных изменений локального кровотока. Необходимо учитывать, что редуцированный гемоглобин, образовавшийся в результате лизиса эритроцитов излившейся в субарахноидальное пространство крови, может активно связывать NO, вызывая дисбаланс в нитроксидергической системе и приводить к уменьшению нейропротекторного эффекта. Концентрация гемоглобина в ЦСЖ наиболее высока в первые сутки после травмы, а в дальнейшем уменьшается из-за трансформации его в билирубин.

Результаты проведённых исследований показали более низкий уровень нитрита в ликворе при наличии интенсивной субарахноидальной геморрагии на 3-5-е сутки после травмы и возрастание его к 6-7-м суткам. Одним из механизмов этого может являться трансформация некоторой части гемоглобина в билирубин, не обладающий способностью связывать оксид азота. Кроме этого, продукты лизиса эритроцитов излившейся крови могут способствовать стимуляции индуцибельной (макрофагальной) изоформы NO-синтазы с резким увеличением продукции оксида азота в мозговой ткани и последующей реализацией его нейротоксического эффекта, особенно в условиях нарушенной регуляции церебрального кровотока и сопутствующих явлений отёка-набухания головного мозга.

Санация ликвора продолжается не менее 2-3-х недель, её скорость зависит от количества крови, попавшей в субарахноидальное пространство. С развитием и совершенствованием методик экстракорпоральной ликворокоррекции (фильтрация и сорбция спинномозговой жидкости) в лечении массивной субарахноидальной геморрагии, в.т.ч., травматического генеза, позволяющих в более короткие сроки осуществлять санацию ликворопроводящих путей от дериватов гемоглобина излившейся крови, активно связывающих оксид азота, появились перспективы воздействия на патогенетический механизм посттравматического церебрального вазоспазма, развивающегося в ответ на дисфункцию эндотелиального звена. При этом удаление патологических субстратов (тромбин, редуцированный гемоглобин и др.) может способствовать нормализации баланса констрикторных и релаксирующих влияний за счет торможения экспрессии соответствующих генов либо активации ферментов, а также восстановления адекватного ликворотока. Несомненно, этот вопрос требует дальнейшего более детального изучения.

## 5.5. Возможности мониторинга нитроксидергической системы в оценке прогноза нейротравмы

Тяжесть повреждения головного мозга является неблагоприятным фактором, оказывающим влияние на исход травмы. Поэтому, несмотря на внедрение современных методов диагностики и лечения, наблюдается сравнительно высокая летальность, а среди выживших больных значительна степень глубокой инвалидизации.

Для оценки возможности использования показателей нитроксидергической системы для прогнозирования течения и возможного исхода черепно-мозговой травмы было проведено исследование содержания нитрита в крови и ликворе **(рис. 31)**:

Установлено, что уже в первые сутки после травмы у выживших больных наблюдался более высокий уровень нитрита в крови, чем у умерших – 2,21(1,66-2,42) и 1,57(1,2-2,09) мкмоль/л соответственно. К 6-7-м суткам на фоне частичного повышения уровня нитрита у выживших до 2,35(1,6-2,96)

мкмоль/л, в группе умерших впоследствии больных отмечалось его снижение до 1,33(0,86-1,54) мкмоль/л ($p_U$<0,01). К 8-10-м суткам наблюдения у выживших больных содержание нитрита в крови составило 2,41(2,1-2,58) мкмоль/л, в то время как в группе умерших больных оно оставалось низким и достигло лишь 1,75(0,8-1,85) мкмоль/л ($p_U$<0,001). К концу второй недели мониторинга различия в концентрации нитрита крови сохранялись, при этом у выживших больных она составила 2,57(2,33-2,83) мкмоль/л, что было ниже нормальных значений на 56%. В сравниваемой группе уровень нитрита оставался в 2,5 раза ниже нормы и составил 1,58(1,32-2,0) мкмоль/л ($p_U$<0,01).

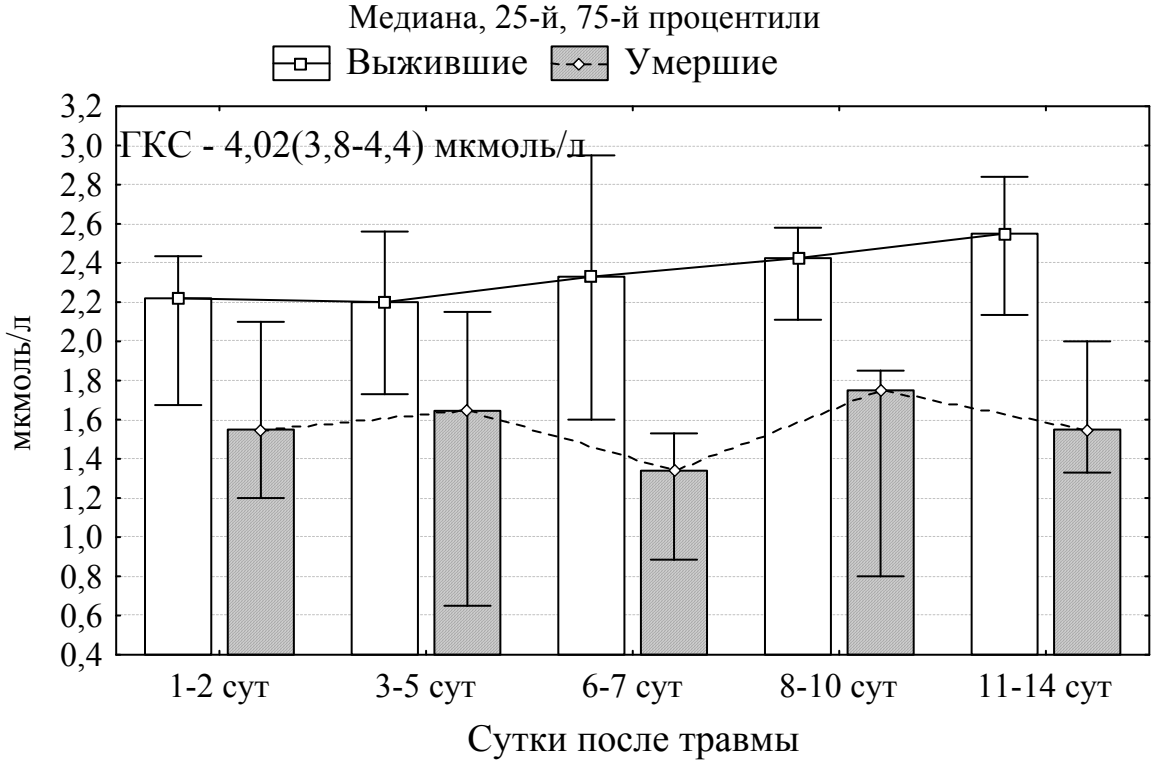



**Рис. 31. Уровень нитрита крови у выживших и умерших больных**

Выявленные различия, вероятно, могут определяться гибелью либо ишемическим повреждением большего количества клеток, продуцирующих оксид азота в условиях нарушенного церебрального кровообращения и системной гемодинамики у больных с более тяжёлой травмой. Возникающий при этом дефицит оксида азота может приводить к нарушению механизмов

ауторегуляции и развитию посттравматического церебрального и периферического вазоспазма за счет избыточного констрикторного влияния.

При изучении состава ЦСЖ было выяснено, что в первые сутки после травмы в обеих группах не наблюдалось существенного изменения концентрации нитрита по сравнению с референтными значениями **(табл. 5)**.

*Таблица 5*

**Уровень нитрита ликвора у выживших и умерших больных (медиана, 25-й, 75-й процентили, мкмоль/л)**

| Сутки после травмы | Выжившие | Умершие |
|---|---|---|
| 1-2 сут | 0,44(0,38-0,52) | 0,62(0,56-0,68) |
| 3-5 сут | 1,32(1,06-1,49) | 1,82(1,6-2,17) $p_U<0,01$ |
| 6-7 сут | 1,02(0,84-1,2) | 2,42(2,38-2,56) $p_U<0,001$ |
| 8-10 сут | 0,81(0,67-0,98) | 1,72(1,57-1,99) $p_U<0,001$ |
| 11-14 сут | 0,56(0,43-0,6) | 1,21(1,1-1,52) $p_U<0,05$ |

Однако, начиная с 3-5-х суток, в обеих сравниваемых группах уровень нитрита повышался почти в три раза, причём у выживших больных в дальнейшем происходила постепенная нормализация его содержания уже к концу второй недели наблюдения. В то же время, в группе умерших больных концентрация нитрита в цереброспинальной жидкости оставалась высокой. Более того, на 6-7-е сутки происходило дальнейшее её возрастание с превышением исходных значений в четыре раза. К концу второй недели уровень нитрита в исследуемой группе был в три раза выше нормальных показателей.

Установленный факт особенно интересен при сопоставлении с данными о содержании нитрита в ЦСЖ при массивной субарахноидальной геморрагии. Динамика нитрита в ЦСЖ в обоих случаях представляется сходной, за исключением периода 3-5-х суток наблюдения, когда повышение уровня нитрита у больных с массивной субарахноидальной геморрагией менее

выражено. Вполне возможно, интенсивность САГ в данном случае отражает тяжесть повреждения головного мозга и определяет не только течение травмы, но и её прогноз. С этих позиций мониторинг нитроксидергической системы может оказаться полезным для уточнения степени интенсивности субарахноидального кровоизлияния и вероятности развития интракраниальных сосудистых нарушений (посттравматический вазоспазм).

Анализ показателей транскапиллярного обмена проводился у всех больных от момента поступления в стационар до конца второй недели после травмы. Было выяснено, что в группе умерших больных соотношение между коллоидно-онкотическим и средним капиллярным давлениями было ниже, чем среди выживших на всех этапах наблюдения **(рис. 32)**.

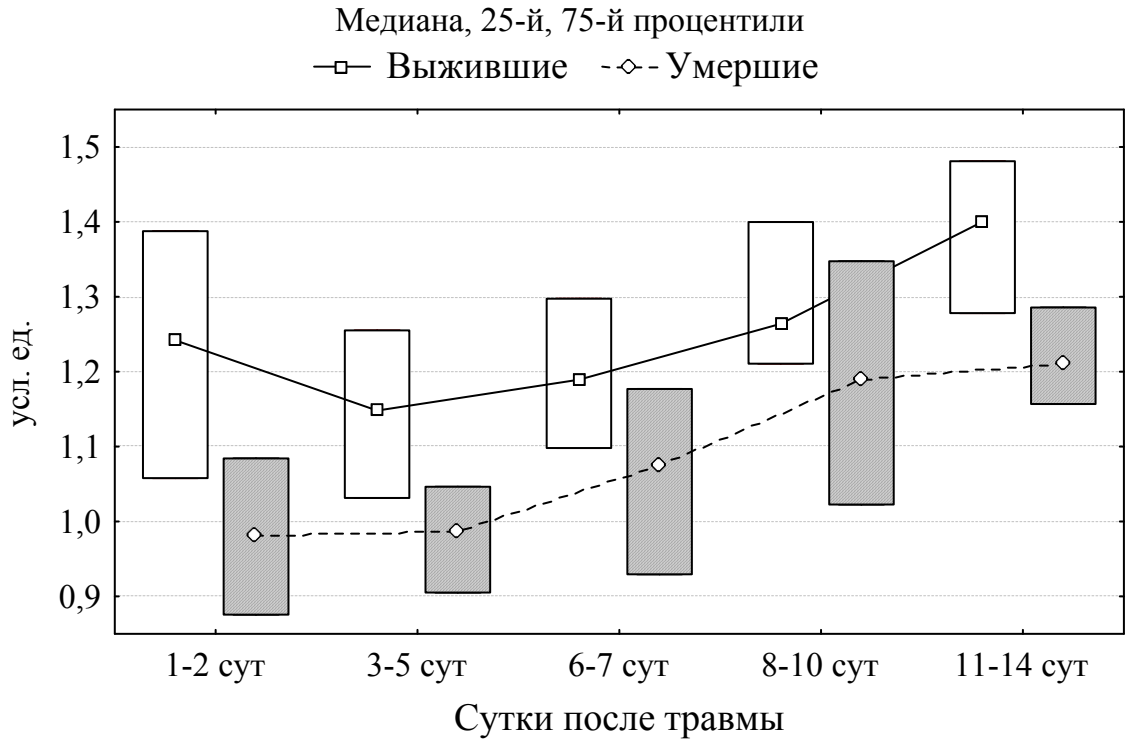



**Рис. 32. Соотношение КОД/СКД**

Снижение индекса КОД/СКД определялось в этом случае не только более низким коллоидно-онкотическим давлением (гипопротеинемия вследствие дисфункции желудочно-кишечного тракта, неадекватного энтерального питания, нарушения моторики кишечника), но и высоким уровнем среднего

капиллярного давления на фоне развития периферического вазоспазма, а также гиперкинетического типа кровообращения. При этом низкое КОД и высокое СКД может способствовать «пропотеванию» жидкой части плазмы в интерстициальное пространство, в том числе, в ткани головного мозга и усугублению отёка.

Совершенствование качества оказания специализированной помощи пострадавшим с тяжёлой ЧМТ, развитие современных инвазивных диагностических и лечебных методик приводят к постепенному снижению летальности при данной патологии, однако одновременно возрастает число больных, исходом лечения у которых является развитие вегетативного состояния (персистирующего либо перманентного), а также синдрома «малого» сознания. Эта тенденция вызывает увеличение инвалидизации, затруднение процессов реабилитации пострадавших в отдалённом периоде ЧМТ. В связи с этим, представляется актуальной возможность прогнозирования исходов травмы с позиций более полного восстановления функций ЦНС и возвращения больных к полноценной социальной жизни.

Нами проведён анализ исходов лечения на основании данных, полученных при изучении показателей нитроксидергической системы и системной гемодинамики.

Оценку результатов лечения проводили на момент выписки больных из стационара, либо их перевода в профильные отделения для последующей реабилитации. При этом использовали шкалу исходов Глазго:

1 балл – Смерть без восстановления сознания.

2 балла – Вегетативное состояние: больной неконтактен, глаза открыты, вегетативные функции сохранены.

3 балла – Тяжелая инвалидность: больной в сознании, но требует посторонней помощи из-за физической или психической инвалидизации.

4 балла – Инвалидность: больной может ухаживать за собой (с некоторой помощью), пользоваться транспортом, делать легкую работу, но имеет явные признаки инвалидизации.

5 баллов – Хорошее восстановление: полное возвращение к предыдущей жизни с легким неврологическим дефицитом.

Из исследования исключали больных с оценкой 1 балл (смерть без восстановления сознания). Неблагоприятными исходами считали формирование у больных признаков вегетативного состояния, либо тяжёлой инвалидности с необходимостью постоянной посторонней помощи (2-3 балла ШИГ).

Следует отметить, что в связи с малой длительностью наблюдения указанных больных (срок до момента выписки или перевода в специализированные отделения, как правило, не превышал одного месяца), диагноз вегетативного состояния не выставлялся, а принимались во внимание критерии Multi-Society Task Force on PVS, характеризующие переход больного из состояния острой комы в хроническую. Согласно последним, у больных отсутствовали признаки осознания собственной личности и окружающей обстановки, собственная речевая продукция, воспроизводимые произвольные поведенческие акты на фоне циклической смены состояния (периоды «сна» и «бодрствования»), при сохранности стволовых и гипоталамических автономных функций и вариабельности дефицита функций черепно-мозговых нервов и спинальных рефлексов.

Благоприятными исходами травмы считали состояния, оцениваемые по ШИГ в 4-5 баллов. При этом наблюдалось более полное восстановление функций ЦНС с минимальным неврологическим дефицитом, либо имелись признаки частичной инвалидизации без необходимости постоянной посторонней помощи.

Динамика уровня нитрита у больных с благоприятными и неблагоприятными исходами травмы представлена на **рис. 33**.

Уже при поступлении в клинику у больных с неблагоприятными исходами отмечались более низкие цифры нитрита крови – 1,6(1,15-2,1) мкмоль/л, чем в группе с благоприятным течением травматического периода – 2,3(2,1-2,57) мкмоль/л ($p_U<0,05$). Выявленные различия сохранялись и на 3-5-е сутки после травмы. На фоне сохраняющихся на 6-7-е сутки симптомов отёка головного мозга и явлений вазоспазма, у больных с неблагоприятными исходами в этот временной период наблюдалось снижение нитрита крови до 1,5(1,3-1,78) мкмоль/л. В то же время в сравниваемой группе происходило повышение нит-

рита до 2,52(2,25-3,15) мкмоль/л ($p_U$<0,001) с постепенным восстановлением сознания, стабилизацией витальных функций и регрессом очаговой симптоматики.

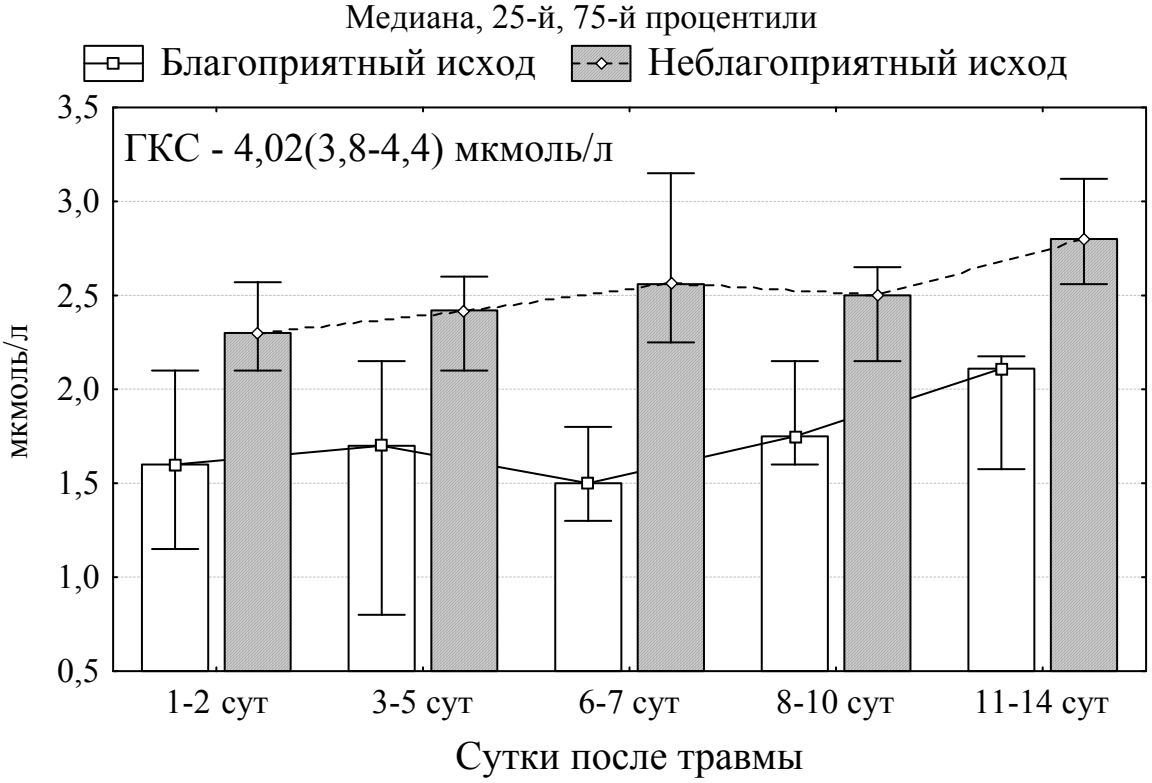



**Рис. 33. Уровень нитрита крови в зависимости от исходов лечения**

Несмотря на тенденцию к нормализации, даже к 10-14-м суткам после получения травмы уровень нитрита у больных с неблагоприятным исходом оставался существенно более низким – 2,11(1,57-2,17) мкмоль/л, чем у больных с хорошим восстановлением – 2,8(2,56-3,12) мкмоль/л ($p_U$<0,01).

С учётом полученных данных мониторинга нитроксидергической системы проведён анализ выживаемости пациентов в зависимости от содержания нитрита в крови на 6-7-е сутки острого периода травмы по методу Каплана-Майера **(рис. 34)**. Среди больных, у которых уровень нитрита крови к концу первой недели был выше 1,5 мкмоль/л, выживаемость достигала 68%, а при снижении его ниже 1,5 мкмоль/л этот показатель составил 57%.

При выраженном дисбалансе нитроксидергической системы, заключающемся в снижении нитрита крови менее 1,5

мкмоль/л и повышении его в ликворе до 2,4 мкмоль/л на 6-7-е сутки после травмы, степень неврологического дефицита увеличивалась на 34%, инвалидизация на 42% ($p<0,05$), и на 46% возрастала летальность ($p<0,01$).

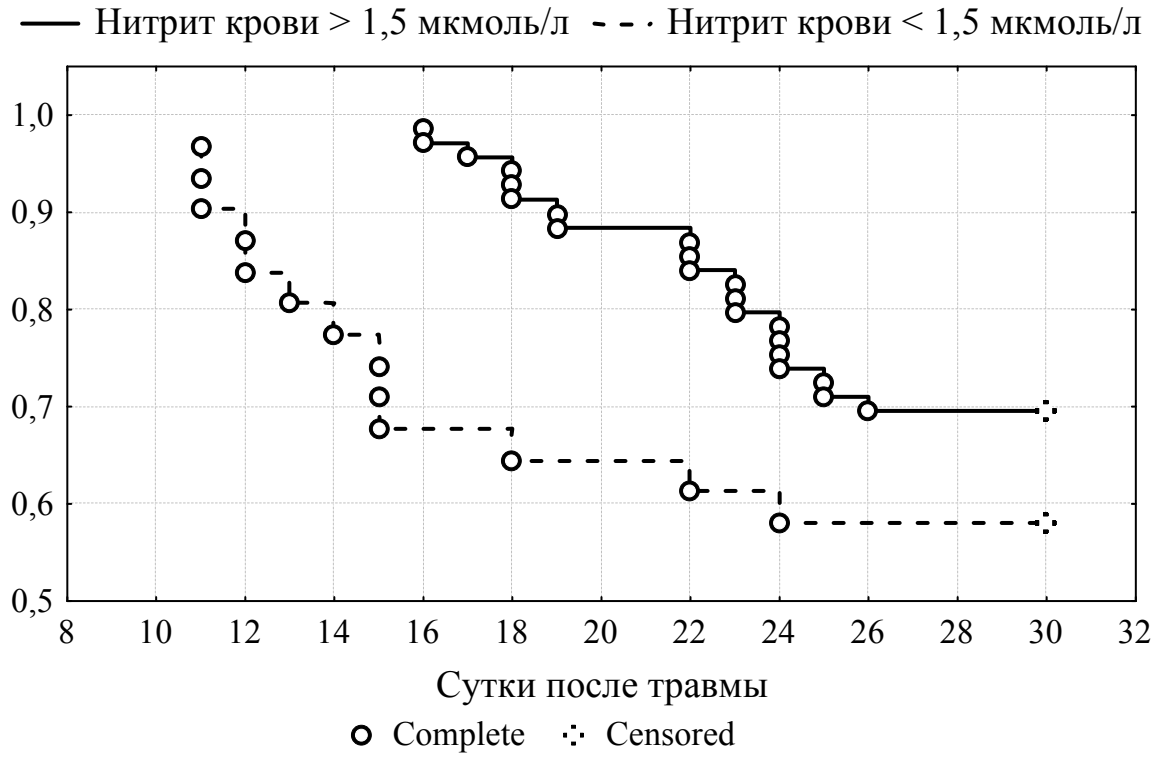



**Рис. 34. Выживаемость больных с черепно-мозговой травмой в зависимости от уровня нитрита в крови**

Исходя из имеющихся представлений, возникновение дисфункции в нитроксидергической системе при травматическом повреждении головного мозга может быть обусловлено рядом факторов, основными из которых являются нарушение продукции (синтеза) либо утилизации оксида азота, снижение активности ферментных систем, ответственных за метаболизм этого соединения в организме, а также связывание оксида азота дериватами гемоглобина и свободными радикалами кислорода **(рис. 35)**.

Нарушение функции эндотелия проявляется дисбалансом между эндотелийзависимой вазодилатацией и констрикцией, что приводит к повышению сосудистого сопротивления, сопровождающемуся снижением локального кровотока и ишемическим повреждением ткани головного мозга.




**Рис. 35. Причины дисбаланса в нитроксидергической системе при тяжёлой черепно-мозговой травме**

Таким образом, одним из основных патогенетических механизмов, определяющих развитие нарушений церебральной и

системной гемодинамики в остром периоде черепно-мозговой травмы, является изменение баланса констрикторных и релаксирующих медиаторов, регулирующих в норме локальный сосудистый тонус, возникающее вследствие дисфункции в эндотелиальном звене его регуляции **(рис. 36)**.




**Рис. 36. Механизм патогенетических нарушений в звене нитроксидергической регуляции при тяжёлой черепно-мозговой травме**

Развивающееся при тяжёлой черепно-мозговой травме снижение содержания оксида азота в системном кровотоке может быть связано с гибелью или ишемическим повреждением продуцирующих клеток, а также с нарушением активности ферментных систем, ответственных за его синтез, что в услови-

ях изменённой ауторегуляции может обусловливать развитие и поддержание церебрального и периферического вазоспазма. Наряду с дефицитом оксида азота в кровотоке, непосредственно в ткани мозга наблюдается увеличение его продукции, что на начальном этапе может рассматриваться как компенсаторная реакция на повреждение. В то же время, избыточное количество NO, продуцируемого в зоне воспаления, оказывает дополнительное повреждающее действие на мозговую ткань за счёт реализации нейротоксических эффектов. Выраженный дисбаланс в нитроксидергической системе в ответ на травматическое воздействие может приводить к развитию вторичных ишемических процессов, в результате которых происходит расширение первичного очага, что сказывается на течении и исходе травмы, вызывая длительное угнетение сознания, повышение степени неврологического дефицита и увеличение летальности.

Таким образом, мониторинг нитроксидергической системы при тяжёлой черепно-мозговой травме наряду с традиционным комплексом лечебно-диагностических мероприятий, позволяет оценить степень повреждения мозговой ткани и помочь в прогнозировании её течения и возможных исходов.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние десятилетия ознаменовались открытием новой эндогенной биологически активной молекулы – NO, регулирующей многочисленные физиологические функции и имеющей большое значение при развитии различных патологических процессов. Это простейшее химическое соединение принимает участие в работе сердечно-сосудистой, дыхательной систем, регуляции деятельности желудочно-кишечного тракта, а также в иммунной защите организма. В условиях нормального функционирования центральной и вегетативной нервной системы водорастворимые молекулы оксида азота, свободно проходящие через цитоплазматические мембраны, способствуют вазодилатации, выделению нейромедиаторов, модулируют активность N-метил-D-аспартатных рецепторов, участвуют в синаптической передаче и формировании длительной постсинаптической потенциации [Голиков П.П., 2004; Lipton S.A., 1994; Faraci F.M., 1998]. В то же время NO, как свободный радикал, становится существенным фактором повреждения и гибели нейронов при ишемии мозга.

Большинство известных методов, направленных на изучение и определение уровня оксида азота, являются косвенными и основаны на регистрации продуктов окисления, выделяемых в биологических системах, ферментов, участвующих в синтезе, либо вызываемых NO физиологических эффектов. В клинической практике наиболее широко применяются методы, в основе которых лежит регистрация метаболитов оксида азота, однако до сих пор отсутствует доказательная база, позволяющая интерпретировать их результаты для оценки состояния нитроксидергической системы.

Возможность использования уровня нитрита в качестве маркера оксида азота была продемонстрирована нами в серии экспериментов по прямому электрохимическому определению

последнего в образцах биологических жидкостей. Выполненное на модельной системе исследование показало, что послойное модифицирование поверхности сенсорного электрода ионообменными мембранами эффективно защищает его как от анионов, так и от катионов, затрудняющих селективное определение, не препятствуя при этом окислению NO. Зависимость отклика тока от концентрации оксида азота в растворе, имевшая линейный вид, позволила использовать разработанный микроэлектрод для количественных измерений. Проверка его эффективности была проведена в реальных биологических системах: цельной крови, плазме и ультрафильтрате крови. Параллельное определение в пробах концентрации нитрита выявило тесную связь между результатами, что позволяет использовать более простое и доступное в клинических условиях определение уровня нитрита. Однако необходимо принимать во внимание ряд ограничивающих факторов. Как правило, прямые методы фиксируют «мгновенное» содержание оксида азота в исследуемых образцах, а непрямые – накопление метаболитов в течение достаточно длительного времени. Точность определения при этом зависит от условий забора проб, идентичности хранения образцов и проведения измерений. Помимо этого, на неё могут воздействовать внешние факторы и соматический фон исследуемого пациента. Примером может служить приём вазодилататорных нитратов при лечении ишемической болезни сердца или ряда препаратов, высвобождающих эндогенный NO и влияющих на пути его метаболизма.

Проведённые клинические исследования 99 больных показали, что изменения в звене нитроксидергической регуляции наблюдались практически у всех пострадавших с тяжёлой черепно-мозговой травмой и зависели от глубины угнетения сознания, характера повреждения головного мозга, интенсивности субарахноидальной геморрагии, а также сроков острого периода ЧМТ.

При тяжёлой черепно-мозговой травме происходило снижение уровня нитрита крови в два-три раза, достигавшее максимума на 6-7-е сутки наблюдения и сопровождавшееся повышением общего периферического сосудистого сопротивления и

среднего капиллярного давления. Концентрация нитрита в плазме крови зависела от уровня сознания, уменьшаясь по мере его угнетения, причём при ушибах головного мозга тяжёлой степени, осложнённых внутримозговыми гематомами и субарахноидальной геморрагией, она была в полтора-два раза ниже, чем при изолированных ушибах головного мозга. Развивающийся дефицит оксида азота в системном кровотоке может быть связан с гибелью или ишемическим повреждением продуцирующих клеток, а также с нарушением активности ферментных систем, ответственных за его синтез, что в условиях изменённой ауторегуляции может обусловливать развитие и поддержание церебрального и периферического вазоспазма. Наблюдаемое снижение уровня нитрита в крови свидетельствует об усугублении дисфункции нитроксидергической системы на фоне неблагоприятного течения ЧМТ и позволяет рассматривать его исследование в качестве одного из информативных показателей оценки степени тяжести, течения травмы и характера повреждения головного мозга.

В ликворе выявлено повышение нитрита в три-четыре раза, с нарастанием в период с третьих до седьмых суток наблюдения, которое сохранялось на протяжении двух недель острого периода тяжёлой черепно-мозговой травмы и было более выражено при наличии значительного скопления крови в субарахноидальном и интравентрикулярном пространствах. Увеличение продукции оксида азота на начальном этапе может рассматриваться как компенсаторная реакция на повреждение. В то же время, избыточное его количество, выделяемое в зоне воспаления, способствует реализации нейротоксических эффектов.

При снижении нитрита крови менее 1,5 мкмоль/л и повышении его в ликворе до 2,4 мкмоль/л на 6-7-е сутки после травмы, наблюдалось увеличение неврологического дефицита на 34%, инвалидизации на 42% и летальности на 46% в исходе тяжёлой черепно-мозговой травмы, что позволяет использовать результаты мониторинга нитроксидергической системы также для раннего прогнозирования её течения и исхода.

Однако, результаты, позволяющие судить о нарушениях в звене нитроксидергической регуляции, целесообразно оценивать после стабилизации витальных функций пациентов (коррекция дыхательных и гемодинамических расстройств, устранение компрессии головного мозга). В первые сутки необходимо динамическое наблюдение за больным, выполнение комплекса традиционных лечебно-диагностических мероприятий, позволяющих определить степень повреждения головного мозга и наличие дислокационных проявлений. Забор проб крови желательно производить ежедневно либо через день, начиная с 3-х суток после травмы, утром и натощак вплоть до конца второй недели лечения. Анализ содержания нитрита в ЦСЖ должен проводиться при отсутствии клинически выраженных признаков отёка головного мозга и угрозы дислокации, путём повторных люмбальных пункций. При проведении инвазивного мониторинга внутричерепного давления с помощью внутрижелудочкового катетера возможно более частое исследование уровня нитрита в ЦСЖ, и при этом забор пробы для анализа может осуществляться из мониторной системы для контроля внутричерепного давления.

Таким образом, нарушения регуляции церебральной гемодинамики в остром периоде тяжёлой черепно-мозговой травмы являются неблагоприятным фактором, влияющим на её течение, и способствуют расширению зоны повреждения мозговой ткани за счёт вторичных ишемических процессов. В числе прочих механизмов их развития лежит эндотелиальная дисфункция, проявляющаяся недостаточностью нитроксидергической вазорелаксации и преобладанием на этом фоне констрикторного влияния. Это может оказывать воздействие на ауторегуляцию мозгового кровотока и приводить к ухудшению прогноза острой нейрохирургической патологии.

Ишемическое повреждение мозга сопровождается развитием сложных патобиохимических каскадов в нейронах вследствие резкого снижения уровня энергетического метаболизма, нарушения ионного баланса и нарушения ауторегуляции мозгового кровотока. Согласно имеющимся современным представлениям, взаимодействие избыточных концентраций возбу-

ждающих нейромедиаторов (главным образом глутамата) с NMDA-рецепторами цитоплазматической мембраны приводит к резкому увеличению концентрации свободного кальция в цитоплазме нервных клеток. Последующая активация кальцийзависимых ферментов и, в частности, конститутивной NOS ведёт к усилению синтеза оксида азота и формированию других свободных радикалов (супероксида, гидроксильных радикалов, перекиси водорода). Оксидативный стресс выступает в этих условиях как один из ведущих факторов повреждения мозга при ишемии; при этом NO наряду с другими свободными радикалами является фактически исполнительным инструментом патофизиологических каскадов, приводящих к гибели нейронов по механизмам некроза и апоптоза.

Исследования последних лет в области нейрореаниматологии привели к значительному прогрессу в понимании молекулярных и клеточных механизмов повреждения и восстановления клеток мозга при травме. Некоторые из этих механизмов уже сегодня являются мишенями для патогенетически обоснованных лечебных мероприятий, или такие мероприятия и соответствующие лекарственные препараты интенсивно разрабатываются. Поэтому трудно переоценить роль дальнейшего изучения нитроксидергической системы в патогенезе черепно-мозговой травмы с перспективой возможной коррекции грубых нарушений обмена оксида азота в мозговой ткани.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Акмаев И.Г. Взаимодействие нервных, эндокринных и иммунных механизмов мозга /И.Г. Акмаев //Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова - 1998. - № 3. - С.54-56.
2. Амчеславский В.Г. Экстракраниальные вторичные повреждающие факторы острого периода черепно-мозговой травмы /В.Г. Амчеславский, А.А. Потапов, Э.И. Гайтур и др. //Материалы II-го съезда нейрохирургов Российской Федерации. – Нижний Новгород, 1998 – С.28.
3. Арзамасцев А.П. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы NO-синтаз (химический аспект) /А.П. Арзамасцев, И.С. Северина, Н.Б. Григорьев, В.Г. Граник //Вестн. РАМН. – 2003. - № 12. – С.88-95.
4. Ашмарин И.П. Нейрохимия /И.П. Ашмарин, П.В. Стукалов //М.: Изд-во ин-та биомедицинской химии РАМН, 1996. – 469 с.
5. Бабиченко Е.И. Закрытая черепно-мозговая травма, осложненная внутричерепными кровоизлияниями /Е.И. Бабиченко, Ю.Б. Гвоздев, Г.И. Курочкин. – Тамбов, 1974. – 260 с.
6. Башкатова В.Г. Возможная роль оксида азота в патогенезе модельных судорожных состояний различной природы /В.Г. Башкатова, Г.Ю. Вицкова, В.Б. Наркевич и др. //Бюл. экспериментальной биологии и медицины. - 1998. - Т. 125, № 1. - С.26-29.
7. Башкиров М.В. Внутричерепное давление и внутричерепная гипертензия /М.В. Башкиров, А.Р. Шахнович, А.Ю. Лубнин //Рос. журн. анестезиологии и интенсивной терапии – 1999. - №1. – С.4-11.
8. Болюх А.С. Церебральный вазоспазм при травматических внутричерепных кровоизлияниях /А.С. Болюх, Е.Г. Педа-

ченко //Материалы III съезда нейрохирургов России. – СПб., 2002. – С.12-13.
9. Боровиков В.П. STATISTICA - Статистический анализ и обработка данных в среде Windows /В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. - М.: Информ.-изд. дом Филинъ, 1997. - 608 с.
10. Брык В.Е. Внутричерепные гематомы при тяжелой черепно-мозговой травме /В.Е. Брык, И.И. Ставицкая, И.М. Притула, В.Н. Грибкова //Материалы III Всесоюзного съезда нейрохирургов. – Таллин., 1982. – С.26-28.
11. Вавилова Т.П. Определение активности нитратредуктазы в смешанной слюне /Т.П. Вавилова, Ю.А. Петрович //Вопр. мед. химии. – 1991. – Т.37, №2. – С.69-72.
12. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях /А.Ф. Ванин //Вестн. РАМН. – 2000. - № 4. - С.3-5.
13. Ванин А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы /А.Ф. Ванин //Биохимия. - 1998. - Т. 63, № 7. - С.867-869.
14. Вахницкая В.В. Причины вторичных ишемических атак у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой и разрывом аневризм артерий головного мозга /В.В. Вахницкая //Информ. сб. Реаниматология. Интенсивная терапия. Анестезиология. - 2001. - № 2. - С.1-10.
15. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга /И.В. Викторов //Вестн. РАМН. - 2000. - №4. - С.3-10.
16. Виленский Б.С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение /Б.С. Виленский. – СПб.: Искусство России, 1999. – 336 с.
17. Гайтур Э.И. Вторичные механизмы повреждения головного мозга при черепно-мозговой травме (диагностика, тактика лечения и прогноз): Автореф. дис. … докт. мед. наук. – М., 1999. – 24 с.
18. Гайтур Э.И. Влияние артериальной гипоксемии на исходы тяжёлой изолированной и сочетанной черепно-мозговой травмы /Э.И. Гайтур, А.А. Потапов, В.Г. Амчеславский и др. //Реаниматология на рубеже XXI века: Сб. научн. труд. – М., 1996. – С.126.

19. Ганнушкина И.В. Мозговое кровообращение при разных видах циркуляторной гипоксии мозга /И.В. Ганнушкина //Вестн. РАМН. - 2000. - № 9. - С.22-27.
20. Гервазиев Ю.В. Механизмы регуляции активности синтазы окиси азота /Ю.В. Гервазиев, Н.Н. Соколов //Вопр. мед. химии. - 1999. - Т. 45, №3. - С.187-199.
21. Гервазиев Ю.В. Конструирование системы экспрессии индуцибельной изоформы синтазы оксида азота в клетках ESHERICHIA COLI /Ю.В. Гервазиев, М.А. Эльдаров, И.С. Шкундина и др. //Вопр. мед. химии. - 1999. - Т.45, №5. - С.416-429.
22. Гланц С. Медико-биологическая статистика /С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
23. Голиков П.П. Состояние вазоактивных факторов у больных с тяжелой сочетанной травмой /П.П. Голиков, В.И. Картавенко, Н.Ю. Николаева и др. //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1998. - № 3. - С.20-22.
24. Голиков П.П. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях /П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева, И.А. Гавриленко и др. //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2000. - № 2. - С.6-9.
25. Голиков П.П. Методика определения оксида азота ($NO_X$) в спинно-мозговой жидкости у нейрохирургических больных /П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева //Нейрохирургия. – 2003. - № 3. – С.35-37.
26. Гомазков О.А. Система эндотелиновых пептидов: механизмы кардиоваскулярных патологий /О.А. Гомазков //Вопр. мед. химии. - 1999. - Т. 45, № 4. - С.290-303.
27.Горбачев В.И. Роль оксида азота в патогенезе поражений центральной нервной системы /В.И. Горбачев, В.В. Ковалев //Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова – 2002. - № 7. – С.9-16.
28.Горбачев В.И. Соответствие уровня метаболитов истинному содержанию оксида азота при проведении клинических исследований /В.И. Горбачев, В.В. Ковалев //Лабораторная диагностика. Terra Medica. – 2005. - № 2(7) .- С.28-30.

29. Гуревич К.Г. Оксид азота: биосинтез, механизм действия, функции /К.Г. Гуревич, Н.Л. Шимановский //Вопр. биологической мед. и фармацевтической химии. - 2000. - № 4. - С.16-22.
30. Гусев Е.И. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной церебральной ишемии /Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, А.В. Коваленко, М.А. Соколов //Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1999. - №2. - С.65-70.
31. Дроздова Г.А. Клеточные механизмы артериальной гипертензии /Г.А. Дроздова //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2000. - № 3. - С.26-31.
32. Жюпод Д. Эндотелий и свободные радикалы /Д. Жюпод //Актуальные проблемы анестезиологии и реаниматологии: Освежающий курс лекций.- Архангельск - Тромсё. - 1997. - С.251-253.
33. Зенков Н.К. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза /Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшиков, В.П. Реутов //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.30-34.
34. Зенченко А.Г. Особенности внеклеточной гидратации в зонах очага размоожжения головного мозга при изолированной и сочетанной черепно-мозговой травме /А.Г. Зенченко //Материалы II съезда нейрохирургов Российской Федерации. – Нижний Новгород, 1998 – С.74.
35. Игнарро Л.Дж. Физиология и патофизиология оксида азота /Л. Дж. Игнарро //Актуальные проблемы анестезиологии и реаниматологии: Освежающий курс лекций. – Архангельск - Тромсё. - 1997. - С.266-268.
36. Карпюк В.Б. Лабораторный мониторинг состояния нитроксидергической вазорелаксации при субарахноидальном кровоизлиянии /В.Б. Карпюк, Ю.С. Черняк, М.Г. Шубич //Клиническая лабораторная диагностика. - 2000. - № 5. - С.16-18.
37. Карпюк В.Б. Постгеморрагический церебральный вазоспазм в свете современных представлений о регуляции мозгового кровообращения /В.Б. Карпюк, Ю.С. Черняк, М.Г. Шубич //Вопр. нейрохирургии. - 2001. - № 1. - С.30-33.

38. Карпюк В.Б. Перспективы фармакологической коррекции нитроксидергической вазорелаксации при субарахноидальном кровоизлиянии /В.Б. Карпюк, М.Г. Шубич //Вопр. нейрохирургии. - 2002. - № 2. - С.56-61.
39. Каштанов С.И. Монооксид азота в механизмах устойчивости сердечно-сосудистых функций при эмоциональном стрессе /С.И. Каштанов, М.А. Звягинцева, И.Л. Кошарская и др. //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.21-25.
40. Квитницкий А.Б. Отёк и набухание головного мозга /А.Б. Квитницкий, Ю.И. Рыжов //Киев, 1994. – 178 с.
41. Ковалёв В.В. Мониторинг нитроксидергической системы в оценке тяжести, течения и прогноза нейротравмы /В.В. Ковалёв, В.И. Горбачёв, Е.В. Федичева, И.В. Христенко //Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2004. - № 5 (37). – С.22-27.
42. Ковалёв В.В. Современные методы мониторинга оксида азота в биологических объектах, их достоинства и недостатки /В.В. Ковалёв, В.И. Горбачёв //Сибирский медицинский журнал. – 2005. - № 3. – С.5-8.
43. Ковалев В.В. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе травматического повреждения головного мозга /В.В. Ковалев, В.И. Горбачев, С.И. Петров, И.Л. Петрова //Нейрохирургия. – 2005. - № 1. – С.32-35.
44. Козлов И.А. Клиническое использование ингаляционной окиси азота (обзор литературы и первые клинические наблюдения) /И.А. Козлов, В.Н. Попцов //Анестезиология и реаниматология. - 1997. - № 5. - С.80-88.
45. Коновалов А.Н. Клиническая классификация острой черепно-мозговой травмы /А.Н. Коновалов, Б.А. Самотокин, Н.Я. Васин и др. //Клиническое руководство по черепно-мозговой травме – М.: Антидор, 1998. – Т.1. – С.54.
46. Кравец Л.Я. Осложнения травматического субарахноидального кровоизлияния /Л.Я Кравец, А.А. Зубов, А.О. Трофимов //Материалы III съезда нейрохирургов России. – СПб., 2002. – С.38-39.
47. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы /Г.Н. Крыжановский //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1990. - № 4. - С.48-54.

48. Крылов В.В. Сосудистый спазм при субарахноидальном кровоизлиянии / В.В. Крылов, С.А. Гусев, Г.П. Титова, А.С. Гусев //М.: Медицина, 2000. – 191 с.
49. Кудрин А.В. Микроэлементы и оксид азота – полифункциональные лиганды /А.В. Кудрин //Вопр. биологической мед. и фармацевтической химии. - 2000. - №1. - С.3-5.
50. Кульчицкий С.В. Монооксид азота и ноцицептивные процессы /С.В. Кульчицкий, Н.В. Акулич //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.41-44.
51. Лебедев В.В. Неотложная нейрохирургия /В.В. Лебедев, В.В. Крылов //М.: Медицина, 2000. – 568 с.
52. Лихтерман Л.Б. Черепно-мозговая травма: прогноз течения и исходов /Л.Б. Лихтерман, В.И. Корниенко, А.А. Потапов и др. //М.: Книга ЛТД, 1993. – 299 с.
53. Лобышева И.И. Взаимодействие динитрозильных тиолсодержащих комплексов железа с пероксинитритом и перекисью водорода in vitro /И.И. Лобышева, В.А. Сереженков, А.Ф. Ванин //Биохимия. - 1999. - Т. 64, № 2. - С.194-200.
54. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы гипоксии /Л.Д. Лукьянова //Вестн. РАМН. - 2000. - № 9. - С.3-12.
55. Малышев И.Ю. Долгосрочный кардиопротекторный эффект оксида азота: роль HSP70 /И.Ю. Малышев, Е.Б. Маленюк, Е.Б. Манухина и др. //Бюл. экспериментальной биологии и медицины. - 1998. - Т. 125, № 1. - С.23-26.
56. Малышев И.Ю. Гипоксия и оксид азота /И.Ю. Малышев, Е.А. Монастырская, Б.В. Смирин, Е.Б. Манухина //Вестн. РАМН. - 2000. - № 9. - С.44-48.
57. Малышев И.Ю. Стресс, адаптация и оксид азота /И.Ю.Малышев, Е.Б.Манухина //Биохимия. - 1998. - Т. 63. - С.992-1006.
58. Маневич А.З. Значение изучения коллоидно-онкотического давления в хирургии и интенсивной терапии /А.З. Маневич, С.А. Маркин, С.Ю. Залётов, А.А. Маневич //Хирургия. – 1981. - № 7. – С.104-108.
59. Манухина Е.Б. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите /Е.Б. Манухина, И.Ю. Ма-

лышев, Ю.В. Архипенко //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.16-21.
60. Манухина Е.Б. Гипотензивное действие и тканевое распределение донора оксида азота – динитрозильных комплексов железа /Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев, Е.Б. Маленюк и др. //Бюл. экспериментальной биологии и медицины. - 1998. - Т. 125, № 1. - С.30-33.
61. Марков Х.М. О биорегуляторной системе L-аргинин-окись азота /Х.М. Марков //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1996. - № 1. - С.34-39.
62. Медведев Ю.А. Рефрактерность постгеморрагической констриктивно-стенотической артериопатии к вазодилатационной медикаментозной терапии (морфологические аспекты) /Ю.А. Медведев, Ж. Закарявичус //Нейрохирургия. – 2002. - № 2. – С.16-22.
63. Меньщикова Е.Б. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях /Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов //Биохимия. - 2000. - Т. 65, № 4. - С.485-503.
64. Молчанов И.В. Интенсивная терапия больных с повреждениями головного мозга /И.В. Молчанов //Материалы VI Всероссийского съезда анестезиологов и реаниматологов. – М., 1998 – С.256.
65. Недвецкий П.И. Влияние доноров окиси азота на $Ca^{2+}$-зависимое освобождение [$^{14}C$] ГАМК из синаптосом головного мозга: роль SH-групп /П.И. Недвецкий, С.В. Конев, А.А. Ракович и др. //Биохимия. - 2000. - Т. 65, № 9. - С.1215-1224.
66. Нейротравматология. Справочник /Под ред. Коновалова А.А., Лихтермана Л.Б., Потапова А.А. //М.: Вазар-Ферро. – 1994. – 415 с.
67. Олешкевич Ф.В. Перекисное окисление липидов в крови и спинномозговой жидкости у больных с черепно-мозговой травмой /Ф.В. Олешкевич, А.С. Федулов, В.И. Гаврилов //Вопр. нейрохирургии. – 1983. - №5. – С.35-38.
68. Онуфриев М.В. Постреанимационные изменения активности синтазы окиси азота и радикалообразования в отделах

мозга крыс /М.В. Онуфриев, М.Ю. Степаничев, И.А. Лазарева и др. //Анестезиология и реаниматология. - 1996. - №5. - С.58-61.
69. Осипов А.Н. Оксид азота, гемоглобин и лазерное облучение /А.Н. Осипов, Г.Г. Борисенко, К.Д. Казаринов, Ю.А. Владимиров //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.48-52.
70. Папапетропулос А. Функции эндотелиальных клеток /А. Папапетропулос, Дж. Катравас //Актуальные проблемы анестезиологии и реаниматологии: Освежающий курс лекций.- Архангельск - Тромсё. - 1997. - С.254-257.
71. Проскуряков С.Я., Конопляников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. // Успехи современной биологии. – 1999. – Т.119, № 4. – С.380-395.
72.Раевский К.С. Роль оксида азота в глутаматергической патологии мозга / К.С. Раевский, В.Г. Башкатова, А.Ф. Ванин //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.11-15.
73. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA /О.Ю. Реброва. – М: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
74. Реутов В.П. Биохимическое предопределение NO - синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота /В.П. Реутов //Биохимия. - 1999. - Т. 64, № 5. - С.634-651.
75. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала /В.П. Реутов //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.35-41.
76. Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих /В.П. Реутов //Успехи биологической химии. - 1995. - Т. 35. - С.189—228.
77. Розанов В.А. Современные представления о патогенезе необратимых повреждений нервных клеток при черепно-мозговой травме /В.А. Розанов, В.А. Цепколенко, Л.Э. Клаупик //Вопр. нейрохирургии. - 1998. - №2. - С.37-41.
78. Романова Т.А. Электронная структура комплекса гема гемоглобина с оксидом азота и динамика атомного остова при физиологической температуре /Т.А. Романова, П.О. Краснов, П.В. Аврамов //Вопр. мед. химии. - 2001. - Т. 47, № 3. - С.308-314.

79. Рябов Г.А. Роль оксида азота как регулятора клеточных процессов при формировании полиорганной недостаточности /Г.А. Рябов, Ю.М. Азизов //Анестезиология и реаниматология. - 2001. - № 1. - С.8-12.
80. Самойлов В.И. Субарахноидальное кровоизлияние /В.И. Самойлов. - Л.: Медицина. - 1990. - 231 с.
81. Сахарова А.В. Ультраструктурная локализация NO-синтазной NADPH-диафоразы в периферическом нерве и её изменение при дифтерийной полинейропатии /А.В. Сахарова, С.М. Ложникова //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.44-48.
82. Северина И.С. Растворимая гуанилатциклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота /И.С. Северина //Биохимия. - 1998. - Т. 63., № 7. - С.939-947.
83. Северина И.С. Активация растворимой гуанилатциклазы новыми донорами NO как основа направленного поиска новых эффективных вазодилататоров и антиагрегантов /И.С. Северина, О.Г. Бусыгина, Н.В. Пятакова //Вестн. РАМН. - 2000. - № 4. - С.25-30.
84. Семченко В.В. Постаноксическая энцефалопатия /В.В. Семченко, С.С. Степанов, Г.В. Алексеева - Омск: Омская обл. тип., 1999. - 448 с.
85. Скорняков В.И. Цикличный аденозинмонофосфат в спинномозговой жидкости у больных с травмами и заболеваниями головного мозга /В.И. Скорняков, Л.А. Кожемякин, А.С. Попов //Вопр. нейрохирургии. – 1989. - № 4. – С.37-39.
86. Скоромец А.А. Изменения сердечно-сосудистой системы и мозговые инсульты /А.А. Скоромец, В.А. Сорокоумов, С.В. Можаев //СПб. врачебные ведомости – 1997. - № 16. – С.45-48.
87. Старченко А.А. Клиническая нейрореаниматология /А.А. Старченко. – СПб.: Мед. изд-во, 2002. – 666 с.
88. Сумная Д.Б. Динамика цитокинов и ферритина в сыворотке и спинномозговой жидкости у больных с черепно-мозговой травмой /Д.Б. Сумная //Материалы III съезда нейрохирургов России. – СПб., 2002. – С.63-64.

89. Сьяксте Н.И. Роль оксида азота (NO) в механизме действия средств для наркоза /Н.И. Сьяксте, М.Я. Дзинтаре, Л.Х. Баумане и др. //Анестезиология и реаниматология. - 2001. - № 3. - С.61-65.
90. Телушкин П.К. Глутамат и пероксидное окисление в патогенезе заболеваний ЦНС /П.К. Телушкин //Вопр. мед. химии. - 1998. - Т. 44, № 6. - С.520-526.
91. Хлуновский А.Н. Концепция болезни поврежденного мозга /А.Н. Хлуновский, А.А. Старченко. – СПб.: Лань, 1999. – 256 с.
92. Царенко С.В. Интенсивная терапия при внутричерепных кровоизлияниях: Автореф. дис. …докт. мед. наук. – М., 2000. – 37 с.
93. Цветанова Е.М. Ликворология: Пер. с болг. /Е.М. Цветанова. – Киев: Здоров'я, 1986. – 371 с.
94. Шульгина Г.И. Влияние нитрита натрия – донора NO на активность нейронов зрительной и сенсомоторной областей коры при обучении /Г.И. Шульгина //Вестн. РАМН. - 2000. - № 7. - С.3-8.
95. Alexander R.W. Nitric oxide and peroxinitrite /R.W. Alexander //Hypertension. - 1995. - Vol. 25. - P.155-161.
96. Arakawa Y., Kikuta K., Hojo M. et al. //Neurosurgery. – 2001. – Vol. 48, № 4. – P.723-730.
97. Asano T. In vitro evaluation of the inhibitory action of $PGI_2$ to vasoconstriction's induced by various prostaglandin's, serotonin and hemoglobin using the canine basilar artery /T. Asano, T. Sasaki, C. Ochiai et al. //Neurol. Med. Chir. – 1982. – Vol.22. - P.507-512.
98. Awasthi D. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats /D. Awasthi, D.F. Church, D. Torbati et al. //Surgical Neurology. – 1997. – Vol. 47, № 6. – P.575-581.
99.Beckman J.S. Oxydative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. /J.S. Beckman //Chem. Res. Toxicol. – 1996. – Vol. 9. – P.836-844.
100. Blaylock M.G. The effect of nitric oxide and peroxynitrite on apoptosis in human polimorphonuclear leukocytes

/M.G. Blaylock, B.H. Cuthberson, H.G. Galley et al. //Free Radical Biol. Med. - 1998. -Vol. 25, № 6. – P.748-752.
101. Boulanger C.M. Endothelial NO synthase /C.M. Boulanger //C. R. Seances Soc. Biol. Fil. – 1995. – Vol. 189, № 6. – P.1069–1079.
102. Boulanger C. The role of the endothelium in the regulation of vasomotor activity /C. Boulanger, P.M. Vanhoutte //Arch. Mal. Coeur. Vaiss. – 1991. – Vol. – 84, № 1. – P.35–44.
103. Bouma G.J. Cerebral blood flow in severe clinical head injury /G.J. Bouma, J.P. Muizelaar //New Horizons. – 1995. – Vol. 3. – P.384-394.
104. Brian J.E., Heistad D.D., Faraci F.M. //Stroke. – 1995. – Vol.26. – P.277-281.
105. Bredt D.S. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase /D.S. Bredt, P.M. Hwang, C.E. Glatt et al. //Nature. - 1991. - Vol. 351. - P.714-718.
106. Cabrera C. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure /C. Cabrera, D. Bohr //Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1995. - Vol. 206. - P.77-81.
107. Café C. Cellular and molecular events of ischemic brain damage /C. Café, C. Torri, F. Marcatico //Functional Neurol. – 1993. – Vol. 8. - P.121.
108. Castillo J. Progression of ischaemic stroke an excitotoxic aminoacids /J. Castillo, A. Davalos, M. Noya //Lancet. – 1997. – Vol. 349, № 1. – P.79-83.
109. Cazevieille C. Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/ reoxigenation-induced neuron injury /C. Cazevieille, A. Muller, F. Meynier, C. Bonne //Free Radical Biology & Medicine. – 1993. – Vol. 14, № 4. – P.389-395.
110. Charbrier P.-E. Potential physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the brain /P.-E. Charbrier, C. Demerle-Pallardy, P Braquet //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1992. - № 4. - С.31-33.
111. Cohen R.A., Vanhoutte P.M. //Circulation. – 1995. – Vol. 92. – P.3337-3349.

112. Compton J.S. Cerebral arterial vasospasm following severe head injury: A transcranial Doppler study /J.S. Compton, P.J. Teddy //Br. J. Neurosurgery. – 1987. - №1. – P.435-439.
113. Crossin K.L. Nitric oxide (NO): a versatile second messenger in brain /K.L. Crossin //Trends Biol. Sci. – 1991. - Vol. 16. – P.81-82.
114. Cruz J. Brain ischemia in head injury (Letter, commtn) /J. Cruz //J. of Neurosurgery. – 1993. – Vol. 78, № 3. – P.522-523.
115. Dalkara T. The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia /T. Dalkara, M.A. Mosckowitz //Brain Pathology. – 1994. – Vol. 4. – P.49-57.
116. Dawson D.A. Inhibition of nitric oxide syntase does not reduce infarct volume in rat model of focal cerebral ischemia /D.A. Dawson, K. Kasumoto, D.I. Graham et al. //Neurosci Lett. – 1992. – Vol. 142. – P.151-154.
117. Demircivi F. Traumatic subarachnoid hemorrhage: Analysis of 89 cases /F. Demircivi, N. Ozkan, Buyukkececi et al. //Acta Neurochir. – 1993. – Vol. 122. – P.45-48.
118. Egemen N., Turker R.K., Sanlidilek U. et al. //Neurol. Res. – 1993. – Vol. 15, № 5. – P.310-315.
119. Endoh M. Expression of the inducible form nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia /M. Endoh, K. Maiese, J. Wagner //Brain Res. – 1994. – Vol. 651. – P.92-100.
120. Espadas-Torre C. Thromboresistant chemical sensors using combined nitric oxide release/ion sensing polymeric films /C. Espadas-Torre //J. Am. Chem. Soc. – 1997. – Vol. 119. – P.2321-2322.
121. Faraci F.M. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels /FM. Faraci, D.D. Heistad //Physiol. Rev. – 1998. - Vol. 78 (1). – P.53–97.
122. Fitzhugh A.L., Keefer L.K. //Free Rad. Biol. Med. – 2000. – Vol.28, № 10. – P.1463-1469.
123. Forstermann U. Nitric oxide synthase isozymes, characterization, purification, molecular cloning and function /U. Forstermann, E.I. Closs, J.S.Pollock et al. //Hypertension. - 1994. - Vol. 23. - P.1121-1131.

124. Fujiwara N., Osanai T., Kamada T., Katoh T., Takahashi K., Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake /N. Fujiwara, T. Osanai, T. Kamada et al. //Circulation . – 2000. - Vol. 101, № 8. – P.856–861.
125. Fukai T. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training /T. Fukai, M. R. Siegfried, M. Ushio–Fukai et al. //J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 105, № 11. – P.1631–1639.
126. Furakawa K. Expression of nitric-oxide syntase Hyman nasalmucjsa /K. Furakawa, D.G. Harrison, D. Saleh et al. //Amer. J. Respirat. Crit. Care Med. - 1996. - Vol. 153, № 2. -P.847-850.
127. Furchgott R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of vascular smooth muscle by acetylcholine /R.F. Furchgott, J.W. Zawadzki //Nature. - 1980. - Vol. 286. - P.373-376.
128. Garthwaite J. Nitric oxide signalling in the central nervous system /J. Garthwaite, C.L. Boulton //Ann.Rev.Physiol. – 1995. - Vol. 57 - P.683-706.
129. Govers R. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase /R. Govers, T.J. Rabelink //Am. J. Physiol. – 2001 - Vol.280, № 2, P.193–206.
130. Grander D.N. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals /D.N. Grander, M.E. Hollwarth, D.A. Parcs //Acta Physiol. Scand. – 1988. – Vol. 126. – Suppl. 548. – P.47-63.
131. Greene K.A. Impact of traumatic subarachnoid hemorrhage on outcome in nonpenetrating head injury. Part 2. Relationship to clinical course and outcome variables during acute hospitalization /K.A. Greene, R. Jacobowitz, F.F. Marciano et al. //J. Trauma. - 1996. - Vol. 46, № 6. – P.964-971.
132. Haller H. Endothelial function. General considerations /H. Haller //Drugs. – 1997. - Vol. 53. – P.1–10.
133. Handa Y., Kaneko M., Takeuchi H. et al. //Surg. Neurol. – 2000. – Vol. 53, № 4. – P.323-329.

134. He Z., Ibayashi S., Nagao T. et al. //Brain Res. – 1995. – Vol.699. – P.208-213.
135. Hossmann K. A. Ischemia – mediated neuronal injury /K.A. Hossman //Resuscitation. – 1993. – Vol. 26. - № 23. – P.225-235.
136. Hunley T.E. Nitric oxide and endothelin in pathophysiological settings /T.E. Hunley, S. Iwasaki, T. Homma, V. Kon //Pediatr. Nephrol. – 1995. - Vol. 9, №2. – P.235-244.
137. Ignarro J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide /J. Ignarro //Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1990. - Vol. 30. – P.535-560.
138. Ito Y., Isotani E., Muzino Y. et al. //J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2000. – Vol. 35, № 1. – P.45-50.
139. Kashevskii A.V. Behaviors of $H_2$TTP and CoTPPCl in Nafion film and the catalytic activity for nitric oxide oxidation /A.V. Kashevskii, A.Y. Safronov, O. Ikeda //J. of Electroanalytical Chemistry. - 2001. - Vol. 510. - P.86-95.
140. Keefer L.K. Nitric oxide in biochemistry and drug design /L.K. Keefer, C.F. Nathan, W.J. Payne //Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine; Meyers, R.A., Ed. – Weinhein, Germany. – 1996. – Vol. 4. – P.200-206.
141. Koppenol W.H. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide /W.H. Koppenol, J.J. Moreno, W.A. Pryor et al. //Chem Res. Toxicol. – 1992. – Vol. 5. – P.834-842.
142. Koppenol W.H. Say NO to nitric oxide: Nomenclature for nitrogen- and oxygen-contanting compounds /W.H. Koppenol, J.G. Traynham //Methods Enzymol. – 1996. – Vol. 268. – P.3-7.
143. Kordestani R.K. Cerebral arterial spasm after penetrating craniocerebral gunshot wounds: transcranial doppler and cerebral blood flow findings /R.K. Kordestani, C.J. Counelis, D.Q. McBridge et al. //Neurosurgery. - 1997. - Vol. 41, № 2. - P.351-359.
144. Kordestani R.K. Cerebral hemodynamic disturbances following penetrating craniocerebral injury and their influence on outcome /R.K. Kordestani, N.A. Martin, D.Q. McBride //Neurosurg. Clin. Am. – 1995. – Vol. 6 – P.657-667.

145. Koshland D.E. Molecule of the Year (editorial) /D.E. Koshland //Science. - 1992. - Vol. 258. – P.1861.
146. Kovack T.A. Neurochimical mechanisms in brain injury and treatment: a review /T.A. Kovack, M.C. Dillon, W.T. Jackson //J. of Clinical & Experimental Neuropsychology. – 1996. – Vol. 18, №5. – P.685-706.
147. Laight D.W., Kaw A.V., Carrier M.J., Anggard E. //Br. J. Pharmacol. – 1998. – Vol. 124, № 1. – P.238-244.
148. Lantoine F. Selective and sensitive electrochemical measurement of nitric oxide in aqueous solution: discussion and new results /F. Lantoine, S. Trevin, F. Bedioui, J. Devynck //J. of Electroanalytical Chemistry. – 1995. – Vol. 392. – P.85-89.
149. Lauer T. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action /T. Laer, M. Preik, T. Rassaf et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P.12814-12819.
150. Lepoivre M. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide /M. Lepoivre, F. Fieschi, J. Coves et al. //Biochem.biophys.Res.Commun. – 1991. - Vol. 179. – P.442-448.
151. Lipton S.A. Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA-receptors /S.A. Lipton, S.S. Stamler //Neuropharmacology. - 1994. - Vol. 33, № 11. - P.1229-1233.
152. Lowenstein C.J. Nitric oxide: a physiologic messengers /C.J. Lowenstein, J.L. Dinerman, S.H. Snyder /Ann. intern. Med. - 1994. - Vol. 120. - P.227-237.
153. Luscher T.F. Biology of the endothelium /T.F. Luscher, M. Barton //Clin. Cardiol. – 1997. - Vol. 20 – P.3–10.
154. Luscher T.F. Endothelium – derived contracting factors /T.F. Luscher, C.M. Boulanger, Y. Dohi, Z.H. Yang //Hypertension – 1992. – Vol. 19, № 2. – P.117–130.
155. Malinski T. Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets /T. Malinski, M.W. Radomski, Z. Taha, S. Moncada //Biochemical and biophysical research commumications. – 1993. – Vol. 194, № 2. – P.960-965.

156. Marletta M.A. Nitric oxide: Byosynthesis and biological significance /M.A. Marletta //Trends Biochem. Sci. – 1991. – Vol.14. – P.488-492.
157. Marletta M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism /M.A. Marletta //J. Biol. Chem. – 1993. – Vol. 268. – P.12231-12234.
158. Martin N.A. Posttraumatic cerebral arterial spasm /N.A. Martin, C. Doberstein, M. Alexander et al. //J. Neurotrauma. – 1995. – Vol. 12. – P.897-901.
159. Martin N.A. Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm /N.A. Martin, R.V. Patwardhan, M.J. Alexander et al. //Journal of Neurosurgery. - 1997. - Vol. 87, № 1. – P.9-19.
160. Michael T. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential /T. Michael, G.K. Gewalting //Cardiovasc. Res. – 2002. – Vol. 55. – P.250-260.
161. Micieli G., Bosone D., Costa A. et al. //J. Nerol Sci. – 1997. – Vol. 150, № 1. – P.71-75.
162. Moncada S. XIV Inernational union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research /S. Moncada, A. Higgs, RE. Furchgott //Pharmacol. Rev. – 1997. – Vol. 49. – P.137–142.
163. Moncada S. Mechanisms of disease: the L-arginine - nitric oxide pathway /S. Moncada, A. Higgs //New Engl. J. Med. – 1993. - Vol. 329. – P.2002-2012.
164. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology /S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs //Pharmacol. Rev. – 1991. - Vol. 43. – P.109-142.
165. Mordecai G.Y.-T. Glutamate release and free radical production following brain injury: Effects of posttraumatic hypothermia / G.Y.-T. Mordecai, A. Ofelia, W. Deitrich Dalton et al. //Neurochem. – 1995. – Vol. 65, № 4. – P.1704-1711.
166. Murphy S. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells /S. Murphy, M.L. Simmons, L. Agullo et al. //Trends Neurosci. – 1993. – Vol. 16. - P.323-328.

167. Nagao T. Endothelium–derived hyperpolarizing factor and endothelium–dependent relaxations /T. Nagao, P.M. Vanhoutte //Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 1993. - Vol. 8. – P.1–6.
168. Nakaki T. Physiological and clinical significance of NO (nitric oxide) - a review /T. Nakaki //Keio J. Med. – 1994. - Vol. 43. - P.15-26.
169. Nakamura S. Appearance of collagen fibers in the cerebral vascular wall following subarachnoid hemorrhage /S. Nakamura, T. Tsubokawa, K. Yoshida et al. //Neurol. Med. Chir. (Tokyo). – 1992. – Vol. 32. – P.877-882.
170. Nathan C. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls /C. Nathan, Q. Xie //Cell. – 1994. - Vol. 79. – P.915-918.
171. Pacelli R. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of Esherichia coli /R. Pacelli //J. Exp. Med. – 1995. – Vol. 182. – P.1469-1479.
172. Palmer R.M.J. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor /R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada //Nature. – 1987. - Vol. 327. – P.534-526.
173. Pepper C.B. Nitric oxide: from laboratory to bedside /C.B. Pepper, A.M. Shah //Spectrum Int. – 1996. - Vol. 36, №2. - P.20-23.
174. Pluta R.M. Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage /R.M. Pluta, E.H. Oldfield, R.J. Boock //J. Neurosurg. – 1997. – Vol. 87. – P.746-751.
175. Radomski M.W. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation /M.W. Radomski, R.M. Palmer, S. Moncada //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. - Vol. 87. – P.5193-5197.
176. Rand M.J. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission /M.J. Rand, G.G. Li //Ann. Rev. Physiol. – 1995. - Vol. 57. – P.659-682.
177. Rees D.D. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo /D.D. Rees, R.M.J. Palmer,

R. Schulz et al. //Br. J. Pharmacol. – 1990. - Vol. 101. - P.746-752.
178. Rongen G.A. Endothelium and the regulation of vascular tone with emphasis on the role of nitric oxide. Physiology, pathophysiology and clinical implications /G.A. Rongen, P. Smits, T.Thien //Neth. J. Med. – 1994. - Vol. 44, № 1. – P.26–35.
179. Rozsa L. Vasospasm after head injury studied by transcranial Doppler sonography /L. Rozsa, R. Combi, S. Szabo, M. Sztermen //Radiol. Diagn. (Berl). – 1989. – Vol. 30, № 2. – P.151-157.
180. Saavedra J.E. Localizing antithrombotic and vasodilatatory activity with a novel, ultrafast nitric oxide donor /J.E. Saavedra //J. Med. Chem. – 1996. – Vol. 39. – P.4361-4365.
181. Sato K., Yoshimoto A. //J. Nersurg. Anesthesiol. – 2000. – Vol. 12, № 2. – P.81-83.
182. Sander D. Cerebral vasospasm following post-traumatic subarachnoid hemorrhage evaluated by transcranial Doppler ultrasonography /D. Sander, J. Klingelhofer //J. Neurol. Sci. – 1993. - Vol. 119. – P.1-7.
183. Snyder S.H. Janus faces of nitric oxide /S.H. Snyder //Nature. – 1993. - Vol. 364. – P.577.
184. Stoos B.A. Endothelial-derived nitric oxide sodium transport by affecting apical membrane channels in cultured collecting duct cells /B.A. Stoos, O.A. Carretero, J.L. Garvin //J. Am. Soc. Nephrol. – 1994. - Vol. 4. – P.1855- 1860.
185. Strasser A. Effect of nitro-L-arginine on cerebral blood flow and monoamine metabolism during ischemia/reperfusion in the Mongolian gerbil /A. Strasser, Y. Yasuma, R. McCarron et al. //Brain res. – 1994. – Vol. 664. – P.197-201.
186. Strosznajder J. Nitric oxide: a potent mediator of glutamatergic neurotoxity in brain ischemia /J. Strosznajder, M. Chalimoniuk, M. Samochocki, R. Gadamski //Ann. of N.Y. Ac. of Sci. – 1994. – P.730-732.
187. Suzuki Y. Nitric oxide metabolites in the cisternal cerebral fluid of patients with subarachnoid hemorrhage /Y. Suzuki, K. Osuka, A. Noda et al. //Neurosurgery. – 1997. – Vol. 41. – P.807-811.

188. Taneda M. Traumatic subarachnoid hemorrhage as a predictable indicator of delayed ischemic symptoms /M. Taneda, K. Kataoka, F. Akai et al. //J. Neurosurg. – 1996. – Vol. 84. – P.762-768.
189. Tavaf-Motamen H. Nitric oxide mediates acute injury by modulation of inflammation /H. Tavaf-Motamen, T.J. Miner, B.W. Starnes et al. //J. Surg. Res. - 1998. - Vol. 78, № 2. - P.137-142.
190. Tiritilli A. Nitric oxide (NO), vascular protection factor. Biology, physiological role and biochemistry of NO /A. Tiritilli //Presse Med. – 1998. - Vol. 27. – P.1061–1064.
191. Thomas J. E., Nemirovsky A., Zelman V. et al. //Neurosurgery. – 1997. – Vol. 40, №6. – P.1245-1249.
192. Umans J.G. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure /J.G. Umans, R. Levi //Ann. Rev. Physiol. – 1995. - Vol. 57. – P.771-790.
193. Utepbergenov D.I. Nitric oxide protects blood-brain barrier in vitro from hypoxia/reoxigenation-mediated injury /FEBS Lett. – 1998. – Vol. 423, № 3. – P.197-201.
194. Uzan M. Nitric oxide (NO) metabolism in the cerebrospinal fluid of patients with severe head injury. Inflammation as a possible cause of elevated NO metabolites /M. Uzan, N. Tanriover, H. Bozkus et al. //Surg. Neurol. – 2001. – Vol. 56. – P.350-356.
195. Vardiman A. B. Treatment of traumatic arterial vasospasm with intraarterial papaverin infusion /A.B. Vardiman, T.A. Kopitnic, P.D. Purdy et al. //Am. J. Neuroradiol. – 1995. - Vol. 16, № 2. – P.319-321.
196. Walter R. Differential regulation of constitutive and inducible Nitric-oxide by inflammatory stimul in murine endothelial cells /R. Walter, A. Schuffner, G. Schoedon //Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – Vol. 202, № 1. – P.450-455.
197. Wang Y. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation /Y. Wang, P.A. Marsden //Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. – 1995. - Vol. 4. – P.12-22.
198. Watanabe T., Nishiama M., Hori T. //Neurol. Res. – 1997. – Vol. 19, № 5. – P.563-565.
199. Weber M. Evaluation of posttraumatic cerebral blood flow velocities by transcranial Doppler ultrasonography /M. Weber,

P. Grolimund, R.W. Seiler //Neurosurgery. – 1990. – Vol. 27. – P.106-112.
200. Weir B. Etiology of cerebral vasospasm /B. Weir, R.L. Macdonald, M. Stoodley //Acta Neurochir. Suppl. (Wien). – 1999. – Vol. 72. – P.27-46.
201. Wink D.A. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors /D.A. Wink, K.S. Kasprzak, C.M. Maragos et al. //Science. – 1991. - Vol. 254. – P.1001-1003.
202. Wink D.A. The effect of various nitric-oxide donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: A direct correlation between nitric oxide formation and protection /D.A. Wink //Arch. Biochem. Biophys. – 1996. – Vol. 331. – P.241-248.
203. Yumite Y. Concentracion of nitric oxide (NO) in spinal fluid of chronic spinal disease /Y. Yumite, K. Takeuchi, Y. Harada et al. //Acta Med. Okayama. – 2001. – Vol. 55. – P.219-228.
204. Zhang C., Hein T.W., Wang W. et al. //FASEB J. – 2001. – Vol. 12. – P.533-536.
205. Zhang J. Nitric oxide in the nervous system /J. Zhang, S.H. Snyder //Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1995. - Vol.35. – P.213-233.
206. Zhang X. An integrated Nitric Oxide Sensor Based on Carbon Fiber Coated with Selective Membranes /X. Zhang, L. Cardosa, M. Broderick et al. //Electroanalysis. – 2000. – Vol. 12. - № 14. – P.1113-1117.
207. Zubkov A.Y. Risk factors for the development of post-traumatic cerebral vasospasm /A.Y. Zubkov, A.I. Lewis, F.A. Raila et al. //Surg. Neurol. – 2000. – Vol. 53. – P.126-130.
208. Zubkov A.Y. Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm /A.Y. Zubkov, K. Ogihara, D.H. Bernanke et al. //Surg. Neurol. – 2000. - Vol. 53. – P.260-266.
209. Zubkov A.Y. Posttraumatic cerebral vasospasm: clinical and morphological presentations /A.Y. Zubkov, A.S. Pilkington, D.H. Bernanke et al. //J. Neurotrauma. – 1999. – Vol. 16. – P.763-770.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

**Список условных сокращений** **3**
**Введение** **5**
**Глава 1. Физиологическая роль оксида азота в организме** **11**
1.1. Физико-химические и биологические свойства NO 11
1.2. Синтез и биотрансформация оксида азота в организме 13
1.3. Биологические эффекты оксида азота 21
**Глава 2. Роль нитроксидергической системы в патогенезе повреждения мозга при тяжёлой черепно-мозговой травме** **25**
2.1. Эндотелиальные факторы регуляции сосудистого тонуса 25
2.2. Патофизиологические механизмы развития нарушений мозгового кровотока 31
2.3. Роль нитроксидергической системы в патогенезе повреждения нервных клеток при черепно-мозговой травме 39
2.4. Коррекция нитроксидергической системы в нейрореаниматологии 54
**Глава 3. Современные методы мониторинга оксида азота в биологических объектах, их достоинства и недостатки** **63**
**Глава 4. Прямое электрохимическое определение оксида азота в биологических жидкостях организма** **72**
4.1. Методика прямого электрохимического определения оксида азота 72
4.2. Изучение свойств электрохимической ячейки в статическом и динамическом режимах 75
4.3. Модифицирование поверхности сенсорного электрода для повышения чувствительности и селективности измерений 79
4.4. Разработка и применение углеволоконного микроэлектрода для количественной оценки содержания оксида азота 81

4.5. Измерение уровня оксида азота и изучение его соотношения с нитритом в реальных биологических системах 84
**Глава 5. Нарушения в нитроксидергической системе при тяжёлой черепно-мозговой травме 92**
5.1. Характеристика групп клинических наблюдений 92
5.2. Нарушения нитроксидергической регуляции и системной гемодинамики в зависимости от степени угнетения сознания 97
5.3. Динамика нитрита при тяжёлых ушибах и сдавлении головного мозга внутричерепными гематомами 108
5.4. Влияние интенсивности субарахноидальной геморрагии на нарушения в нитроксидергической системе 114
5.5. Возможности мониторинга нитроксидергической системы в оценке прогноза нейротравмы 120
**Заключение 131**
**Список использованной литературы 136**