

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ ВОСПАЛЕНИЯ**

Репозиторий РГМУ

Национальная академия наук Беларуси
Институт физиологии НАН Беларуси

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ВОСПАЛЕНИЯ

*Материалы международной научной конференции
(27-28 октября 2011 г., Минск, Беларусь)*

Минск
«ЭКОНОМПРЕСС»
2011

УДК 616-002:616-092.18(082)

ББК 52.5я43

Ф94

Рекомендовано к изданию
Ученым советом Института физиологии НАН Беларуси
(протокол № 11 от 18.07.2011.)

Редакционная коллегия:

И.В. Залуцкий, Л.И. Арчакова, В.Н. Калюнов, В.А. Кульчицкий,
В.Н. Никандров, В.В. Солтанов., В.С. Улащик, А.Г. Чумак.

Научные редакторы:

д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси, *И.В. Залуцкий*;
д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси, *В.А. Кульчицкий*;
д-р мед. наук, проф., академик НАН Беларуси *В.С. Улащик*

Рецензенты:

д-р биол. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *Е.И. Слобожанина*;
д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *А.В. Сукало*

Фундаментальные и прикладные аспекты воспаления : материалы

Ф94 междунар. конф. (27-28 окт. 2011 г. Минск, Беларусь) / науч. ред.

И.В. Залуцкий, А.В. Кульчицкий, В.С. Улащик. – Минск: Экономпресс, 2011. – 246 с.
ISBN 978-985-6479-61-1.

В сборник включены работы ученых и клиницистов Беларуси, Казахстана, Российской Федерации, Украины, в которых излагаются результаты фундаментальных и прикладных исследований воспалительных процессов. В статьях акцентировано внимание на моделировании локальных и системных воспалительных реакций, изучении механизмов их развития, новых технологиях диагностики, терапии и профилактики заболеваний воспалительного генеза.

Сборник предназначен для широкого круга ученых и врачей, занимающихся проблемами патогенеза и лечения локальных и системных воспалительных процессов.

УДК 616-002:616-092.18(082)

ББК 52.5я43

ISBN 978-985-6479-61-1

© Институт физиологии НАН Беларуси, 2011
© Оформление УП «Экономпресс» 2011

КИСЛОРОДТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь.

Введение. Интерес к липополисахариду (ЛПС) обусловлен тем, что организм человека постоянно контактирует с достаточно большим количеством этого эндотоксина, что обеспечивает поддержание гомеостаза и адаптацию к стрессовым воздействиям [4]. Однако действие больших доз ЛПС приводит к нарушению оксигенации тканей и развитию гипоксии. Несмотря на имеющиеся работы, посвященные изучению эффектов и механизмов действия ЛПС на организм, вопрос об изменении кислородсвязывающих свойств крови и других, связанных с ними процессов, в условиях окислительного стресса, индуцированного длительным введением ЛПС, остается до конца не изученным, что и предопределяет интерес к данной проблеме. Цель данного исследования - оценка характера изменений кислородтранспортной функции (КТФ) крови, а также активности свободнорадикальных процессов в крови крыс после многократного введения ЛПС, их коррекция с помощью веществ, изменяющих активность L-аргинин-NO системы.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводились на лабораторных крысах-самцах (n=52) массой 200-250 г., которые содержались в условиях университетского вивария при свободном доступе к воде и пище, при искусственном освещении: 12 ч (день) – 12 ч (ночь). Животным контрольной группы (n=7) вводили интروперитонеально болюсно 1,0 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Крысам второй группы (n=7) была выполнена инъекция ЛПС *Escherichia coli* (Serotype O111:B4, "Sigma") в дозе 5 мг/кг, третьей экспериментальной группе животных (n=8) через 15 минут после введения ЛПС была осуществлена внутривенная инъекция L-аргинин в дозе 100мг/кг, четвертой (n=7) – N^w-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) (20 мг/кг), пятой (n=8) – сочетание L-аргинина и L-NAME в соответствующих дозах, шестой (n=8) – аминоксидин (АГ) (100 мг/кг), седьмой (n=7) – сочетание L-аргинина и АГ в тех же дозировках. Введение данных веществ осуществлялось в течение трех суток с интервалом 24 часа. Забор крови (10 мл) осуществляли через 12 часов после последней инъекции ЛПС. Оценку показателей КТФ и кислотно-основного состояния в исследуемых образцах крови проводили при температуре 37°C на микроанализаторе «Syntesis-15». По показателю р50 (рО₂ крови при 50% насыщении ее кислородом) определяли сродство гемоглобина к кислороду (СГК) методом «смешивания» равных объемов оксигенированной и деоксигенированной крови для получения крови 50% степени насыщения при температуре 37°C, рН 7,4, рСО₂ 40 мм рт. ст. (р50_{станд.}), а затем рассчитывали р50 при реальных условиях этих показателей (р50_{реал.}). Продукцию монооксида азота (NO) оценивали по суммарному содержанию нитрат/нитритов в плазме крови спектрофотометрическим методом.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли по интенсивности УФ - поглощения, характерного для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов, в области 232-234 нм на спектрофотометре «СФ-46». Уровень малонового диальдегида (МДА) оценивали спектрофотометрически по интенсивности окраски комплекса розового цвета, образованного в реакции с 2'-тиобарбитуровой кислотой, на «Solar» PV1251C при длине волны 540 нм. Активность каталазы регистрировали по количеству окрашенного продукта в реакции Н₂О₂ с молибденовокислым аммонием, при длине волны 410 нм на спектрофотометре «Solar» PV1251C. Статистическую

значимость результатов оценивали методом непараметрической статистики для независимых выборок – критерии Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение. Существенных изменений показателей pH и pCO_2 во всех экспериментальных группах не наблюдалось. В целом значимых нарушений со стороны кислотно-основного состояния крови не выявлено, что, очевидно, отражает достаточный уровень компенсаторных реакций со стороны организма. После трехкратного введения эндотоксина выявлены следующие изменения кислородсвязывающих свойств крови. Величина реального $p50$ (с учетом реальных значений pH, pCO_2 , и температуры тела) после введения ЛПС в сравнении с контролем уменьшается на 4,8% ($p<0,01$), что обуславливает сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево. Аналогичная тенденция наблюдается и при проведении коррекции с помощью указанных ранее физиологически активных веществ. Так, при введении L-аргинина после инъекции ЛПС отмечается уменьшение показателя $p50_{\text{реал}}$ на 8,5% ($p<0,01$) в сравнении с контрольной группой. Введение L-NAME снижает $p50_{\text{реал}}$ на 4,2% ($p<0,05$), AG на 7,9% ($p<0,01$), а сочетание AG с L-аргинином на 6,6% ($p<0,05$), в сравнении с контрольной группой животных. Наблюдается увеличение показателя MetHb с $0,30\pm0,13\%$ до $0,97\pm0,10\%$ ($p<0,01$) после трехкратной инъекции ЛПС, а также отмечается повышение при введении L-NAME до $0,86\pm0,09\%$ ($p<0,05$) и сочетание L-аргинина и AG – до 1,0 (0,4-1,1)% ($p<0,05$), по отношению к контрольной группе животных.

Суммарное содержание нитрат/нитритов в сравнении с контрольными животными увеличивается во всех экспериментальных группах. Так, введение эндотоксина повысило концентрацию данного показателя с $17,89\pm1,26$ до $41,52\pm3,79$ мкмоль/л ($p<0,01$), L-аргинина до $29,27\pm1,33$ мкмоль/л ($p<0,01$), L-NAME до $40,74\pm3,38$ мкмоль/л ($p<0,01$), совместное введение L-аргинина с L-NAME увеличивает до $33,72\pm3,11$ мкмоль/л ($p<0,01$), инъекция с AG до $26,84\pm1,76$ мкмоль/л ($p<0,01$), а его сочетание с L-аргинином до $31,43\pm1,30$ мкмоль/л ($p<0,01$), по отношению к контролю. Однако, в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС, введение модуляторов L-аргинин-NO системы сопровождалось снижением суммарного содержания нитрат/нитритов: L-аргинин уменьшал данный показатель на 29,5% ($p<0,01$), AG на 35,4% ($p<0,01$), а их сочетание на 24,3% ($p<0,05$).

Трехкратное введение эндотоксина привело к увеличению уровня ДК и содержания МДА в эритроцитах и плазме крови крыс. Так, в эритроцитах уровень ДК возрос на 89,3% ($p<0,01$), в плазме на 325% ($p<0,01$), концентрация МДА в эритроцитах увеличилась на 87,2% ($p<0,01$), в плазме крови на 41,3% ($p<0,05$), по отношению к контрольной группе животных. При введении неселективного ингибитора фермента NO-синтазы (L-NAME) после инъекции ЛПС наблюдается также рост первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, в сравнении с контрольной группой: ДК в эритроцитах увеличивается 99,1% ($p<0,05$), в плазме на 271,6% ($p<0,01$), МДА в эритроцитах на 85,4% ($p<0,01$), в плазме на 45,2% ($p<0,01$). А L-NAME в сочетании с L-аргинин повышает уровень ДК в эритроцитах на 79,0% ($p<0,01$), в плазме на 255,7% ($p<0,01$) и концентрацию МДА в эритроцитах на 91,2% ($p<0,05$), в плазме на 31,3% ($p<0,01$). Однако, при инъекции, в условии окислительного стресса, L-аргинина, AG и их сочетание наблюдается снижение ДК и МДА в эритроцитах и плазме в сравнении с группой получавшей только один эндотоксин. Так, введение L-аргинина после инъекции ЛПС сопровождалось уменьшением в эритроцитах ДК на 17,7% ($p<0,01$), МДА на 31,7% ($p<0,01$) и в плазме крови ДК на 52,1% ($p<0,01$) и МДА на 22,5% ($p<0,05$). Применение AG приводит к снижению ДК в эритроцитах на 15,4% ($p<0,05$), МДА на 32,5% ($p<0,05$) и ДК в плазме крови на 36,6% ($p<0,01$), МДА на 26,7% ($p<0,05$). А их сочетание уменьшает ДК в эритроцитах с $38,79\pm1,14$ до $29,59\pm1,62$ $\Delta D_{233}/\text{мл}$ ($p<0,01$), МДА с $18,63\pm0,59$ до $14,92\pm1,04$ мкмоль/л ($p<0,05$) и ДК в плазме

крови с $3,74\pm0,22$ до $2,28\pm0,17$ $\Delta D_{233}/\text{мл}$ ($p<0,01$), МДА с $3,56\pm0,33$ до $2,66\pm0,15$ мкмоль/л ($p<0,05$). Активности катализаторов статистически достоверно не снижались.

При избыточном уровне NO, взаимодействуя с другими окислителями, образует активные формы азота, которые повреждают клеточные мишени [2]. Действие эндотоксина вызывает экспрессию индуцибельной NO-синтазы и приводит к образованию большого количества NO, взаимодействующего с O_2 с образованием пероксинитрата – мощного окислителя [3]. Кислородсвязывающие свойства крови оказывают влияние на состояние L-аргинин-NO системы, а она в свое время может определять функциональные свойства гемоглобина путем модификации его сродства к кислороду через внутриэритроцитарные механизмы регуляции, действие пероксинитрита. Эффекты коррекции L-аргинин-NO системы обусловлены, как результат воздействия NO на гемоглобин, так и опосредованно через кислородзависимые механизмы регуляции образования NO. Ингибирование образования NO вызывает сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия, очевидно, не только в связи с потенциально высокими его потоками, которые могут реагировать со многими молекулами-мишенями, а как следствие снижения вклада других факторов в антиоксидантный потенциал организма и, в частности, изменение SGK [1]. Анализ приспособительных изменений кислородсвязывающих свойств крови при гипоксиях необходимо рассматривать в аспекте функциональных отношений системы транспорта кислорода и L-аргинин-NO системы. В наших исследованиях показано, что введение L-аргинина в дозе 100 мг/кг после инъекции ЛПС вызывает улучшение параметров КТФ, снижая $p50$ (при реальных значениях pH, pCO_2 и температуры). Данное физиологически активное вещество уменьшает окислительные процессы, индуцированные ЛПС, снижая активность свободнорадикальных процессов (уменьшение уровня ДК, содержания МДА в эритроцитах и в плазме крови). Снижение продуктов перекисного окисления липидов также наблюдалось при введении селективного ингибитора фермента NO-синтазы (AG) и его сочетание с L-аргинином после введения крысам эндотоксина.

Таким образом, результаты проведенной работы показывают, что трехкратное введение ЛПС с интервалом 24 часа в дозе 5 мг/кг вызывает повышение SGK, увеличение уровня ДК и содержание МДА, снижение фактора антиоксидантной системы. Повышение SGK отражает формирование адаптационных реакций организма, направленных на адекватное снабжение тканей кислородом в соответствии с их потребностью в нем, тем самым, предупреждая избыточное его использование для свободнорадикального окисления [1]. Это позволяет рассматривать SGK как один из факторов, участвующих в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма. Целенаправленное применение физиологически активных веществ (исходного субстрата L-аргинина), изменяющих состояния L-аргинин-NO системы, может использоваться для коррекции процессов перекисного окисления липидов, антиоксидантной системы и для повышения устойчивости организма к длительному действию липополисахаридного эндотоксина, реализующее свое действие через механизм формирования SGK.

Литература

1. Шульга Е.В., Зинчук В.В. // Вести национальной академии наук Беларуси. 2009. Т.4. С. 38–43.
2. Bryan N.S., Grisham M.B. // Free Radic. Biol. Med. 2007. Vol. 43(5). P. 645–657.
3. Quinn P.J., Wang X. // Subcell Biochem. 2010. Vol. 53. P. 3–25.
4. Sperandio P., Deho G., Polissi A. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1791(7). P. 594–602.