

А.Н. ГЛЕБОВ
Е.В. ШУЛЬГА
В.В. ЗИНЧУК

**РОЛЬ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ
КРОВИ В РАЗВИТИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
СТРЕССА, ИНДУЦИРОВАННОГО
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ**

Монография

Под редакцией Зинчука В.В.

Гродно
ГрГМУ
2011

УДК 612.23:542.943-92'78:579.84

ББК 28.91

Г 53

Рекомендовано Редакционно-издательским советом УО «ГрГМУ»
(протокол № 3 от 21.04.2011 г.).

Авторы: нач. каф. воен. эпидемиологии и воен. гигиены УО «БГМУ»,
канд. мед. наук, доц. А.Н. Глебов;
канд. мед. наук, ассист. каф. нормальной физиологии
УО «ГрГМУ» Е.В. Шульга
проректор по научной работе УО «ГрГМУ», д-р мед. наук,
проф. В.В. Зинчук;

Рецензенты: зав. каф. физиологии человека и животных УО «Белорусский
государственный университет», д-р биол. наук, проф.
А.Г. Чумак;
д-р мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии
УО «Белорусский государственный медицинский
университет» В.А. Переверзев.

Глебов, А.Н.

Г 53 Роль кислородсвязывающих свойств крови в развитии
окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом /
А.Н. Глебов, Е.В. Шульга, В.В. Зинчук; под ред. Зинчука В.В. –
Гродно, 2011. – 216 с.

ISBN 978-985-496-807-0

В данной монографии представлен анализ роли кислородсвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом. Показан характер изменений кислородтранспортной функции крови, активности свободнорадикальных процессов и факторов антиоксидантной защиты после введения липополисахарида. Выявлены и обоснованы возможные пути коррекции состояний, сопровождающихся нарушением кислородсвязывающих свойств крови и прооксидантно-антиоксидантного равновесия. Издание будет полезно студентам, аспирантам, научным сотрудникам, специалистам в области нормальной и патологической физиологии, реаниматологии, педиатрии, инфекционных болезней и других клинических дисциплин. Монография содержит 37 рисунков, 29 таблиц, библиография из 529 названий.

Никакая часть этой книги не может быть воспроизведена в любой форме или любыми средствами, электронными или механическими, включая фотографирование, магнитную запись или иные средства копирования или сохранения информации, без письменного разрешения авторов.

УДК 612.23:542.943-92'78:579.84

ББК 28.91

ISBN 978-985-496-807-0

© Глебов А.Н., Шульга Е.В., Зинчук В.В. 2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ.....	12
1.1 Характеристика основных эффектов липополисахарида.....	12
1.2 Механизмы развития окислительного стресса, индуцированного липополисахаридным эндотоксином	20
1.3 Участие L-аргинин-NO системы в изменениях, индуцированных липополисахаридом.....	28
ГЛАВА 2 ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ МОДУЛЯЦИИ L-АРГИНИН- NO СИСТЕМЫ И АНТИОКСИДАНТНЫХ МЕХАНИЗМОВ.....	36
2.1 Окислительный стресс и L-аргинин-NO система.....	36
2.2 Содержание продуктов перекисного окисления липидов и факторов антиоксидантной системы в тканях при окислительном стрессе в условиях модуляции образования NO.....	45
2.3 Активность свободнорадикального окисления липидов в тканях при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и изменения NO-образующей функции.....	61
2.4 Активность процессов перекисного окисления липидов и показатели антиоксидантного состояния в течение первых 5 суток после введения липополисахарида.....	72
2.5 Оценка действия аминогуанидина на активность	

процессов перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантного статуса организма через 12 часов после введения липополисахарида.....	80
--	----

ГЛАВА 3 КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ..... 86

3.1 Значение L-аргинин-NO системы в формировании кислородтранспортной функции крови.....	86
--	----

3.2 Динамика изменения кислородсвязывающих свойств крови при окислительном стрессе в условиях коррекции образования NO.....	97
---	----

3.3 Кислородтранспортная функция крови при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и модуляции синтеза NO.....	111
---	-----

3.4 Исследование механизмов транспорта кислорода кровью в течение первых 5 суток после введения липополисахарида.....	117
---	-----

3.5 Изучение влияния аминоксидина на кислородтранспортную функцию крови через 12 часов после введения липополисахарида.....	121
---	-----

ГЛАВА 4 РЕГУЛЯЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СОСТОЯНИЯ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА..... 127

4.1 Физиологическое значение мелатонина.....	127
--	-----

4.2 Влияние мелатонина на кислородтранспортную функцию крови после инъекции липополисахарида.....	132
---	-----

4.3 Определение эффектов мелатонина на свободнорадикальные процессы и антиоксидантную систему после введения липополисахарида.....	137
--	-----

ГЛАВА 5 ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА.....	142
5.1 Неэритропоэтические свойства эритропоэтина.....	142
5.2 Механизмы транспорта кислорода кровью после использования эритропоэтина и липополисахарида.....	148
5.3 Эффект эритропоэтина на содержание продуктов перекисного окисления липидов и факторов антиоксидантной системы в условиях введения липополисахарида.....	151
 ГЛАВА 6 ЭФФЕКТ 1-МЕТИЛНИКОТИНАМИДА НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА.....	 157
6.1 Основные эффекты 1-метилникотинамида.....	157
6.2 Изучение влияния 1-метилникотинамида на кислородтранспортную функцию крови после инъекции липополисахарида.....	161
6.3 Оценка действия 1-метилникотинамида на активность процессов перекисного окисления липидов и показатели антиоксидантного состояния после введения липополисахарида.....	165
 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	 173
 Список использованных источников.....	 177

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ	- амингуанидин
АФК	- активные формы кислорода
АОС	- антиоксидантная система
ГИФ	- гипоксией индуцируемый фактор
ДК	- диеновые конъюгаты
иNOC	- индуцибельная изоформа NO-синтазы
КДО	- кривая диссоциации оксигемоглобина
КТФ	- кислородтранспортная функция
ЛПС	- липополисахарид
МДА	- малоновый диальдегид
МНА	- 1-метилникотинамида хлорид
МПО	- миелопероксидаза
ОШ	- основания Шиффа
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
СГК	- сродство гемоглобина к кислороду
СОД	- супероксиддисмутаза
эNOC	- эндотелиальная изоформа NO-синтазы
ЭПО	- эритропоэтин- α
ФНО- α	- фактор некроза опухоли- α
ABE/SBE	- реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований
C_vO_2	- содержание кислорода
GSH	- глутатион
Hb	- гемоглобин
HCO_3^-	- гидробикарбонат плазмы
Hsp	- белки теплового шока
NF- κ B	- ядерный фактор каппа В
NO	- монооксид азота
pH	- отрицательный десятичный логарифм концентрации водородных ионов
pCO_2	- парциальное давление диоксида углерода
pO_2	- парциальное давление кислорода
$p50$	- pO_2 , при котором гемоглобин насыщается O_2 на 50%
SO_2	- степень оксигенации крови
SBC	- концентрация стандартного бикарбоната
TCO_2	- общее содержание диоксида углерода в крови

ВВЕДЕНИЕ

Круговорот кислорода у аэробных организмов сопровождается выработкой активных форм кислорода [Болдырев А.А., 1995]. Избыточная генерация прооксидантов в тканях в стационарных условиях уравнивается образованием ферментативных и неферментативных внутри- и внеклеточных антиоксидантов, что формирует определённый оптимальный уровень прооксидантно-антиоксидантного равновесия [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999; Зинчук В.В. и др., 2005]. Состояние, при котором это равновесие изменено в связи с чрезмерной выработкой свободных радикалов и недостаточностью антиоксидантной системы (АОС), обозначают как окислительный стресс. Термин «oxidative stress» впервые был употреблен в работе Paniker N.V. et al. [1970]. За последние годы интерес к данной проблеме значительно вырос: в PubMed было опубликовано в 1980 г. – 25, 1990 г. – 759, 2000 г. – 3200, 2010 г. – 11880 работ. Кения М.В. и др. [1993] определяют окислительный стресс как сдвиг тканевого баланса антиоксидантов и прооксидантов в сторону последних. Schettler V. et al. [1999] характеризуют данное состояние как нарушение прооксидантно-антиоксидантного клеточного баланса. По мнению Hayes J.D. et al. [1999], окислительный стресс является результатом увеличения внутриклеточного образования активных метаболитов кислорода.

Исследования последних лет привели к пониманию того, что большинство патологических процессов в человеческом организме сопряжено с нарушениями прооксидантно-антиоксидантного баланса [Владимиров Ю.А., 1998; Донскова Ю.С. и др., 2004]. Окислительные процессы, сопровождающиеся образованием токсических, вследствие своей высокой реактивности, активных форм кислорода (АФК), органических и неорганических перекисных соединений, являются неотъемлемой частью функционирования живого организма так же, как и антиоксидантные механизмы, осуществляющие их инактивацию [Скулачев В.П., 1995, 1999]. При нарушении баланса этих компонентов на фоне тяжёлых патологических состояний происходит избыточное накопление свободных радикалов и

продуктов их реакций, что приводит к биохимическим и структурным нарушениям клеток: изменению проницаемости клеточных мембран, нарушению межклеточного взаимодействия, обменных процессов [Маркель А.Л., 2001; Spronk P.E. et al., 2004]. Метаболические нарушения, возникающие на клеточном уровне, обуславливают развитие функциональной несостоятельности различных органов и тканей, срыв адаптационных ресурсов [Меерсон Ф.З., 1993], приводят к возникновению окислительного стресса [Зенков Н.К., Ланкин В.З., 2001].

В случае превышения возможности защитных систем организма от избытка продуктов неполного восстановления кислорода возникает окислительный стресс, на который клетки реагируют депрессией ряда совместно регулируемых генов, белки которых ответственны за удаление реакционно-способных соединений или восстановление клеточных повреждений [Брюханов А.Л., 2004]. Функционирование различных компонентов АОС часто рассматривается изолированно от остальных систем клеток [Зайцев В.Г., 1998]. Высшие организмы имеют глубокоэшелонированную систему защиты от кислорода, первый уровень которой заключается в его снижении в тканях до концентрации, насыщающей цитохромоксидазу, но недостаточной для образования АФК [Скулачев В.П., 2001]. В организме существует каскадная система снижения pO_2 до оптимального его значения в клетке и далее в митохондриях [Коваленко Е.А., Черняков И.Н., 1972]. Согласно современным представлениям, основанным на системном подходе организации физиологических процессов [Судаков К.В., 1987], система антиоксидантной защиты представляет собой сложную, ауторегулируемую, многокомпонентную метаболическую цепь, компоненты которой функционируют, дополняя друг друга [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999]. При выраженной и длительной активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) наступает истощение эндогенных биоантиоксидантов; дополнительное поступление их замедлено вследствие нарушения циркуляции и проницаемости клеточных мембран. В результате это приводит к резкому снижению эндогенных биоантиоксидантов, что обуславливает

необходимость поиска новых факторов антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия.

Особый интерес представляет окислительный стресс, вызываемый введением липополисахарида (ЛПС), являющегося компонентом мембраны грамотрицательных бактерий [Wang X., Quinn P.J., 2010], вызывает в эффекторных клетках усиленную экспрессию ряда цитокинов, молекул адгезии, оксигеназ, индуцибельной изоформы NO-синтазы (иNOS) [Рябиченко Е.В. и др., 2005; Neo S.K. et al., 2008], способствуя развитию нитрозильного и окислительного стресса [Саникидзе Т.В. и др., 2006; Рязанцева Н.В. и др., 2009]. Интерес исследователей к данному фактору обусловлен не только его уникальной структурой и весьма широким разнообразием вызываемых эффектов, но и тем, что организм человека постоянно контактирует с достаточно большим количеством этого токсина [Яковлев М.Ю., 2003], что обеспечивает поддержание гомеостаза и адаптацию организма к стрессовым воздействиям [Аниховская И.А. и др., 2006]. Окислительные повреждения, вызванные действием больших доз ЛПС, ухудшают процессы микроциркуляции, оксигенации тканей, обуславливают развитие гипоксии [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002].

Системная воспалительная реакция представляет собой одну из форм ответа макроорганизма на бактериальную инфекцию, наиболее изученным её индуктором является ЛПС грамотрицательных бактерий [Сидоренко С.В., 2001]. Введение экспериментальным животным очищенных его препаратов вызывает развитие эндотоксического шока [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002]. Комплекс патологических изменений в организме, обусловленный действием ЛПС, является результатом как его прямого токсического действия на жизненно важные функции, так и развивающихся избыточных защитных реакций макроорганизма [Авдеева М.Г., Шубич М.Г., 2003]. Клинические проявления патологического действия липополисахаридного эндотоксина, такие как сепсис, септический шок, являются наиболее частыми причинами смерти больных

Одним из ведущих механизмов развития септического шока является окислительный стресс, который развивается в организме в результате дисбаланса между выработкой свободных

радикалов и эндогенными механизмами антиоксидантной защиты, что вызывает повреждение тканей через окислительную модификацию основных компонентов клеточной мембраны [Korantzopoulos P. et al., 2003]. В основе развития окислительного стресса лежит чрезмерная выработка активных форм кислорода/азота или недостаточность клеточных механизмов защиты, ограничивающих их образование и негативное воздействие. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что окислительный стресс играет ведущую роль в генезе различных патологических состояний, таких как ишемия-реперфузия, атеросклероз, сердечная недостаточность, гипертензия, почечная недостаточность, кардиомиопатии [Мальшев И.Ю. и др., 2004].

Моноксид азота (NO) – молекула, оказывающая выраженный эффект на сердечно-сосудистую систему, обладающая цитотоксическим, иммуно-модуляторным и нейромедиаторным действием [Moncada S., Higgs E.A., 1993]. Между монооксидом азота и свободными радикалами существуют сложные отношения, определённое равновесие, формирующее в физиологическом компартменте развитие окислительного стресса [Go Y.M. et al., 1999; Szabo C., 2003]. При сепсисе повышено содержание монооксида азота, который играет важную роль в возникающей патологии, однако точные механизмы его участия при этом остаются неясными [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002]. В эритроцитах протекают нитрозирующие реакции, ведущие к образованию с монооксидом азота различных соединений, обладающих широким спектром физиологического и патологического действия [Crawford J.H. et al., 2004]. Кислородзависимый механизм образования свободных радикалов предполагает участие кислородтранспортной функции (КТФ) крови в активации процессов ПОЛ [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999]. Представляет интерес изучение взаимодействия гемоглобина с NO, так как кислородсвязывающие свойства крови влияют на состояние L-аргинин-NO системы, и в то же время она может определять функциональные свойства гемоглобина [Зинчук В.В., 2003]. Учитывая изложенное, важным и актуальным является исследование целесообразности применения факторов, воздействующих на КТФ крови и

L-аргинин-NO систему для уменьшения тяжести окислительного повреждения, обусловленного действием ЛПС.

В системных механизмах адаптации к изменяющимся условиям внутренней и внешней среды важная роль принадлежит механизмам транспорта O_2 кровью, и, в частности, сродству гемоглобина к кислороду (СГК) [Гацура С.В., Гацура В.В., 2005]. КТФ крови обеспечивает адаптивные процессы к гипоксии через долгосрочные и краткосрочные механизмы [Winslow R.M., 2005]. Процессы транспорта кислорода кровью играют ключевую роль в поддержании прооксидантно-антиоксидантного баланса, что обеспечивает развитие адекватных системных физиологических реакций в изменяющихся условиях внешней среды [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999]. Современные представления относительно механизмов действия ЛПС недостаточно полны, в связи с чем целесообразен поиск средств, оказывающих регуляторное воздействие на его эффекты [Лиходед В.Г. и др., 1996; Аниховская И.А. и др., 2006]. Различные аспекты действия ЛПС на кислородсвязывающие свойства крови, СГК, прооксидантно-антиоксидантный баланс и оценка вклада физиологически активных веществ, вырабатываемых в организме, на механизмы регуляции КТФ крови, свободнорадикальных процессов и антиоксидантной системы остаются до конца не изученными, что и предопределило интерес к данной проблеме.

Выполнение основных манипуляций на животных авторы данной монографии осуществляли в условиях адекватной анальгезии, в соответствии с рекомендациями, разработанными Европейской комиссией по защите используемых в экспериментах животных, и на основании разрешения комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета.

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ

1.1 Характеристика основных эффектов липополисахарида

ЛПС имеет различные точки приложения своего действия. Он является главным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий, состоящим из трех структурных элементов: ядро (олигосахарид), полисахарид и липид А [Alexander C., Rietschel E.T., 2001]. Эффекты ЛПС реализуются как путем прямого взаимодействия с липидным компонентом клеточных мембран, так и опосредованно, за счет связывания с мембранными рецепторами и инициирования ряда каскадных реакций (рисунок 1.1).

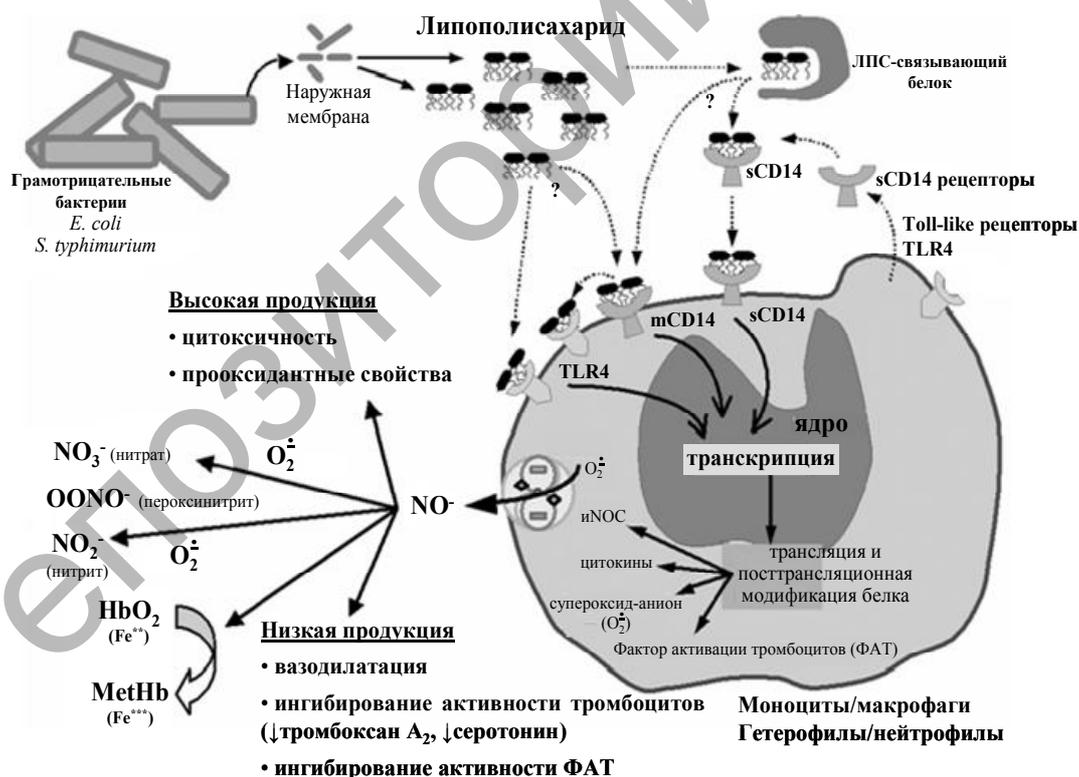


Рисунок 1.1 - Основные механизмы действия липополисахарида в организме [Wideman R.F., 2004]

Транспорт данного токсина осуществляется с помощью белка, связывающего ЛПС и доставляющего его к мембранно-связанным или к свободным рецепторам CD14, после чего образовавшийся комплекс взаимодействует с рецепторами Toll-like 4 [Dauphinee S.M., Karsan A., 2006], которые способны осуществлять трансмембранную передачу сигнала, активировать клетки через ядерный фактор каппа В (NF-κB) [Викторов А.В., Юркив В.А., 2006], вызывать продукцию провоспалительных цитокинов (интерлейкин (ИЛ)-8), фактора роста эндотелия сосудов, молекулы межклеточной адгезии-1, молекулы сосудисто-клеточной адгезии-1 [Neo S.K. et al., 2008], усиливать генерацию свободных радикалов и инициировать развитие окислительного стресса [Ryan K.A. et al., 2004]. Выявлено, что активация CD14-рецепторов наблюдается при относительно малых дозах ЛПС, тогда как при высоких – ответ реализуется через CD11b/CD18-рецепторы [Moore K.J. et al., 2000]. Установлено также, что существует CD14-независимое инициирование сигнала ЛПС в макрофагах, когда он связывается с белками теплового шока (heat shock proteins – Hsp): Hsp70 и Hsp90. [Dauphinee S.M., Karsan A., 2006]. После введения ЛПС-токсина синхронно повышается экспрессия данных белков и продукция фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-α), NO [Новоселова Е.Г. и др., 2006].

Эндотоксический шок, индуцируемый ЛПС, является системным воспалительным ответом, обусловленным чрезмерной секрецией провоспалительных медиаторов [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002]. Эндотоксин действует как мощная сигнальная молекула, способная вызывать сепсис. Он индуцирует опосредуемый рецепторами каскад сигналов, ведущих к активации NF-κB, транскрипции и высвобождению моноцитами и макрофагами цитокинов и других медиаторов воспаления. Их чрезмерная выработка вызывает синдром септического шока [Obritsch M.D. et al., 2004]. Эти внутриклеточные процессы контролируются редокс-состоянием клеток [Flohe L. et al., 1997]. Механизм повреждения тканей при сепсисе, вероятно, связан с широко распространённым повреждением сосудистого эндотелия и микротромбозом, что, в свою очередь, сокращает доставку кислорода и субстратов в ткани, активируя анаэробный

метаболизм. Увеличивается скорость гликолиза и нарушается клиренс лактата и пирувата печенью и почками. Воспалительные медиаторы – производные арахидоновой кислоты (простагландины и лейкотриены), вызывают местное расширение или сужение различных отделов сосудистого русла, что приводит к патологическому изменению кровотока [Chu S.C., Yang S.F., 2004]. В дальнейшем при декомпенсации механизмов регуляции, нарушении гомеостаза наступает функциональная недостаточность жизненно важных органов [Suliman H.V. et al., 2004]. Возникший регуляторный дисбаланс вызывает септический шок, проявляющийся гипотензией и сосудистым коллапсом, недостаточностью функции сердца, почек, лёгких, печени, ЦНС, нарушением системы гемостаза [Kapturczak M.H. et al., 2004].

Пусковым моментом связанного с ЛПС каскада передачи сигналов, ведущим к активации NF- κ B и последующей транскрипции провоспалительных генов, является распознавание молекул ЛПС специфическими клетками иммунной системы [Wang X., Li W., 2004]. Опосредуемый рецепторами сигнальный каскад, индуцируемый ЛПС в моноцитах, ведёт к активации NF- κ B, контролирующего восприимчивость клеток к стрессу. Данный фактор активирует транскрипцию провоспалительных цитокинов [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002]. ЛПС связывается с белком, именуемым как липополисахаридсвязывающий белок [Park G.Y., Im Y.H., 2004], который, взаимодействуя со своими рецепторами, активирует различные популяции клеток. За последнее десятилетие было выявлено множество рецепторов эндотоксина: 2-интегрины CD₁₁/CD₁₈, рецепторы-гасители макрофагов для ацетилированных липопротеидов низкой плотности, L-селектин и CD₁₄. Исследования мышей с дефицитом CD₁₄ выявили их высокую резистентность к шоку, индуцируемому грамотрицательными бактериями или ЛПС. Однако при очень высоких концентрациях ЛПС активация NF- κ B и транскрипция генов цитокинов опосредованы путём, независимым от CD₁₄ [Perera P.Y. et al., 1997]. Участие CD₁₄ предполагалось также в процессах активации клеток с вовлечением других продуктов микробных патогенов, в том

числе липоарабиноманнанов, пептидогликанов и липопротеидов внешней мембраны.

Фактор транскрипции NF- κ B опосредует, вызываемое ЛПС, высвобождение ряда медиаторов воспаления и цитокинов. α -Фактор некроза опухолей (α -ФНО) стимулирует лейкоциты и эндотелиальные клетки сосудов к высвобождению других цитокинов, к экспрессии молекул адгезии клеточной поверхности и к ускорению метаболических превращений арахидоновой кислоты [Gutierrez-Ruiz M.C. et al., 1999; Lehtolainen T. et al., 2004]. Однако нерегулируемое высвобождение α -ФНО в кровь ведёт к циркуляторной дисфункции, вызывает повышение проницаемости эндотелия и воспаление различных органов [Matsuzaki H. et al., 2004].

ЛПС в кровотоке может находиться в свободном состоянии или быть связанным с сывороточными липопротеинами [Викторов А.В., Юркив В.А., 2006]. В исследованиях *in vitro* была изучена способность комплексов эндотоксин-липопротеины низкой плотности связываться и захватываться артериальной стенкой и мононуклеарными фагоцитами, что провоцирует целый каскад реакций [Шварц Я.Ш., Душкин М.И., 2009]. Повреждение клеток эндотелия, вызванное введением ЛПС, проявляется в виде микропиноцитозных везикул в цитоплазме эндотелиоцитов, отёком, клазматозом участков цитоплазмы, расхождением клеток с обнажением субэндотелия, слущиванием данных клеток, деструкцией базальной мембраны и образованием дефектов, что указывает на прямое повреждающее действие ЛПС на данный отдел сосудистой системы [Бардахчян Э.А. и др., 1997].

Развитие эндотелиальной дисфункции и окислительного стресса после введения ЛПС характеризуется увеличением продукции свободных радикалов, которые уменьшают биодоступность NO через его химическую инактивацию. Образующий пероксинитрит способен, в свою очередь, ингибировать эндотелиальную изоформу NO-синтазы (эНОС), что усугубляет развитие дисфункции и окислительного стресса [Förstermann U., 2008].

Повышение в плазме уровня гомоцистеина (серосодержащей аминокислоты, являющейся промежуточным продуктом метаболизма метионина) усиливает окислительные

повреждения, инициирует гиперполяризацию мембран, образование пероксинитрита [Jin L. et al., 2007], повышение уровня общего цистеина и снижение содержания GSH [Parodi O. et al., 2007]. Высокие уровни данной аминокислоты вызывают повреждение эндотелиальных клеток артерий, ухудшение продукции и уменьшение биодоступности NO, окисление липопротеинов низкой плотности [Guillard J.C. et al., 2003], а также увеличение генерации АФК, активацию NF-κB, развитие эндотелиальной дисфункции и окислительного стресса [Weiss N., 2005]. Кроме того, гомоцистеин усиливает эффекты ЛПС в эндотелиальных клетках сосудов пуповины [Séguin C. et al., 2008], потенцирует его способность генерировать АФК через активацию NF-κB [Zhang Q. et al., 2001]. При этом уменьшение уровня данной аминокислоты через процессы транссульфурирования наблюдается под действием каталазы, СОД и α-токоферола [Vitvitsky V. et al., 2003].

ЛПС, взаимодействуя с моноцитами-макрофагами, нейтрофилами и клетками эндотелия, стимулирует избыточную продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1, ИЛ-6), изменяя коагуляционный гемостаз. Так, через 3–4 часа после введения данного фактора отмечается нарастание гиперкоагуляции, а через 1 сутки – развитие гипокоагуляционных изменений, которые сопровождаются ослаблением цитокинового каскада, индуцированного данным отоксином [Кузнецова Т.А., 2009].

Введение ЛПС приводит к потере массы тела, развитию метаболического ацидоза [Jozefowicz E. et al., 2007]. В сердце, легком и аорте отмечается усиление процессов ПОЛ [Liu Y.C. et al., 2009], а также уменьшение сократимости перфузируемого изолированного сердца, увеличение продукции NO [Jozefowicz E. et al., 2007], которое способствует активации апоптоза. Отмечается первоначальное увеличение содержания GSH и повышение активности GSH-пероксидазы в миокарде после введения ЛПС, а через 16 часов – уменьшение, тогда как уровень NO и пероксинитрита увеличивается через 4 часа и остается повышенным через 24 и 48 часов [Iqbal M. et al., 2002]. Однако через 5 суток после введения данного токсина содержание нитрат/нитритов снижается в плазме крови [Valenca S.S. et al.,

2008]. ЛПС вызывает повреждение ткани легкого [Huang X.L. et al., 2008] и почек [Coskun O. et al., 2005], снижение pO_2 в микроциркуляторном русле [Lutz C. et al., 1998], повышение уровня МДА, активности МПО, экспрессии внутриклеточных молекул адгезии-1 и иNOC [Jakubowski A. et al., 2009]. Выявлено, что ЛПС *Escherichia coli* (*E. coli*) в дозе 200 мкг/кг приводит к уменьшению напряжения кислорода (pO_2), снижению насыщения крови кислородом и рН крови в капиллярной сети слизистой оболочки тощей кишки, что способствует развитию гипоксических изменений в тканях [Knotzer H. et al., 2006].

Известно, что введение ЛПС в просвет толстого кишечника изменяет тоническую активность его афферентных волокон, следствием чего могут быть нарушения нервно-рефлекторных взаимосвязей в системе пищеварения [Морозова И.Л., Солтанов В.В., 2005]. Данный фактор также оказывает влияние на активность симпатических пре- и постганглионарных нейронов, на модуляцию висцеро-висцеральных рефлексов, на центральные и периферические звенья интероцептивных рефлексов желудка и кишечника [Гурин В.Н., 1993].

ЛПС инициирует развитие печеночной дисфункции, что способствует повышению уровней аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, общего билирубина, содержания нитрат/нитритов в плазме крови, а также увеличению провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, интерферон- γ) и снижению трансформирующего ростового фактора- β 1, ИЛ-4, уменьшению экспрессии Hsp70 [Tsaο C.M. et al., 2009]. Отмечается усиление процессов ПОЛ на фоне снижения активности GSH, СОД, GSH-пероксидазы, GSH-S-трансферазы, индукции экспрессии иNOC в печени [Payabvash S. et al., 2006; Ко К. et al., 2008].

Данный фактор влияет на механизмы нервной и гормональной регуляции организма. Его внутривенное введение в дозе 0,5 мкг/кг у кроликов через 1,5–2,0 часа приводит к повышению содержания адренокортикотропного гормона, кортизола, тиреотропного гормона, тиреоидных гормонов, антидиуретического гормона, активации кожных симпатических нервов, угнетению активности чревного нерва и сердечных ветвей [Гурин В.Н., Гурин А.В., 2004; Marca M.C. et al., 2009].

Введение данного токсина также увеличивает уровень 6-кето-простагландина (ПГ) F1 α , вызывает развитие гипералгезии, реализуемое за счет ингибирования продукции простаглицлина [Tunclan B. et al., 2006].

ЛПС в зависимости от дозы может вызывать различные эффекты со стороны системы терморегуляции [Romanovsky A.A. et al., 2005, Rudaya A.Y. et al., 2005]. При стандартных температурных условиях внутривенное введение относительно небольших доз (0,5 мкг/кг) данного фактора кроликам приводит к повышению температуры на 0,8–1,2 °С, развитию двухфазовой лихорадки, усилению процессов энергообмена за счет усиления потребления кислорода, повышению содержания глюкозы и свободных жирных кислот [Гурин В.Н., Гурин А.В., 2004; Romanovsky A.A. et al., 1998]. Повышение температуры окружающей среды приводит к усилению лихорадки за счет уменьшения кровотока в «оболочке» и снижения потоотделения. При низкой внешней температуре животные более чувствительны к действию данного токсина [Rudaya A.Y. et al., 2005], что способствует нарастанию температуры тела за счет усиления процессов химической терморегуляции [Гурин В.Н., Гурин А.В., 2004]. Введение больших доз (20 мг/кг и более) ЛПС кроликам при стандартных условиях вызывает эндотоксический шок, который сопровождается снижением температуры тела [Висмонт Ф.И., 2004]. Кроме того, введенные предварительно невысокие дозы данного токсина через 24 часа вызывают уменьшение чувствительности к последующей, более высокой дозе, и снижают развитие окислительного стресса [Xu D.X. et al., 2007].

ЛПС вызывает существенные изменения функционирования различных составляющих механизмов транспорта кислорода кровью. Так, в своих исследованиях N. Matsuda et al. [2002] показали, что внутривенное введение данного фактора (100 мкг/кг) кроликам вызывает нарушение гемодинамики и в дальнейшем – появление признаков гипоксии в тканях [James P.E. et al., 2003]. Установлено, что инъекция ЛПС *E. coli* через 60 и 120 минут способствует значительному снижению рО₂ артериальной крови, уменьшению оксигенации тканей слизистой оболочки тощей кишки и, соответственно, развитию тканевой

гипоксии [Schmidt W. et al., 1999]. Введение данного фактора также приводит к повреждению ткани легкого и, как следствие, ухудшению газового обмена (снижение pO_2 , увеличение напряжения углекислого газа (pCO_2)) и снижению pH в артериальной крови [Bachetti T. et al., 2003]. При его действии в почках отмечается также ухудшение микроциркуляции за счет снижения кровотока, нарушения доставки кислорода, уменьшения среднего значения pO_2 [Johannes T. et al., 2009]. В условиях гипоксии отмечается увеличение гематокрита, повышение вязкости крови, увеличение уровня нитрат/нитритов, при этом уменьшается и диаметр артериол, ухудшается кровоток и капиллярное кровообращение [Bertuglia S. et al., 2008]. ЛПС, введенный крысам в дозе 10 мг/кг, снижает концентрацию гемоглобина, содержание эритроцитов и стимуляцию эритропоэза, индуцированные дарбопоэтином [Brendt P. et al., 2009].

Установлена роль свободных радикалов азота и кислорода в патогенезе ЛПС-индуцированной эндотоксемии [Саникидзе Т.В. и др., 2006]. Данными авторами показано, что через 18 ч после интраперитонеального введения ЛПС *E. coli* (0,25 мг/кг) у мышей отмечается активация образования АФК и NO, способствующая развитию окислительного стресса, инактивации ферментов (рибонуклеотидредуктазы, NADH: убихиноноксидредуктазы, цитохром С оксидазы), нарушению функционирования электронно-транспортной цепи митохондрий, снижению pH крови, что, по их мнению, может влиять на проявление эффекта Бора и обуславливать уменьшение СГК, в то же время, в крови отмечается инактивация системы церулоплазмин- Fe^{3+} -трансферрин, обладающей способностью к нейтрализации АФК и удалению из сыворотки крови таких мощных промоторов свободнорадикального окисления, как ионы Fe^{2+} .

Выявлены единичные сведения о состоянии КТФ крови и проокислительно-антиокислительного баланса организма при развитии лихорадки, вызванной относительно небольшими дозами ЛПС *Salmonella typhi*. Так, внутривенное введение данного фактора кроликам-самцам в дозе 0,6 мкг/кг приводило к повышению ректальной температуры, ухудшению кислородсвязывающих свойств крови, сдвигу кривой диссоциации оксигемоглобина

(КДО) вправо и уменьшению индекса деформируемости эритроцитов [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1997]. Внутримышечная инъекция данного токсина крысам вызывала развитие умеренного метаболического ацидоза, ухудшение кислородного обеспечения, а также увеличение оснований Шиффа (ОШ) совместно со снижением факторов АОС (α -токоферол и каталаза) в эритроцитах крови и тканях (сердце, почки, печень) [Зинчук В.В., 2005].

Таким образом, отмечается большое разнообразие эффектов ЛПС на организм, которые отражают развитие существенных изменений со стороны различных функциональных систем. Однако до настоящего времени многие аспекты окислительных повреждений, функционирования механизмов транспорта кислорода кровью, вызванных действием данного фактора, в случае использования существенных доз на протяжении 5 суток изучены недостаточно, что предопределяет интерес к данной проблеме, а также поиск средств регуляции КТФ крови.

1.2 Механизмы развития окислительного стресса, индуцированного липополисахаридным эндотоксином

АФК образуются при нормальном клеточном метаболизме. К ним относятся радикалы кислорода: O_2^{*-} , OH^* , RO_2^* и RO^* и некоторые нерадикалы, являющиеся сильными окислителями или легко превращающиеся в радикалы. Главным источником кислородных радикалов является дыхательная цепь митохондрий. АФК могут легко реагировать с макромолекулами (липиды, белки и ДНК), вызывая их повреждение. Непрерывное окислительное повреждение ведёт к цитотоксичности и последующему развитию различных патологических состояний. Аэробные организмы выработали систему ферментативных и неферментативных механизмов защиты против повреждения АФК. В клетках существует равновесие между выработкой свободных радикалов и факторами антиоксидантной защиты, т.е. прооксидантно-антиоксидантное равновесие [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999]. Когда выработка АФК превышает возможности клеточных антиоксидантов, возникает окислительный стресс. Хотя радикалы обычно считают

токсичными побочными продуктами митохондриального дыхания, известны и их полезные функции для организма [Barja G., 1993]. Кроме того, недавно была признана роль H_2O_2 как внутриклеточного мессенджера, влияющего на клеточные процессы, включая фосфорилирование белков, транскрипцию и апоптоз [Rhee S.G., 1999]. H_2O_2 может проникать через клеточные мембраны, а внутри клеток реагировать с Fe^{2+} или Cu^{2+} по реакции Фентона, образуя активную форму OH^* [Halliwell B., Gutteridge J.M.S., 1999].

АФК участвуют в механизме токсичности ЛПС, в частности, в активации NF- κ B [Brandes R.P. et al., 1999; Basilico N. et al., 2003]. В его регуляции участвуют каскады фосфорилирования и дефосфорилирования, а также факторы редокс-статуса клетки [Srisook K., Cha Y.N., 2004]. Роль АФК в передаче сигналов, ведущих к активации NF- κ B, подтверждает то, что большинство активирующих NF- κ B агентов вызывают образование радикалов; прямая обработка окислителями, такими как H_2O_2 , активирует NF- κ B в некоторых клетках даже в отсутствие всякого физиологического стимула [Meyer M., Schreck R., 1993]; активация NF- κ B может блокироваться воздействием на систему митохондриального транспорта электронов [Schulze-Osthoff K., Beyaert R., 1993]. α -ФНО (сильный активатор NF- κ B) индуцирует образование O_2^{*-} (супероксидного аниона) в митохондриях [Baud O., Haynes R.F., 2004]. Высвобождаемый при воспалении OH^* активирует нейтрофилы и макрофаги, тем самым заставляя их высвобождать O_2^{*-} вследствие активации мембранной НАДФ*Н-оксидазы [Wingler K., Wunsch S., 2001], что является частью защитного механизма против вторгающихся микробных патогенов [Perng W.C., Wu C.P., 2004].

Введение больших доз ЛПС на протяжении 24 часов приводит к развитию окислительного стресса [Victor V.M. et al., 2005] вследствие нарушения сбалансированности прооксидантной и антиоксидантной систем [Зенков Н.К. и др., 2001; Лушак В.И., 2001]. Этот процесс является универсальным механизмом повреждения клетки и характеризуется увеличением внутриклеточной генерации АФК [Болдырев А.А., 2001], которые выступают в роли повреждающего агента и, благодаря высокой реакционной способности на фоне истощения АОС, приводят к

окислительным модификациям биомолекул, изменению активности ферментных систем, нарушению структуры биомембран [Меньщикова Е.Б. и др., 2006; Дубинина Е.Е., 2001]. При этом ухудшаются гемореологические показатели (относительная вязкость крови, динамическая вязкость крови при различных стандартных градиентах сдвига, индекс деформируемости эритроцитов) в микроциркуляторном русле, обусловленные активацией процессов ПОЛ и угнетением АОС [Рожкова Е.А. и др., 2007]. В условиях окислительного стресса избыточная генерация АФК влияет на митоген-активируемые протеинкиназы JNK и p38, активация которых воздействует на провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ФНО- α), свободные радикалы, регулирует апоптоз путем фосфорилирования и активации фактора транскрипции p53 и проапоптотических белков семейства Bcl-2, а также p38 активирует NF- κ B в ответ на стресс [Рязанцева Н.В. и др., 2009].

При окислительном стрессе, индуцированном ЛПС, наблюдается увеличение уровня малонового диальдегида (МДА), нитрат/нитритов, а также отмечается снижение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза (СОД), глутатион (GSH)-пероксидаза, миелопероксидаза (МПО) и каталазы) [Kanter M. et al., 2005; Guler G. et al., 2008]. Развивающиеся окислительные повреждения при действии ЛПС вызывают уменьшение толщины поверхности эндотелия, обуславливая нарушения структуры гликокаликса сосудистого русла и развитие эндотелиальной дисфункции, которая приводит к ухудшению микроциркуляции и снижению оксигенации тканей [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002]. Высказываются разные мнения о развитии сосудистой дисфункции как в результате прямого действия данного фактора на эндотелий, так и вторичного, за счет высвобождающихся цитокинов (ФНО- α , ИЛ- β) [Dauphinee S.M., Karsan A., 2006].

Известно, что больные сепсисом имеют высокие концентрации маркеров окислительного повреждения и низкое содержание антиоксидантов в плазме, в том числе аскорбината [Victor V.M. et al., 2001]. На разных моделях с животными было доказано, что антиоксиданты полезны для снижения тяжести окислительного стресса, вызываемого эндотоксином в различных

тканях. Введение эндотоксина морским свинкам, лишённым способности эндогенно синтезировать витамины С и Е, усиливает окислительное повреждение белков печени, а при добавлении витамина С (одного или в сочетании с витамином Е) уровень аскорбината в печени увеличивается и полностью предотвращается её повреждение [Cadenas S., Rojas C., 1998]. В сердце морских свинок эндотоксин значительно снижает уровень аскорбината даже у животных с добавками витамина С, а витамин Е защищает от активации ПОЛ [Rojas C., 1996].

У крыс, получавших ЛПС, предварительное введение природного, водорастворимого антиоксиданта апоцинина (специфический ингибитор НАДФ*Н-оксидазы) предотвращает подъём уровней маркеров окислительного повреждения в сердце и увеличивает выживание животных [Ben-Shaul V., Lomnitski L., 2001]. Низкие дозы N-ацетилцистеина, предшественника GSH, также защищают лёгкие крыс от опосредуемого эндотоксином окислительного стресса и снижают смертность, хотя его высокие дозы смертность увеличивают [Sprong R.C., Winkelhuysen-Janssen A.M., 1998]. Кроме того, было показано, что N-ацетилцистеин снижает выработку свободных радикалов *in vitro* в макрофагах мышей, обработанных летальной дозой эндотоксина [Zhang H., Sparen H., 1994]. Витамин Е, β -каротин и N-ацетилцистеин, кофермент Q₁₀ и кверцетин [Abd El-Gawad H.M., Khalifa A.E., 2001] защищают мозг крыс от вызываемого ЛПС окислительного стресса. Мелатонин полностью предотвращает активацию ПОЛ в инкубированных с ЛПС гомогенатах тканей печени и лёгких и частично в мозгу [Sewerynek E., 1995]. Мелатонин также предотвращает развитие циркуляторной недостаточности у крыс с эндотоксемией и улучшает выживание мышей, получавших летальные дозы ЛПС [Ben-Shaul V., Lomnitski L., 2001]. Предварительное введение флавоноидного антиоксиданта кверцетина ингибирует высвобождение α -ФНО макрофагами, обработанными ЛПС [Wadsworth T., McDonald T.I., 2001]. Однако антиоксидантная терапия не всегда изменяет степень окислительного повреждения у кроликов с септицемией [Peng W.C., Wu C.P., 2004]. Эти результаты показывают, что антиоксидантные факторы могут быть полезными для профилактики вызываемого эндотоксином окислительного

повреждения и поэтому имеют большое значение для создания средств коррекции таких состояний [Hsu D.Z., Liu M.Y., 2004].

Фактор транскрипции NF- κ B регулирует высвобождение ряда цитокинов и иных медиаторов воспаления, которые в отсутствие контроля способны вызывать септический шок. К внутриклеточным событиям, ведущим к его активации, относятся фосфорилирование и протеолитические реакции; они, видимо, контролируются редокс-состоянием клеток [Didion S.P., Kinzenbaw D.A., 2004]. NF- κ B активируется прооксидантным состоянием клеток и потенциально ингибируется антиоксидантами.

Разные по структуре антиоксиданты угнетают активацию NF- κ B в ответ на большинство индуцирующих факторов как *in vivo*, так и *in vitro* [Schreck R., Meier B., 1992b]. Чрезмерная экспрессия эндогенных факторов антиоксидантной защиты угнетает активацию NF- κ B, а α -ФНО его активирует и снижает уровни внутриклеточных тиолов. Однако N-ацетилцистеин (антиоксидант) предотвращает вызываемое α -ФНО снижение уровней внутриклеточных тиолов и блокирует его активацию в клетках [Staal F.G., Roederer M., 1990]. Он, и восстановленный GSH защищают от токсичности ЛПС и ингибируют рост уровней α -ФНО у мышей, получавших ЛПС [Peristeris P., Clark B.D., 1992], что предполагает ключевую роль внутриклеточных тиолов в контроле активности NF- κ B. Введение эндотоксина вызывает окислительный стресс в лёгочной ткани у крыс и активацию NF- κ B, а N-ацетилцистеин может ингибировать эту активацию *in vivo* [Blackwell N.S., Holden E.P., 1996]. N-ацетилцистеин прямо реагирует с АФК, а также восполняет внутриклеточное содержание цистеина, необходимого для выработки восстановленного GSH – главного внутриклеточного тиола и гасителя свободных радикалов, имеющегося у всех эукариотных форм жизни.

Ингибировать активацию NF- κ B *in vitro* могут и другие антиоксиданты, в том числе производные витамина E, тиольные антиоксиданты (дитиокарбаматы), α -липоевая кислота, фенольные антиоксиданты, селен (интегральный компонент GSH-пероксидазы), гасители свободных радикалов – диметилсульфоксид и S-аллилцистеин [Cadenas S., Cadenas A.M.,

2002]. Антиоксидантные ферменты также ингибируют активацию NF- κ B и посредством этого угнетают выработку монооксида азота (NO) в стимулированных ЛПС макрофагах [Han Y.J., Know Y.G., 2001].

У трансгенных мышей с чрезмерной экспрессией человеческой внеклеточной и внутриклеточной GSH-пероксидазы после введения большой дозы ЛПС обнаруживают сниженную чувствительность к эндотоксиновому шоку, слабовыраженную гипотензию и более высокую выживаемость [Mirochnitchenko O., Prokopenko O., 2000]. Мыши с нехваткой GSH-пероксидазы имеют повышенные уровни окисленного GSH – маркера окислительного повреждения и токсичности для клеток печени на галактозамин-эндотоксиновой модели острой печёночной недостаточности [Heller A.R., Groth G., 2001]. Интересно, что эндотоксин и α -ФНО повышают содержание марганецсодержащей СОД (Mn-SOD) в эндотелиальных клетках [Jaeschke H., Ho Y.S., 1999]. Рост уровней Mn-SOD может вносить вклад в защитное действие эндотоксина против токсичности кислорода для этих клеток, что демонстрирует способность эндотелиоцитов создавать антиоксидантную защиту в ответ на индуктор окислительного повреждения. Исследования с трансгенными мышами не дают окончательного вывода о возможном полезном действии антиоксидантов при септическом шоке [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002].

У больных сепсисом с полиорганной недостаточностью выявлено значимое снижение содержания витамина С, хотя между тяжестью дисфункции органов и уровнями токоферола тесная связь не всегда наблюдалась [Borelli E., Roux-Lombard P., 1996]. Другие авторы установили, что у больных сепсисом, по сравнению со здоровым контролем, снижены концентрации не только витамина С, но также ретинола (витамина А), витамина Е, каротина и ликопена и повышены уровни ТБК-реактивных продуктов в плазме, что отражает активацию ПОЛ [Goode H.F., Cowley H.C., 1995]. Такое снижение факторов антиоксидантной защиты указывает на возможные пути коррекции этой патологии путём использования антиоксидантов. Известно, что витамины С и Е синергически действуют как *in vitro*, так и *in vivo* [Cadenas S., Rojas C., 1998]. Витамин Е защищает от избыточной активности

ПОЛ путём выработки токоферольных радикалов, которые реагируют с витамином С и последующей регенерацией витамина Е.

В плазме крови больных сепсисом выявлены повышенные концентрации нитратов и нитритов ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) – продуктов превращений NO [Evans T., Carpenter A., 1993]. После введения эндотоксина или провоспалительных цитокинов происходит снижение тонуса сосудов, что свидетельствует об участии NO в генезе сердечно-сосудистых изменений при септическом шоке [Viridis A., Colucci R., 2005]. В физиологических системах NO синтезируется из L-аргинина различными изоферментами NO-синтазы [Moncada S., Higgs E.A., 1993]. Две из них экспрессируются конститутивно (эNOC, или NO-синтаза типа III – в эндотелиальных клетках, а нейрональная NO-синтаза, или NO-синтаза типа I – в нейронах), а экспрессия третьей (иNOC, или NO-синтаза типа II) индуцируется в различных клетках продуктами грамотрицательных (эндотоксин) и грамположительных бактерий [Проскуряков С.Я. и др., 2005]. Известно, что эNOC и нейрональная NO-синтаза кратковременно активируются в ответ на подъём внутриклеточных уровней Ca^{2+} и участвуют в регуляции физиологических функций [Гурин А.В., 1997; Гомазков О.А., 2000], тогда как иNOC экспрессируется и непрерывно активна во время воспаления, участвует в защите организма от патогенов [Yerer M.B., Yapislar H., 2004]. При активации иNOC отмечается тенденция к продукции большого количества NO в клетках, что обеспечивает противовоспалительную роль, угнетает бактериальную инфекцию, вызывает резистентность к вирусам и усиливает рекрутирование лейкоцитов.

NO, вырабатываемый эNOC, является важным регулятором тканевого кровотока и играет существенную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы, поддерживая сосудистый тонус, защищая интиму от адгезии тромбоцитов и лейкоцитов, предотвращая пролиферацию гладких мышц. При септическом шоке высвобождение NO повышено в связи с эффектами циркулирующих пептидов, адгезией нейтрофилов к эндотелию и активацией иNOC в эндотелии и тканях медиаторами воспаления, такими как α -ФНО и цитокины

[Ковальчук Л. В., 2003]. NO вызывает вазодилатацию, и в то же время усиливает митохондриальную выработку АФК, которые окисляют мембранные фосфолипиды, что может изменять текучесть мембран и вести к потере целостности клеток. При реакции NO и O_2^{*-} образуется пероксинитрит ($ONOO^-$) – мощный окислитель, способный нитровать белки, нарушая тем самым активность различных митохондриальных ферментов, что приводит к снижению выработки энергии и функциональной недостаточности органов [Vodovotz Y., Chesler L., 1999]. Массивное высвобождение NO при эндотоксемии вносит вклад в изменение функционирования сердечно-сосудистой системы, в том числе, в развитие гипотензии и снижение периферического сопротивления [Виноградов Н.А., 1998].

Эндотоксин усиливает образование NO за счёт активации конститутивной и iNOC [Liu S., Adcock I.N., 1993]. Мыши с дефицитом iNOC более устойчивы к вызываемым эндотоксином повреждениям [Wei X.Q., Charles I.G., 1995]. Это предполагает её важную роль в септическом шоке. NO является ингибитором экспрессии фермента NOS по принципу отрицательной обратной связи [Han Y.J., Know Y.G., 2001]. Эффект NO на активацию NF- κ B окончательно не ясен. С одной стороны, NO ингибирует его активацию, стабилизируя ингибиторную субъединицу NF- κ B или предотвращая его связывание с ДНК [Matthews J.R. et al., 1996]; с другой стороны, NO активирует NF- κ B в клетках путём усиления активности тирозинфосфатаз, за счёт нитрозирования внутриклеточного сигнального белка p21ras [Connelly L. et al., 2001]. Анализируя эти противоречивые данные, следует учитывать физиологическую концентрацию NO в тканях. Connelly L. et al. [2001] показали, что NO осуществляет двухфазную регуляцию активности NF- κ B в зависимости от его местной концентрации.

Ингибирование NO-синтазы пытались применять как метод коррекции вызываемых эндотоксином гипотензии и нарушения функции сердца у разных животных [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002]. Использовали, в частности, производные предшественника NO L-аргинина. На модели сепсиса было показано, что N^G -метил-L-аргинин способен в ряде случаев [Evans T. et al., 1993] снижать смертность у мышей. Kilbourn R. G. et al. [1990] выявил

гипотензию, вызываемую введением α -ФНО у анестезированных собак. Другие авторы показали, что N^G -метил-L-аргинин не оказывает полезного действия при вызываемом α -ФНО угнетении сердечной деятельности [Quezado Z.M.N., Karzai W., 1998], а N^G -амино-L-аргинин даже увеличивает смертность собак при эндотоксемии, несмотря на повышенное сосудистое сопротивление [Cobb J.P., Natanson C., 1992]. Предполагается, что при эндотоксиновом шоке может быть целесообразным избирательное ингибирование иNOC, а не ингибирование как конститутивной, так и иNOC [Nava E., Ralmer R.M., 1991]. Другой селективный ингибитор иNOC – сульфат S-метилизотиомочевина – оказывает защитное действие и улучшает выживаемость мышей, получавших ЛПС [Scabo C., Southan G.J., 1994]. Выявлено, что эндотоксин ингибирует образование NO эNOC, в то же время введение NO снижало повреждающее действие ЛПС на микроциркуляцию в печени в начале эндотоксемии [Gundersen Y., Corso S.O., 1998].

Результаты исследований на животных показывают вариабельность данных по септическому шоку, очевидно, в связи с различиями доз ингибиторов и используемых моделей [Petros A., Bennett D., 1991]. Поскольку у NO выявлены и про- и противовоспалительные эффекты [Connolly L., Palacios-Callender M., 2001], вероятно, что его роль в усилении или угнетении воспалительного ответа определяется стадией, на которой вводятся ингибиторы NO-синтазы и достигаемой местной концентрацией NO. Эти результаты требуют дальнейшей оценки механизмов коррекции L-аргинин-NO системы при окислительном стрессе.

1.3 Участие L-аргинин-NO системы в изменениях, индуцированных липополисахаридом

NO – физиологически активная молекула, которая является универсальным регулятором многих функций в организме [Ванин А.Ф., 2001; Kim-Shapiro D.V. *et al.*, 2006]. Её образование происходит из аминокислоты L-аргинин под действием NO-синтазы с участием никотинамидадениндинуклеотида (НАД(Ф)Н) и ряда других кофакторов. Дифференцируют

конститутивные изоформы (эндотелиальная и нейрональная), которые зависят от концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и под их влиянием продуцируется небольшое количество NO [Fleming I., Busse R., 2004], а также иNOC, при повышении экспрессии которой под действием ряда факторов (в частности ЛПС) продуцируется в сотни раз большее количество NO (таблица 1.1). Внутрисосудистая доступность NO управляется, главным образом, равновесием между синтезирующим NO эндотелием и его инактивирующими эритроцитами. NO, вырабатываемый в сосудистом эндотелии, прежде чем достичь гемоглобина в эритроците, преодолевает следующие барьеры: мембрана эндотелиальных клеток; бесклеточная зона на сосудистом краю мигрирующего "столбика" эритроцитов, создаваемая градиентами скорости кровотока; неперемешиваемый слой крови вокруг движущихся эритроцитов и их мембрана (рисунок 1.2). Данная молекула влияет в организме на разнообразные физиологические процессы, которые реализуются на уровне сердечно-сосудистой системы, ангиогенеза [Singh J.P., 2007], ЦНС [Kim S.W., Lee J.K., 2007], КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса [Зинчук В.В., 2003] и т. д. Выявлено, что эндотелиальные клетки являются основным источником продукции NO, который участвует в регуляции сосудистого тонуса, опосредуя влияние эндотелий-зависимых вазодилататоров (ацетилхолина, брадикинина, гистамина) и препятствуя чрезмерному воздействию вазоконстрикторов (ангиотензина-II, тромбоксана A_2) [Марков Х.М., 2001]. Кроме того, NO, продуцируемый эндотелием, оказывает влияние на микроциркуляцию, реологические свойства крови, количественный и качественный состав эритроцитов, определяющий вязкость крови [Киричук В.Ф. и др., 2008]. Данная молекула может оказывать и регуляторное влияние на деформируемость и агрегацию эритроцитов при эндотоксемии [Korbut R., Gryglewski R.J., 1996].

Известно, что L-аргинин-NO система участвует в развитии различных нарушений, вызванных действием ЛПС. Так, отмечается снижение активности эNOC [Huang X.L. et al., 2008], в то время как повышение экспрессии иNOC, индуцированное этим токсином, способствует продукции большого количества

Таблица 1.1 Характеристика основных изоформ NO-синтаз [Huang P.L., 2009]

Общепринятое название	Нейрональная NO-синтаза (nNOS)	Индуцибельная NO-синтаза (iNOS)	Эндотелиальная NO-синтаза (eNOS)
Тип клеток, в которых они вырабатываются	Нейроны	Макрофаги	Эндотелиальные клетки
Хромосомы	12	17	7
Характер экспрессии	Конститутивная	Индуцибельная	Конститутивная
Внутриклеточная локализация	Цитоплазма, сарколема	Цитоплазма	Мембраносвязанная
Локализация	N-терминал PDZ домена	Нет данных	N-терминал аминокислоты
Регуляция	Кальций-кальмадулин	Транскрипция	Кальций-кальмадулин фосфорилирование
Интенсивность образования	Умеренная (нМ-μМ)	Высокая (μМ)	Низкая (рМ-пМ)
Функция	Сигнальная	Цитотоксичность	Сигнальная
Эффекты	Обучение, память. Нейротрансмиссия. Вегетативные функции.	Воспаление. Иммунологическая защита.	Вазодилатация. Клеточная пролиферация. Адгезия лейкоцитов. Тромбоз.
Характеристика «фенотипа» нокаутированных мышей	Нормальное формирование ЦНС. Пилорический стеноз. Уменьшение вероятности инсульта.	Чувствительность к инфекциям. Устойчивость к развитию гипотонии при септическом шоке.	Отсутствие эндотелиального фактора релаксации сосудов. Гипертония. Усиление сосудистого ответа на повреждение. Интенсификация атеросклероза.

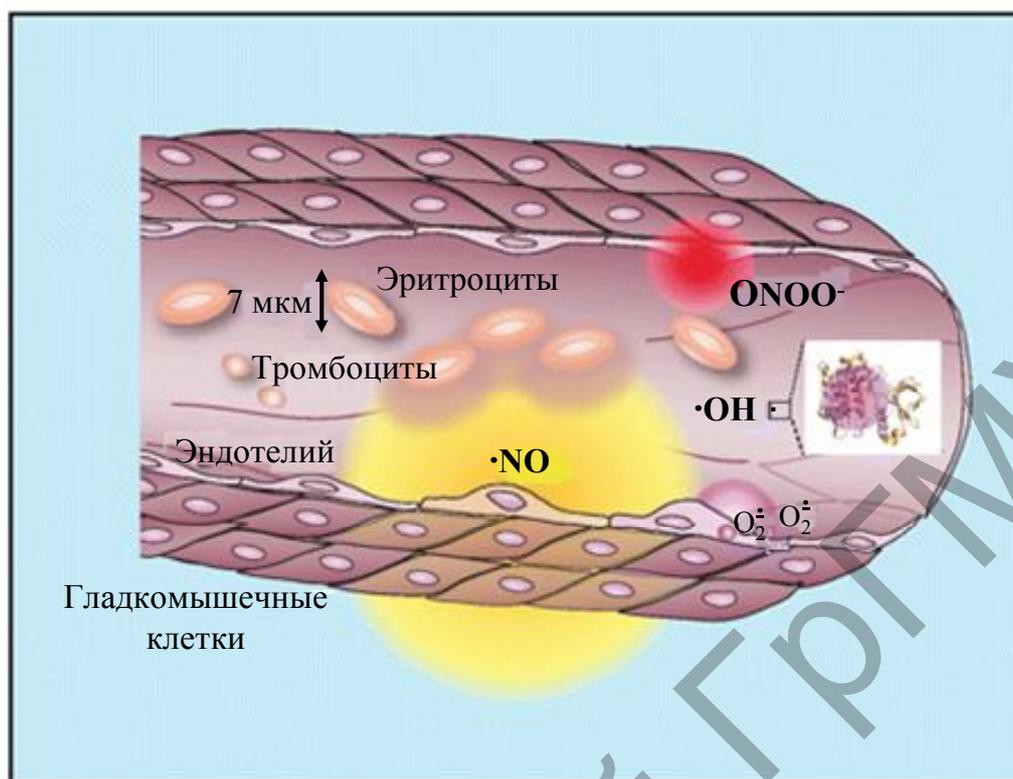


Рисунок 1.2 - Характеристика NO и его производных в сосудистой системе [Pacher P., et al., 2007]

NO, что приводит к развитию эндотелиальной дисфункции и повреждению ряда органов [Eum H.A. et al., 2007].

В результате активации iNOS продуцируется большое количество NO, чем за счет действия конститутивной изоформы NO-синтазы, обладающего цитотоксическим, продолжительным по времени действием (рисунок 1.3). Установлено, что увеличение продукции NO в результате действия конститутивной изоформы NO-синтазы наблюдается непосредственно после введения ЛПС, достигая плато через 9 мин., и затем снижается, тогда как последующее постепенное повышение генерации NO, индуцированное iNOS – через 45 минут, однако суммарное содержание нитрат/нитритов стабильно увеличивается в течение всего периода [Bowen O.T. et al., 2007]. Отмечается, что генерация NO на ранних и поздних этапах эндотоксемии не связана с концентрацией L-аргинина. Так, плазменный уровень данной аминокислоты уменьшается через 12 часов, тогда как в продукции NO выделяется 2 пика: через 4 и 12 часов после введения ЛПС [Braulio V.B. et al., 2004].

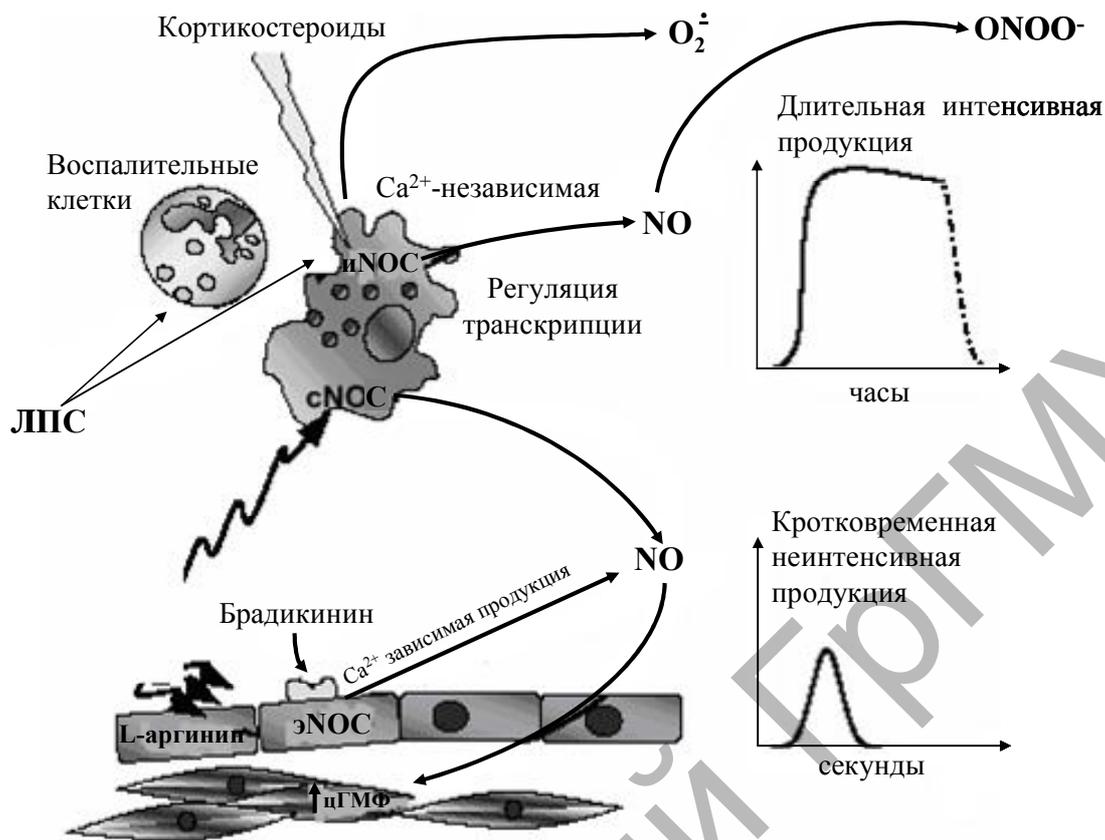


Рисунок 1.3 - Сравнительная характеристика эффектов NO, продуцируемого эндотелиальной и индуцибельной изоформами NO-синтаз [Guzik T.J at al., 2003]

Следует отметить, что конститутивная изоформа NO-синтазы обеспечивает защитный эффект в организме при различных состояниях. Так, после введения ЛПС повышение экспрессии эNOC и продукция ею NO уменьшают развитие окислительного стресса в сердечной мышце, увеличивают чувствительность миофиламентов к ионам кальция, что улучшает функцию миокарда [Ichinose F. et al., 2008], подавляет вызванную данным токсином индукцию Hsp60 и Hsp10 [Kim S.W., Lee J.K., 2007].

Известно, что инъекция ЛПС приводит к усилению активности процессов ПОЛ, снижению уровня «ловушек» свободных радикалов, увеличению провоспалительных цитокинов и продукции NO [Sakaguchi S., 2004], модулирует доставку GSH, защищающего печень от окислительного стресса [Payabvash S. et al., 2006].

Свободнорадикальные и цитотоксические эффекты NO определяются его способностью реагировать с различными соединениями. Так, эндотоксемия связана с повышением уровня NO, увеличением генерации свободных радикалов (супероксид-аниона), при взаимодействии которых образуется мощный окислитель – пероксинитрит [Wang W. et al., 2003]. Формирование данного соединения наблюдается также при увеличении уровня гомоцистеина [Jin L. et al., 2007]. Следует отметить, что при гипергомоцистеинемии продукция NO может как повышаться, так и снижаться [Zhang X. et al., 2000]. Выявлено, что в культуре гладкомышечных клеток сосудов данная аминокислота способствует активации иNOC и NF-kB [Welch G.N. et al., 1998; Carluccio M.A. et al., 2007]. В то же время при гипергомоцистеинемии отмечается не прямое подавление активности эNOC и уменьшение её способности генерировать NO [Zhang X. et al., 2000]. После введения L-аргинина уровень гомоцистеина снижается, а биодоступность NO повышается [Cassone Faldetta M. et al., 2002].

Данная молекула является важным медиатором действия ЛПС путем активации экспрессии иNOC [Soszynski D., Chelminiak M., 2007]. Для уменьшения повреждающего действия ЛПС используют различные средства, изменяющие активность этого фермента. Так, введение дексаметазона и L-аргинина снижает экспрессию иNOC, уменьшает уровни ФНО- α , ИЛ-1 β , интерферона- γ и нитрат/нитритов, увеличивает экспрессию белка Hsp70 в печени [Chatterjee S. et al., 2007]. Установлено, что после введения N^G-нитро-L-аргинина наблюдается уменьшение потребления кислорода, минутной вентиляции в течение 30-минутной гипоксии в условиях введения ЛПС *E. Coli*, что указывает на влияние эNOC на респираторные механизмы контроля дыхания [Ladino J. et al., 2007]. Выявлено, что ингибирование NO-синтаз предотвращает вызванное данным токсином уменьшение уровня GSH, активности GSH-пероксидазы и GSH-S-трансферазы в печени и плазме крови [Rayabvash S. et al., 2006].

Применение селективного ингибитора иNOC, аминоксидина (АГ) уменьшает токсический отек легких, вызванный фосгеном [Торкунов П.А., Шабанов П.Д., 2009].

Выявлено, что введение АГ приводит к нормализации скорости выведения нитрат/нитритов, к восстановлению эндотелий-зависимой реакции, активности эНОС и растворимой гуанилатциклазы при дисфункции эндотелия [Медведева Н.А. и др., 2005], что оптимизирует процессы оксигенации тканей. Установлено, что АГ, введенный за 30 минут до ЛПС, снижает продукцию NO в бронхоальвеолярной жидкости и уменьшает бронхоконстрикцию, вызванную гистамином [Jiang H.N. et al., 2008]. Известно, что данный токсин усиливает активность свободнорадикальных процессов при ишемии-реперфузии, в то время как АГ снижает активность МПО, уровень МДА в крови и ткани печени, уменьшая окислительные повреждения [Yaylak F. et al., 2008]. Отмечается, что АГ подавляет вызванную ЛПС активацию NF- κ B, продукцию цитокинов и NO в гепатоцитах и в купфферовских клетках [Aoki K. et al., 2008], предупреждает усиление активности процессов ПОЛ в сердце, легких, почках и мозге через NO-зависимые механизмы [Tuncan B. et al., 2006]. Данный ингибитор иНОС после введения ЛПС также предотвращает развитие лихорадочной реакции [Soszynski D., Chelminiak M., 2007], ухудшение сосудистого ответа на фенилэфрин и ацетилхолин [Ismailoglu U.B. et al., 2001], снижает в плазме уровень нитрат/нитритов, концентрацию простагландина E₂, циклооксигеназу-2 в печени, легких, аорте и лимфоцитах [Shen K.P. et al., 2007].

Получены данные о том, что использование селективного ингибитора иНОС (N⁶-(1-iminoethyl)-L-lysine hydrochloride) при эндотоксемии, вызванной наложением лигатуры на толстый кишечник с последующей перфорацией, способствует повышению рН в артериальных сосудах, улучшению структуры и увеличению скорости движения эритроцитов, повышению насыщения крови кислородом, что вызывает улучшение доставки и потребления кислорода тканями через 5 часов [Bateman R.M. et al., 2008], а также предупреждает повреждение ткани легкого и ухудшение газового состава крови [Ceran S. et al., 2008]. Выявлено, что внутривенное введение АГ (100 мг/кг) у крыс уменьшает развитие гипотензии и метаболического ацидоза, индуцированных ЛПС-токсином в дозе 100 мг/кг [Pedoto A. et al., 2002]. В условиях моделирования пирогеналовой лихорадки

путем внутривенного введения кроликам ЛПС *Salmonella typhi* (0,6 мкг/кг) ингибирование NO-синтазы с помощью N^G-нитро-L-аргинина приводит к снижению гипертермического эффекта, улучшению показателей КТФ крови и снижению индекса деформируемости эритроцитов [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1997]. Коррекция L-аргинин-NO системы у крыс с предварительно повышенным СГК (цианат натрия) после внутримышечного введения ЛПС *Salmonella typhi* (0,1 мг/кг) не оказывает значительного влияния на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса [Зинчук В.В., 2005].

Как видим, ЛПС через O₂ и NO-зависимые механизмы влияет на различные функции организма. Однако до настоящего времени вопросы коррекции окислительных повреждений, нарушений процессов транспорта кислорода кровью, вызванных действием данного токсина, особенно в случае массивных доз, на протяжении относительно длительного периода времени изучены недостаточно, что предопределяет интерес к этой проблеме, а также поиск средств коррекции.

ГЛАВА 2. ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ МОДУЛЯЦИИ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ И АНТИОКСИДАНТНЫХ МЕХАНИЗМОВ

2.1 Окислительный стресс и L-аргинин-NO система

Процессы перекисного окисления липидов инициируются первичным свободным радикалом, достаточно активным, чтобы отнять атом водорода от активной метиленовой группы ненасыщенных жирных кислот [Фридович И.Т., 1979]. Затем липидный радикал захватывает кислород, образуя ROO^* , которые могут соединяться друг с другом или атаковать мембранные белки и также способны отнимать водород от соседних боковых цепей жирных кислот мембраны, тем самым распространяя цепную реакцию ПОЛ [Barja G., 1993]. Существенно, что единственное событие инициации может привести к превращению сотен боковых цепей жирных кислот в моногидроперекиси липидов [Rice-Evans C.A., Diplock A.T., 1991]. Этот процесс распространения может многократно повторяться. Индуцирование ПОЛ может усиливаться до тех пор, пока имеются кислород и ненасыщенные жирные кислоты [Владимиров Ю.А., 1998]. Наличие в мембране антиоксидантов обрыва цепи может прерывать фазу распространения: перехват данным антиоксидантом может привести к радикальной форме, способной реагировать с другим пероксильным радикалом с его последующей ликвидацией (например, при димеризации) или может регенерировать как действующий антиоксидант в реакции с третьей молекулой [Метелица Д.И., 1982].

Гидроперекиси липидов – довольно стабильные при физиологических условиях молекулы, но ряд факторов (переходные металлы, их комплексы) может катализировать их окисление, которое способно инициировать новые циклы ПОЛ и распространять цепные радикальные реакции далее, тем самым усиливая первоначальное повреждение [Владимиров Ю.А., 1998; Донскова Ю.С. и др., 2004]. Расщепление углеродных связей при реакциях ПОЛ ведёт к образованию алканалей МДА, которые взаимодействуют с тиоловыми группами белков, перекрестно

сшивают аминокислотные группы белков и липидов и вызывают образование: хромолипидов и агрегированных белков; алкеналей (4-гидроксиноненаль), являющихся весьма физиологически активными (ингибиторы агрегации тромбоцитов, активаторы аденилатциклазы, субстрат для GSH-трансфераз); алканов (пентан и этан как конечные продукты окисления линолевой и арахидоновой кислот) [Биленко М.В., 1989; Anderson M.T. et al., 1994]. Образование высокоактивных радикалов кислорода ведёт к первичным реакциям непосредственно в месте образования. Вторичные продукты перекисного окисления (липипероксильные радикалы и гидроперекиси липидов) могут диффундировать к соседним молекулам, иницируя следующие реакции, тем самым распространяя повреждение, вызывая изменение структурной и функциональной целостности мембраны, её текучести и проницаемости и, в конечном итоге, нарушая клеточные функции [Григлевски Р.Е., 1997; Halliwell B., Gutteridge J.M.S., 1999]. Кроме того, основными мишенями свободнорадикальных атак как внутри, так и вне клеток, могут быть белки, что в случае ферментов может иметь значимо выраженный эффект [Liu X. et al. 1998].

За физиологические последствия окислительного воздействия в большой мере отвечают химические модификации белков-мишеней, которые могут быть связаны как с необратимой, так и с обратимой потерей функции белков [Go Y.M. et al., 1999]. Необратимая потеря функции белков вследствие окислительного стресса является важным отличительным признаком старения и патологических состояний [Aruoma O.I., Cuppett S.L., 1997]. Атака белков АФК и активными формами азота (АФА) потенциально влияет на все аминокислоты и может вести к окислению как их боковых цепей, так и полипептидного скелета. Кроме того, окислительно модифицированные производные углеводов и липидов, например альдегиды, образуемые при перекисном окислении полиненасыщенных жирных кислот, могут ковалентно реагировать с функциональными группами белков, которые сами по себе не подвергаются окислительным воздействиям [Hensley K., Robinson K.A., 2000].

Антиоксидантные механизмы включают в себя редокс-активные низкомолекулярные клеточные соединения, GSH, витамины E и C, а также ферментативные системы метаболизма активных форм кислорода (СОД, каталаза и GSH-пероксидаза) [Didion S.P., Kinzenbaw D.A., 2004]. Антиоксиданты определяются как вещества, ингибирующие или задерживающие окислительное повреждение субклеточных белков, углеводов, липидов и ДНК [Davies K.J., 1995; Brune V., Zhou J., 2003]. Хотя точные механизмы взаимодействия между различными антиоксидантами не вполне ясны, возможно, что одни антиоксиданты способны уравнивать другие, устанавливая клеточный редокс-потенциал и, таким образом, могут согласованно действовать, защищая от окислительного повреждения [Dhalla N.S., Elmoselhi A.B., 2000]. Очевидно, «антиоксидантная» функция намного сложнее простого гашения свободных радикалов, увеличение конкретного антиоксиданта может нарушать естественный баланс других. Существует взаимозависимость между природными антиоксидантными факторами и присущим им синергическим взаимодействием. Так, введение α -токоферола снижает в организме уровень γ -токоферола, который инактивирует радикалы через другой механизм, образуя продукт нитрования S-нитро- α -токоферол (его эффективность в плазме более чем в 20 раз выше по отношению к обычному) [Saldeen T., Li D., 1999]. Различные звенья АОС находятся в тесных взаимоотношениях, ослабление одного звена, как правило, сопровождается усилением других [Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., 1993; Владимиров Ю.А., 1998].

Некоторые из эндогенных антиоксидантов (например, GSH-пероксидаза, СОД и каталаза) действуют как первичный защитный механизм, тогда как витамин E играет вторичную роль. Предполагается, что аскорбинат и GSH могут действовать как первая линия обороны от окислительного стресса при реперфузии, тогда как витамин E может действовать позднее при его более тяжёлой форме, что частично объясняет противоречивые результаты о витамине E, полученные на различных животных и в клинических исследованиях [Dhalla N.S., Elmoselhi A.B., 2000].

Антиоксиданты проявляют своё действие разнообразным способом, например: а) вызывая гашение активных форм кислорода; б) ингибируя их образование; в) путём связывания с ионами металлов, катализирующих их образование; г) усиливая образование эндогенных антиоксидантов; д) сокращая апоптозную гибель клеток путём активации гена Bcl-2 [Dhalla N.S., Elmoselhi A.B., 2000]. Ряд авторов выделяют трёхступенчатый уровень организации системы антиоксидантной протекции: антикислородный, антирадикальный, антиперекисный [Каган В.Е. и др., 1986; Литвицкий П.Ф., Грачев С.В., 1997].

При окислительном стрессе происходит чрезмерное образование свободных радикалов и неспецифическое повреждение тканей, нерегулируемое механизмами антиоксидантной системы [Hensley K., Robinson K.A., 2000]. Важный вклад в сложную иерархию антиоксидантной защиты вносит NO, который является свободнорадикальной молекулой, способной, взаимодействуя с супероксидным анионом, образовывать пероксинитрит, а также может быть модификатором свойств гемоглобина [Висмонт Ф.И., Зинчук В.В., 1999]. Образование NO, уникальной молекулы, выполняющей роль физиологического мессенджера, а в некоторых условиях – цитотоксической эффекторной молекулы, происходит из аминокислоты L-аргинина под контролем фермента NO-синтазы и ряда кофакторов (L-аргинин-NO система) [Марков Х.М., 2001]. Регуляция активности NO-синтазы идёт по конечному продукту через обратную связь; NO способен связываться с гемической группой фермента, снижая тем самым его активность [Albakri Q.A., Stuehr D.J., 1996]. Производные монооксида азота (NO^- , NO_2 , ONOO^- и другие) опосредуют повреждающие токсические эффекты в организме и его участие в развитии окислительного стресса (рисунок 2.1). Биохимия NO двулика: с одной стороны, он может ограничивать окислительное повреждение (как обрывающий гаситель цепи радикалов), с другой – быть источником активных форм азота [Григлевски Р.Е., 1997; Klatt P., Lamas S., 2000]. Окислительная инактивация NO, вероятно, является важным звеном в механизме развития дисфункции эндотелия [Lopez Farre A., Casado S., 2001].

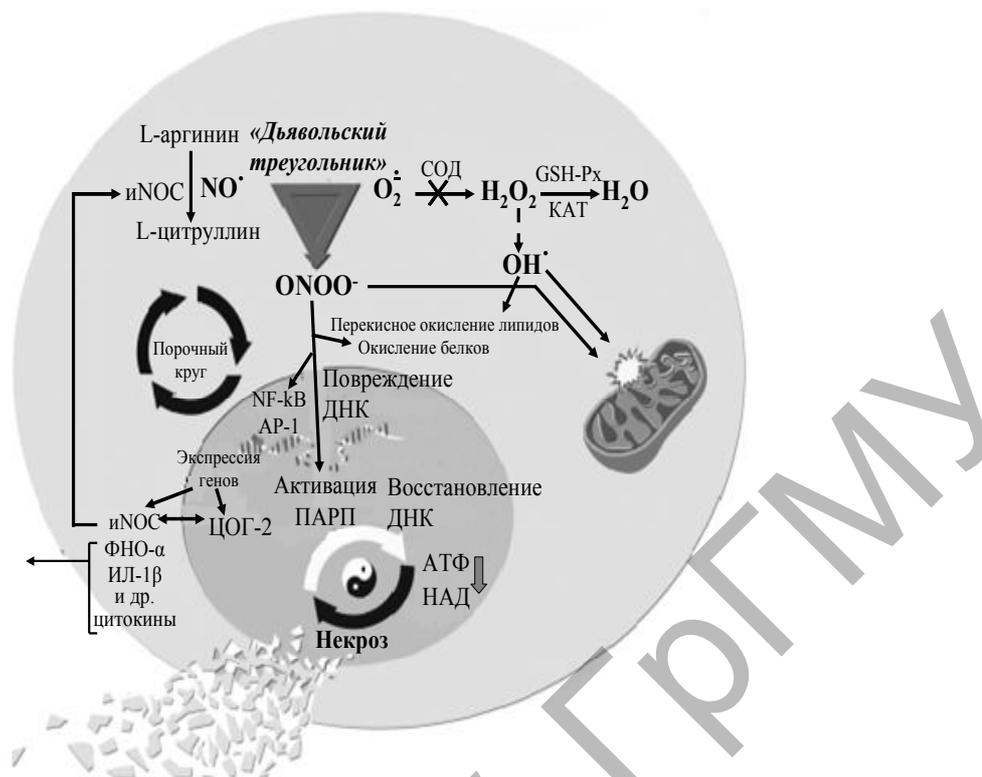


Рисунок 2.1 - Механизмы участия NO в развитии окислительного стресса [Korkmaz A. et al., 2009].

NO участвует в регуляции кислородзависимых процессов в митохондриях (рисунок 2.2). Система транспорта кислорода участвует в поддержании оптимального уровня прооксидантно-антиоксидантного баланса организма [Борисюк М.В., 1989], что наблюдалось в экспериментах при введении ЛПС, а также при целенаправленной модификации SGK [Зинчук В.В., 2005; Zinchuk V.V., 1999].

Содержание NO определяется скоростью его образования и разложения, так как NO и его метаболиты в существенных количествах в тканях не запасаются. Активность различных изоформ NO-синтазы колеблется в широком пределе: тип I (нейрональная NO-синтаза) имеет максимальное значение около 300, тип II (макрофагальная NO-синтаза) – до 1000, тип III (эNOS) – около 15 нмоль/мг/мин. [Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., 2000]. Определение концентрации NO в просвете сосудов на разных участках сердечно-сосудистой системы показывает диапазон его изменений в пределах 0,3-1,3 мкмоль [Vallance P.,

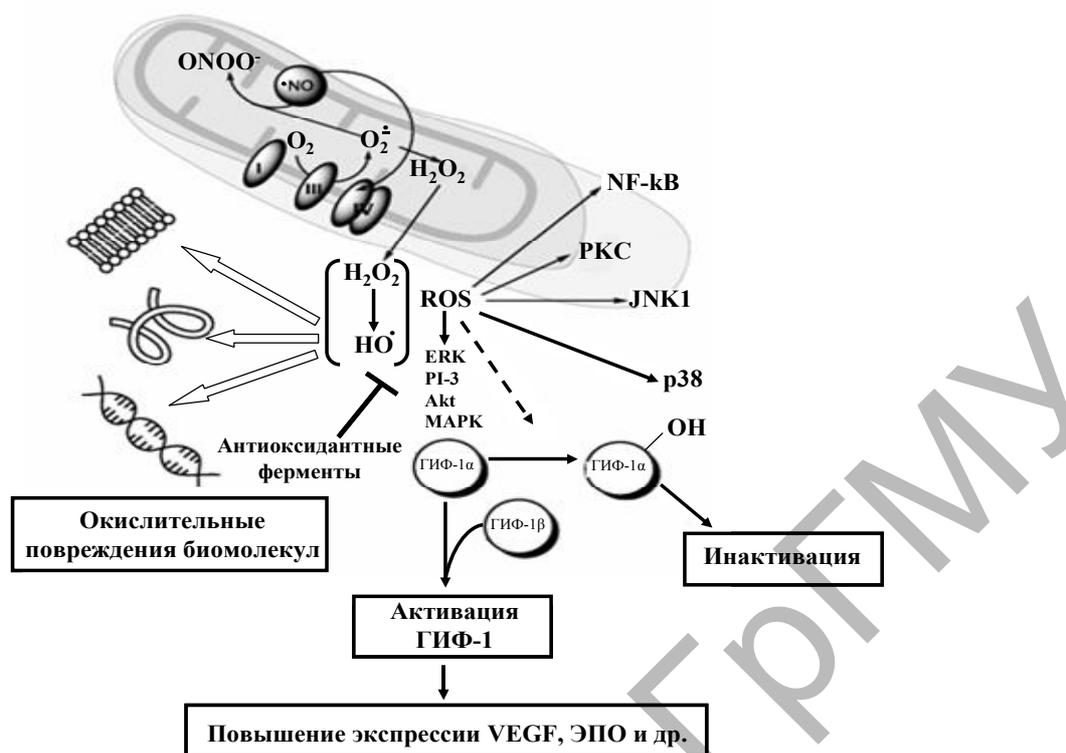


Рисунок 2.2 - Роль NO в регуляции кислородзависимых процессов в митохондриях [Cooper С.Е., Giulivi С., 2003]

Patton S., 1995]. Измерениями с помощью микроэлектродной техники установлено, что эндотелий может вырабатывать в 10-40 раз больше NO, чем это требуется для активации гемсодержащей гуанилатциклазы [Malinski T., Taha Z., 1992]. В печени мышей NO продуцируется со скоростью 2 мкмоль/г/час, а в других тканях – в 5-10 раз меньше [Галаган М.Е. и др., 1997]. В миокарде его содержание за счёт синтеза эNOC составляет 100-300 пмоль [Kelm M., 1999]. Общее количество синтезируемого NO, судя по уровню NO_3^- , колеблется от 150 до 1000 мкмоль/сут [Tannenbaum S., 1994]. Образование NO эндотелием *in situ* или в культуре клеток примерно равно 4 пмоль/кг/белка·мин, что в перерасчёте на общую массу эндотелия в 1,5 кг для организма человека составляет 1728 мкмоль/сут [Kelm M., 1999]. Оценка образования NO в организме (методом вдыхания стабильного изотопа кислорода $^{18}\text{O}_2$) показала, что скорость его образования составляет $0,38 \pm 0,06$ мкмоль/кг/час, а общее суточное количество 600-700 мкмоль [Sakinis A., Jungersten L., 1999]. Продуктами разложения NO является нестабильный, но специфический NO_2^- и более стабильный, но

менее специфический NO_3^- ; более 90 % первого имеет эндотелиальную природу происхождения в организме человека [Kelm V., Rath J., 2001]. Для регулирования уровня NO в тканях существуют различные механизмы, такие как S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы негемового железа [Ванин А.Ф., 2001]. Монооксид азота количественно и функционально отличается от кислорода. Для удовлетворения основных метаболических потребностей организма необходимы миллимолярные количества кислорода и наномолярные монооксида азота.

Возможны альтернативные источники образования NO. Окислительный процесс превращения гемоглобина в метгемоглобин под действием нитрит-ионов может быть сопряжён с синтезом NO [Петренко Ю.М., Шашурин Д.А., 2001]. Предложена концепция цикла монооксида азота, согласно которой в образовании NO имеет значение не только L-аргинин-NO система, но и нитритредуктазная система, т.е. в этом процессе восстановления важное значение имеет и активность электронно-донорных систем, участвующих в восстановлении гемоглобина [Реутов В.П. и др., 1997]. Предполагается наличие собственных механизмов синтеза NO в эритроцитах, судя по накоплению конечных продуктов его метаболизма $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ [Deliconstantinos G., Villiotou V., 1995], цитруллина [Chen L.Y., Mehta J.L., 1998]. Обнаружено методом иммуноблоттинга наличие в эритроцитах белков типа NO-синтаз [Jubelin B.C., Gierman J.L., 1996]. Kang E.S. et al. [2000] показали, что нормальные циркулирующие в крови эритроциты содержат две изоформы NO-синтазы, не обладающие в обычных условиях каталитической активностью, хотя возможно, что незрелые эритроциты (эритробласты, ретикулоциты) могли бы экспрессировать NO-синтазную активность, утрачивая её по мере дифференциации. В этом аспекте дискутируется вопрос о значении существования в эритроцитах собственного источника NO (NO-синтазного или нитрит-гемоглобинового). Учитывая сложную природу участия NO в обеспечении различных функций организма, должны существовать эффективные механизмы регуляции его уровня в тех или иных процессах.

С повышением СГК уменьшается скорость аутоокисления оксигемоглобина в метгемоглобин, и, наоборот, уменьшение сродства способствует образованию метформы [Stepuro I. et al., 1994]. В то же время, гемоглобин может проявлять и прооксидантное действие – путём образования гидроксильных радикалов. Установлено, что оксигемоглобин оказывает прооксидантный эффект в культурах эндотелиальных клеток, причём при H_2O_2 -индуцированном окислении его в метформу [Balla J., Jacob H.S., 1993]. Инкубация оксигемоглобина с H_2O_2 в присутствии диметилсульфоксида сопровождается превращением последнего в формальдегид и увеличением образования свободных радикалов, однако с повышением СГК уменьшается генерация супероксидного аниона и, в итоге, накопление конечного продукта [Alayash A.I., 2000].

Активность процессов ПОЛ в эритроцитарной массе, инициированная гидроперекисью третбутила, зависит от состояния гемоглобина, так как в содержащих метгемоглобин эритроцитах образование МДА и интенсивность хемилюминесценции значимо выше, чем в клетках, содержащих оксигемоглобин [Lissi E., Franz R., 1986]. Степень инактивации эритроцитарной GSH-пероксидазы коррелирует со скоростью окисления оксигемоглобина и во многом зависит от формирования гемихрома, а низкая активность каталазы соответствует более высокой концентрации метгемоглобина. Скорость окисления GSH нитритом натрия в присутствии оксигемоглобина снижается, и только после перехода значительной части оксигемоглобина в метформу наблюдается прирост концентрации окисленного GSH [Balla J., Jacob H.S., 1993]. Гемоглобин, обладая пероксидазными свойствами, участвует в окислении липопротеидов низкой плотности. Выявлено, что активной формой, вызывающей свободнорадикальные процессы в эритроцитах и ковалентное перекрёстное сшивание мембранных белков, является глобиновый радикал, образующийся при окислении метформы гемоглобина [Miller Y.I., Altamentova S.M., 1997].

Эритроцитарное звено первым реагирует на повышение активности свободнорадикальных процессов [Азизова О.А. и др., 2000]. Инкубация эритроцитарной взвеси с окислительными

сыворотками демонстрирует немедленную реакцию эритроцитов на изменение интенсивности ПОЛ и характеризует высокую степень участия этих клеток не только в гемореологии, но и в системе антиоксидантной защиты [Ройтман Е.В. и др., 2001]. По-видимому, эритроцитарное звено первым исчерпывает свои компенсаторные возможности, и такое положение «посредника» между функциональными системами, в свою очередь, предполагает, что именно оно ответственно за изменения кислородсвязывающих свойств крови на фоне интенсификации свободнорадикального окисления. Активация свободнорадикальных процессов также обуславливает гемореологические нарушения, реализуемые через повреждение циркулирующих эритроцитов (потеря мембранных липидов, повышение жёсткости билипидного слоя, агрегация мембранных белков) [Mo J., Fan J., 1993], оказывает опосредованное влияние и на другие показатели КТФ крови.

Вопрос о роли КТФ крови в процессах поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма до сих пор остается открытым. При уменьшении показателя $p50$ (pO_2 , при котором гемоглобин насыщается кислородом на 50 %) наблюдается снижение содержания диеновых конъюгатов (ДК), МДА, ОШ и повышение активности каталазы и концентрации α -токоферола в эритроцитах, инкубированных с 2,5 % и 5 % раствором NaOCN, с выраженной дозозависимой динамикой изменений [Корнейчик В.Н. и др, 1999]. Цианат необратимо взаимодействует с NH_2 -концевым валином молекулы гемоглобина, образуя карбаминные связи. Это соединение карбаминирует многие протеины необратимо на N-концевых α -аминогруппах внутренних лизинов, а также обратимо на SH-группах [Allison T.B., Pieper G.M., 1976]. Карбаминирование аномального гемоглобина предупреждает серповидноклеточную трансформацию эритроцитов и продлевает их срок жизни *in vivo*, что с успехом применяется для лечения соответствующей анемии [Rivera C.M., Velarde L.F., 1995].

Анализ приведенных литературных данных об участии L-аргинин-NO системы в регуляции прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма позволяет предполагать, что NO-зависимые механизмы, прежде всего эндотелиальной

природы, могут влиять на прооксидантно-антиоксидантный баланс организма при окислительном стрессе.

2.2 Содержание продуктов перекисного окисления липидов и факторов антиоксидантной системы в тканях при окислительном стрессе в условиях модуляции образования NO

Проблема чрезмерного образования АФК при окислительном стрессе в настоящее время является актуальной в связи с их множественным эффектом на различные системы и процессы в живом организме. Образование активированных кислородных метаболитов: супероксидного анион-радикала, перекиси водорода, ОН-радикала, синглетного кислорода, монооксида азота, пероксирадикалов – играет ключевую роль в молекулярно-клеточных механизмах развития окислительного стресса, отражающего нарушение баланса в системе оксиданты-антиоксиданты [Зенков Н.К. и др., 2001]. Низкие внутриклеточные стационарные концентрации O_2^{*-} возникают в результате равновесия между эндогенными скоростями частичного восстановления O_2 до O_2^{*-} и гашения O_2^{*-} весьма эффективной СОД цитоплазмы и митохондрий, что ведёт к низким внутриклеточным концентрациям O_2^{*-} (редко более 1 нМ) [Brawn K., Fridovich I., 1980]. В развитие окислительного стресса могут вносить вклад снижение активности защитных ферментов и антиоксидантов, деструкция или угнетение образования нуклеотидных коферментов, аномальный метаболизм GSH или утечка антиоксидантов через повреждённые мембраны [Rice-Evans S.A., Diplock A.T., 1991]. Для борьбы с окислительным воздействием организм развил ряд защитных механизмов гашения радикалов, к которым относятся различные редокс-активные низкомолекулярные клеточные соединения (GSH, витамины E и C), а также ферментативные системы метаболизма (СОД, каталаза и GSH-пероксидаза).

Система транспорта кислорода, её гемический компонент также участвует в поддержании оптимального уровня этого баланса организма [Zinchuk V., Borisiuk V., 1998; Зинчук В.В., 2005]. Задачей работы, представленной в данном разделе, было

изучение прооксидантно-антиоксидантного состояния и кислородсвязывающих свойств крови при окислительном стрессе у кроликов в условиях модуляции L-аргинин NO-системы (через 60 мин. после применения ЛПС внутривенно вводили ингибитор NO-синтазы L-NAME в дозе 7,5 мг/кг).

Септический шок представляет собой особую реакцию организма, выражающуюся в развитии тяжёлых системных расстройств, связанных с нарушением адекватной перфузии тканей, наступающих в ответ на внедрение микроорганизмов или их токсинов [Руднов В.А., 2000]. Введение бактериального эндотоксина является достаточно распространённым способом моделирования септического шока, и в то же время классической моделью окислительного стресса. В литературе приводятся различные дозы ЛПС для моделирования окислительного стресса у кроликов [Giebler R. et al., 1999; Sheu J.R. et al., 1999]. В данной работе окислительный стресс у кроликов продолжительностью 240 мин. вызывали путём внутривенного введения в организм ЛПС от *Escherichia coli* (Serotype 0111:B4) в дозе 500 мкг/кг ("Sigma").

С помощью катетера осуществляли забор пробы смешанной венозной крови для оценки КТФ крови до и через 120 и 240 мин. после введения ЛПС. Забор тканей (сердца, лёгких, печени, почек и мышц) осуществляли на 240-й мин. окислительного стресса.

Развитие окислительного стресса после введения ЛПС характеризовалось активацией процессов ПОЛ и снижением содержания факторов антиоксидантной системы в крови (таблица 2.1). Выявлено увеличение концентрации ДК в плазме и эритроцитах с $4,28 \pm 0,15$ и $35,27 \pm 1,74$ до $6,19 \pm 0,36$ ($p < 0,001$) и $53,54 \pm 6,69$ ($p < 0,02$) на 120-й мин. и $6,42 \pm 0,28$ ($p < 0,001$) $\Delta D_{233}/\text{мл}$ и $52,79 \pm 1,95$ ($p < 0,001$) $\Delta D_{233}/\text{мл}$ на 240-й мин. эксперимента, соответственно. Отмечалось также повышение уровня ОШ к концу второго и четвёртого часов эксперимента в эритроцитах и плазме, соответственно: $324,96 \pm 5,18$ ($p < 0,001$), $328,47 \pm 4,85$ ($p < 0,001$) и $5,64 \pm 0,60$ ($p < 0,01$), $6,36 \pm 0,52$ ($p < 0,001$) в сравнении с исходными показателями $285,78 \pm 4,99$ и $3,24 \pm 0,24$ ЕД/мл. Изменение содержания ДК и ОШ в тканях (таблица 2.2 и рисунок 2.3), а также снижение активности каталазы и содержания

α -токоферола (таблица 2.3 и рисунок 2.4) наблюдалось в группе с окислительным стрессом (ЛПС) в сравнении с контролем, соответственно: в лёгких на 24,6 % ($p < 0,01$) и 18,3 % ($p < 0,001$), печени на 6,9 % (каталаза) ($p < 0,001$), почках на 9,0 % ($p < 0,001$) и 17,2 % ($p < 0,001$), мышцах на 20,2 % ($p < 0,02$) и 11,9 % ($p < 0,001$).

Таблица 2.1 – Изменение показателей прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови кроликов при окислительном стрессе ($\bar{x} \pm S_x$)

Показатель	Исходный уровень	Окислительный стресс	
		120-я минута	240-я минута
n	9	9	9
Диеновые конъюгаты			
Эритроциты, $\Delta D_{233}/\text{мл}$	35,27 \pm 1,74	53,54 \pm 6,69*	52,79 \pm 1,95*
Плазма, $\Delta D_{233}/\text{мл}$	4,28 \pm 0,15	6,19 \pm 0,36*	6,42 \pm 0,28*
Основания Шиффа			
Эритроциты, отн. ЕД/мл	285,78 \pm 4,99	324,96 \pm 5,18*	328,47 \pm 4,85*
Плазма, отн. ЕД/мл	3,24 \pm 0,24	5,64 \pm 0,60*	6,36 \pm 0,52*
Активность каталазы			
Эритроциты, ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{сек} \cdot \text{гHb}$	2,61 \pm 0,10	3,48 \pm 0,39*	2,47 \pm 0,13#
α -токоферол			
Эритроциты, мкмоль/л	127,35 \pm 8,16	107,01 \pm 13,22	95,07 \pm 9,41*
Плазма, мкмоль/л	20,42 \pm 0,34	18,48 \pm 0,60*	15,67 \pm 0,86*#

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню, # - по отношению к 120-й минуте эксперимента

Таблица 2.2 – Изменение содержания диеновых конъюгатов в тканях кроликов при окислительном стрессе в условиях применения метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) ($\bar{x} \pm S_x$)

Ткань	Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\text{мг}$		
	Контроль	ЛПС	ЛПС + L-NAME
n	5	9	7
Сердце	72,79±3,91	101,00±2,40*	111,50±3,14*#
Легкое	74,77±4,84	104,08±2,33*	120,98±1,44*#
Печень	81,73±4,60	121,67±2,97*	187,74±4,47*#
Почка	57,74±3,58	67,20±1,18*	87,53±2,18*#
Мышца	61,59±0,82	73,91±1,01*	81,42±1,10*#

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контролю, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС

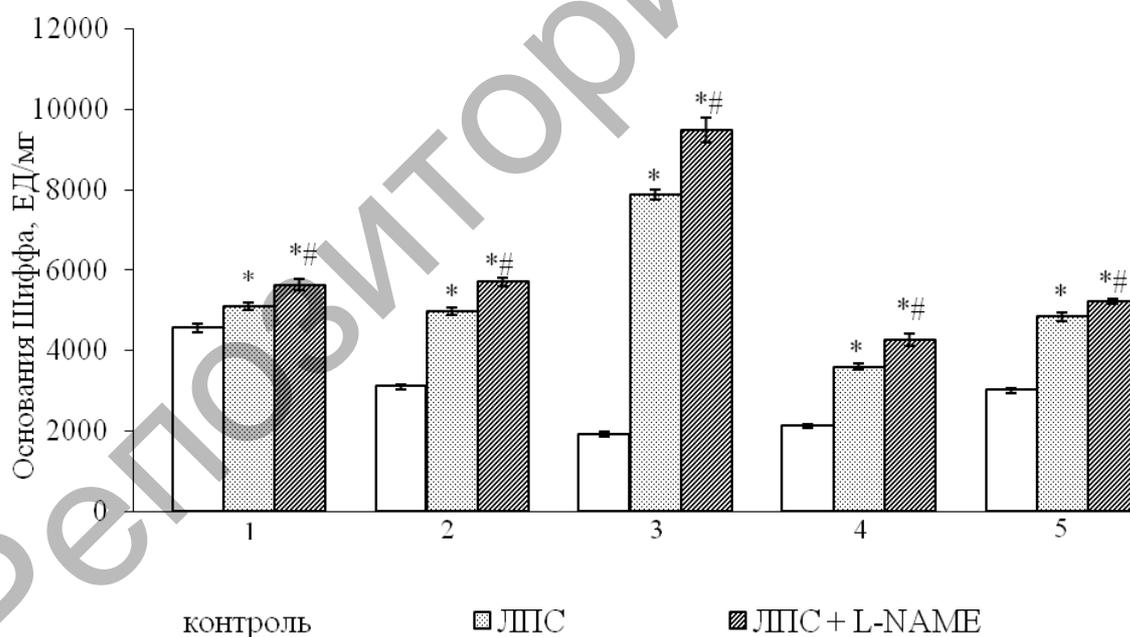


Рисунок 2.3 – Изменение содержания оснований Шиффа в тканях кроликов при окислительном стрессе в условиях применения метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME)
1- сердце, 2- легкое, 3- печень, 4- почка, 5- мышца.

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

Таблица 2.3 – Изменение активности каталазы в тканях кроликов при окислительном стрессе в условиях применения метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) ($\bar{x} \pm S_x$)

Ткань	Активность каталазы, ммоль H ₂ O ₂ /сек*г белка		
	Контроль	ЛПС	ЛПС + L-NAME
n	5	9	7
Сердце	197,20±5,13	211,22±14,10	140,43±1,46*#
Легкое	47,60±2,94	35,89±1,71*	23,21±1,14*#
Печень	908,60±6,24	846,33±12,85*	660,14±43,27*#
Почка	425,00±2,32	386,56±1,34*	275,86±19,45*#
Мышца	169,20±7,34	135,00±10,26*	108,14±2,19*#

Примечание: * - p<0,05 по отношению к контролю, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

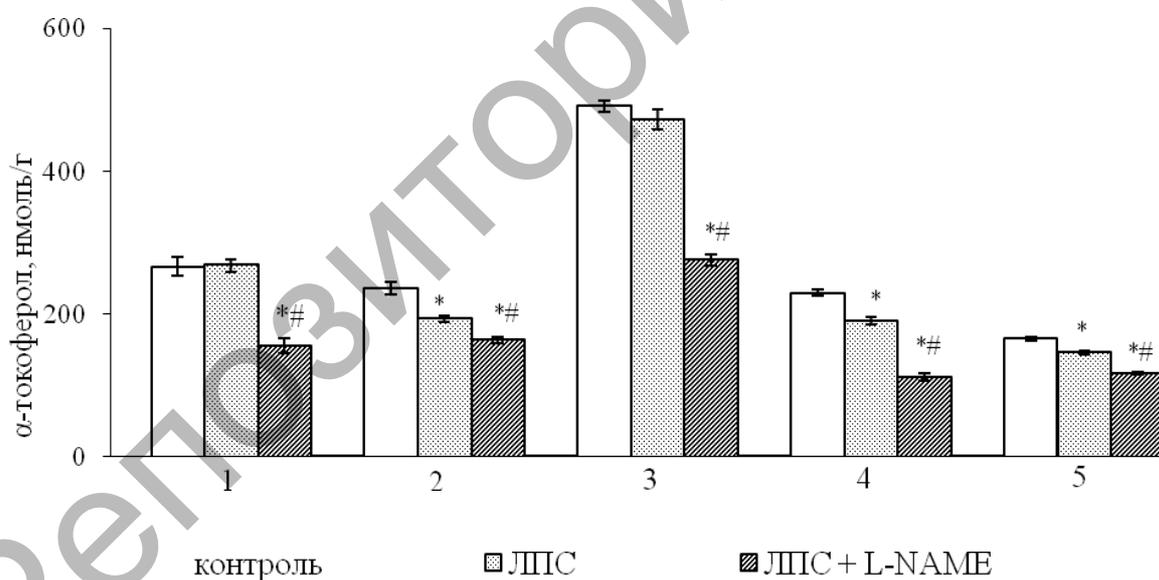


Рисунок 2.4 – Изменение содержания α -токоферола в тканях кроликов при окислительном стрессе в условиях применения метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME)

1- сердце, 2- легкое, 3- печень, 4- почка, 5- мышца.

Примечание: * - p < 0,05 по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

Аэробные организмы при нормальном дыхании и в условиях стресса вырабатывают АФК. В условиях окислительного стресса развивается дисбаланс между уровнями окислителей и антиоксидантов, вызывающий повреждение ферментов, белковых рецепторов, липидных мембран и ДНК. АФК и АФА играют ведущую роль в поддержании сосудистого гомеостаза. Зависимые от NO клеточные сигналы модулируются редокс-активными субстанциями, такими как O_2^{*-} и СОД (семейство ферментов, катализирующих образование H_2O_2 и O_2 из O_2^{*-}). Образование и гашение O_2^{*-} участвует в дисфункции сосудов, наблюдаемой при атеросклерозе, гипертензии, диабете и хронической толерантности к нитратам, а также при ишемическом повреждении миокарда [Tarpey M.M. et al., 2001]. Повышенная генерация O_2^{*-} и H_2O_2 вносит вклад в инициацию провоспалительных процессов при транскрипционной регуляции экспрессии генов молекул клеточной адгезии, чувствительных к изменениям клеточного образования окислителей, а также в модуляцию клеточных сигналов [Marumo T. et al., 1997]. В последнее время активно обсуждается роль NO в генезе окислительного стресса. Эта молекула относится к свободным радикалам, выполняет различные физиологические функции в организме, но в случае её чрезмерного образования она вносит вклад в активацию ПОЛ. Было предположено, что $ONOO^-$, продукт реакции между O_2^{*-} и NO, хотя и ограничивает физиологическую доступность NO, но опосредует множество связанных с ним цитотоксических эффектов ввиду многочисленности своих реакций с клеточными тиолами, липидами, белками и ДНК [Patel R.P., Hogg N., 1999]. Кроме своей роли в патологических процессах $ONOO^-$ может выполнять и физиологическую функцию клеточной сигнальной молекулы [Go Y.M. et al., 1999]. Исходя из изложенного, представляется целесообразным оценить состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в условиях модуляции L-аргинин-NO системы.

Синтез NO осуществляется из L-аргинина в результате действия фермента NO-синтазы при участии кофакторов (кальмодулин, тетрагидро-биоптерин, флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид и др.), образующих в совокупности

L-аргинин-NO систему [Moncada S., Higgs E.A., 1993]. В качестве её стимуляторов выступают физические стимулы (давление сдвига и т.д.), нейротрансмиттеры, гормоны, аутокоиды и факторы свертывания крови, что приводит к увеличению синтеза NO в организме. Для коррекции данной системы используют разные по механизму действия группы веществ: L-аргинин – исходный субстрат данной системы; вещества, конкурентно ингибирующие NO-синтазу; доноры NO. Нами использовались L-аргинин и ингибиторы NO-синтазы различной направленности. Для модуляции L-аргинин-NO системы использовались L-аргинин и ингибиторы NO-синтазы различной направленности. Через 60 мин. после введения ЛПС кроликам внутривенно вводили ингибитор NO-синтазы метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинин (L-NAME) («Sigma») в дозе 7,5 мг/кг. У крыс выполнялась внутривенная инъекция L-аргинина («Sigma») в дозе 300 мг/кг – за 10 мин. до введения ЛПС, L-NAME в дозе 20 мг/кг и селективного ингибитора iNOS – L-лизина-N^G-ацетамидина (L-NIL) («Sigma») – в дозе 2 мг/кг через 45 мин. после ЛПС. По данным ряда авторов, используемые нами дозы и способы введения веществ для коррекции L-аргинин-NO системы наиболее приемлемы, так как они обеспечивают достаточно значимую модификацию NO-образующей функции организма [Zinchuk V., Borisiuk V., 1998; Dixit C., Rastogi L., 1999; Fisher L.G. et al., 1999].

В условиях окислительного стресса ингибирование NO-синтазы посредством введения L-NAME вызывало более выраженное увеличение концентрации ДК в эритроцитах на 114,3 % (p<0,001) и плазме на 94,1 % (p<0,001); уровня ОШ в эритроцитах на 43,8 % (p<0,001) и плазме на 158,3 % (p<0,001) на 240-й мин. эксперимента в сравнении с исходным уровнем. При окислительном стрессе (ЛПС + L-NAME) наибольшее повышение содержания ДК и ОШ отмечалось в тканях лёгкого 16,2 % (p<0,001) и 14,7 % (p<0,001), печени 54,3 % (p<0,001) и 20,6 % (p<0,001), почках 30,3 % (p<0,001) и 18,4 % (p<0,01), соответственно, по отношению к группе животных, получавших только ЛПС (таблица 2.2 и рисунок 2.3), что свидетельствует о большей активности процессов свободнорадикального окисления липидов в условиях ингибирования NO-синтазы.

При окислительном стрессе наблюдалось снижение в крови концентрации α -токоферола и активности каталазы, более выраженное при введении L-NAME (таблица 2.4), и составило, соответственно, в эритроцитах 35,5 % ($p < 0,001$) и 34,0 % ($p < 0,001$) на 240-й мин. по отношению к исходному уровню.

Таблица 2.4 – Изменение факторов антиоксидантной защиты в крови кроликов при окислительном стрессе в условиях применения метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) ($\bar{x} \pm S_x$)

Показатель	Исходный уровень	Окислительный стресс + L-NAME	
		120-я минута	240-я минута
n	8	8	7
Активность каталазы			
Эритроциты, ммоль H ₂ O ₂ /сек*г Hb	3,24±0,20	3,02±0,34	2,14±0,10*#
α -токоферол			
Эритроциты, мкмоль/л	136,78±2,55	121,47±3,21*	88,22±2,22*#
Плазма, мкмоль/л	19,84±0,72	17,95±0,82	14,34±0,53*#

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню, # - по отношению к 120-й минуте эксперимента

Аналогичная динамика снижения факторов антиоксидантной защиты прослеживалась в тканях (таблица 2.3 и рисунок 2.4). Ещё более значимое снижение факторов антиоксидантной защиты (содержание α -токоферола, активность каталазы) в тканях (сердца, лёгких, печени, почках, мышцах) наблюдалось в условиях ингибирования NO-синтазы в сравнении с группой, получавшей ЛПС.

Как видим, развитие окислительного стресса характеризуется активацией процессов ПОЛ и снижением антиоксидантного потенциала в крови и тканях. Происходит повышение содержания ДК и ОШ, а также снижение активности каталазы и содержания α -токоферола в условиях активации процессов свободнорадикального окисления липидов в плазме,

эритроцитах и тканях. При окислительном стрессе модуляция L-аргинин-NO системы путём введения неселективного ингибитора NO-синтазы не уменьшает нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма [Глебов А.Н., Зинчук В.В., 2002, 2006].

Состояние, при котором прооксидантно-антиоксидантное равновесие (генерация прооксидантов в тканях в стационарных условиях уравнивается ферментативными и неферментативными внутри- и внеклеточными антиоксидантами) изменено в связи с повышенной генерацией свободных радикалов и повреждением основных механизмов антиоксидантной защиты, определяют как окислительный стресс. Данный тип стресса является общим явлением для всех типов клеток, который возникает прежде всего в митохондриях [Melov S., 2002]. Большинство эукариотных организмов нуждается для своего выживания в наличии кислорода в атмосфере, который является терминальным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий при выработке АТФ. Неизбежным побочным продуктом митохондриального дыхания являются АФК, вырабатываемые, главным образом, в матриксе митохондрий. В организме развились специфические механизмы защиты против свободных радикалов кислорода, такие как СОД, GSH-пероксидаза, каталаза и множество других, функция которых состоит в снижении кумулятивной нагрузки АФК внутри клеток или во внеклеточном пространстве. Ведётся дискуссия о том, какие АФК больше повреждают клеточные компоненты при эндогенном окислительном стрессе [Зоров Д.Б. и др., 2005]. Потенциально повреждающими являются и NO, и другие родственные радикалы, несмотря на наличие разногласий относительно их вклада в патогенез ряда заболеваний [Лобанок Л.М., Лукша Л.С., 1999; Melov S., 2002]. Были проведены исследования, показывающие способность АФК и NO повреждать клеточные компоненты и клетку в целом, но многие вопросы потенциальных физиологических последствий эндогенного окислительного стресса остаются открытыми [Зенков Н.К. и др., 2001].

Экспериментальные данные предполагают, что АФК могут быть важными медиаторами повреждения клеток при эндотоксемии либо в результате повреждения макромолекул, либо воздействия на вне- и внутриклеточные регуляторные процессы [Annane D. et al., 2005]. Кроме того, полагают, что ключевую роль в патогенезе сепсиса играет NO [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002]. NO синтезируется в организме для обеспечения многих нормальных клеточных функций, однако его высокие уровни, взаимодействуя с другими окислителями, образуют активные формы азота, которые повреждают различные клеточные мишени, ведя к апоптозу, мутагенезу и канцерогенезу [Bishop A., Cashman N., 2003]. Образующийся из NO и O_2^{*-} пероксинитрит в организме является сильным окислителем, реагирующим с различными биомолекулами (белки, липиды, ДНК). Цитотоксический эффект пероксинитрита опосредуется инициацией ПОЛ, прямым ингибированием ферментов дыхательной цепи митохондрий, ингибированием активности мембранной Na^+/K^+ -АТФазы, инактивацией мембранных каналов Na^+ и другими окислительными модификациями белков, а также индуцированием разрыва цепей ДНК с последующей активацией ядерного фермента поли-АДФ-рибозилсинтетазы или полимеразы, потенциально ведя к значимому снижению уровня энергии и некрозу клеток [Szabo C., 2003]. Активные формы кислорода и азота находятся в сложных взаимоотношениях, обеспечивающих как синергические, так и антагонистические эффекты, которые зависят от изменения скорости образования NO и O_2^{*-} [Brune V., Zhou J., 2003]. Вышеизложенное предопределяет интерес к изучению роли L-аргинин-NO системы в развитии окислительного стресса. В данном разделе представлены результаты наших исследований состояния параметров прооксидантно-антиоксидантного равновесия при окислительном стрессе в условиях модуляции L-аргинин-NO системы, а также при введении кверцетина [Глебов А.Н., Зинчук В.В., 2002].

В следующей серии опытов решалась задача по оценке активности процессов ПОЛ и состояния АОС в условиях модуляции различными путями L-аргинин-NO системы при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС. У

крыс-самцов окислительный стресс моделировали, вводя внутривенно ЛПС в дозе 5 мг/кг. Модуляция L-аргинин-NO системы выполнялась внутривенной инъекцией L-аргинина в дозе 300 мг/кг за 10 мин. до введения ЛПС, L-NAME в дозе 20 мг/кг и селективного ингибитора иNOC (L-NIL) в дозе 2 мг/кг через 45 мин. после ЛПС.

Проведенные опыты выявили существенные изменения уровня продуктов ПОЛ. Содержание ДК в тканях представлено в таблице 2.5. Как видим, введение ЛПС приводило к значительному росту данного параметра. Так, в сердце он возрастал на 137,6 % ($p < 0,001$), в лёгких на 184,0 % ($p < 0,001$), в печени на 101,2 % ($p < 0,001$), в почках на 90,4 % ($p < 0,001$), в мышцах на 52,1 % ($p < 0,01$). Инъекции веществ, изменяющих состояние L-аргинин-NO системы, таких как неселективный ингибитор NO-синтазы (L-NAME), L-аргинин, а также селективный ингибитор иNOC (L-NIL), в целом, существенно не влияли на данный показатель активности ПОЛ. Однако при введении этих средств в комбинации с ЛПС динамика изменения данного параметра была разной. Инъекции ЛПС, L-NAME и L-аргинина при их совместном введении не вызывали значительного изменения содержания ДК в оцениваемых тканях, в сравнении с крысами, получавшими только ЛПС. При введении ЛПС и селективного ингибитора иNOC, L-NIL, данный параметр был меньше в сравнении с другими группами, у которых моделировался окислительный стресс. Так, в ткани сердца (по отношению к животным, получавшим ЛПС) прирост ДК был меньше на 27,6 % ($p < 0,05$), в лёгочной ткани на 32,6 % ($p < 0,01$), в печёночной ткани на 27,4 % ($p < 0,02$), в почечной ткани на 25,1 % ($p < 0,02$). Следует отметить, что в мышечной ткани данной группы животных по отношению к группе с ЛПС достоверных различий не было. При комбинированном введении селективного ингибитора NO-синтазы и исходного субстрата этого фермента L-аргинина наблюдалось некоторое усиление этой тенденции. Концентрация ДК в сердце была меньше по отношению к группе животных с ЛПС на 36,2 % ($p < 0,01$), в лёгких на 40,6 % ($p < 0,02$), в печени на 40,1 % ($p < 0,001$), в почках на 35,3 % ($p < 0,01$). В мышечной ткани достоверных различий не отмечалось.

Таблица 2.5 – Изменение содержания диеновых конъюгатов ($\Delta D_{233}/\text{мг}$) в тканях у крыс при окислительном стрессе в условиях модуляции L-аргинин-NO системы ($\bar{x} \pm S_x$)

Ткань	Контроль	ЛПС	L-NAME	ЛПС + L-NAME	L-аргинин	L-аргинин + ЛПС	L-аргинин + ЛПС + L-NAME	L-NIL	ЛПС+ L-NIL	L-аргинин + ЛПС+ L-NIL
n	10	9	6	10	8	9	9	8	9	9
сердце	7,24±0,50	17,20±1,53*	7,19±0,77#	14,81±1,04*	7,21±0,80#	15,68±1,24*	14,28±1,13*	6,92±0,57#	12,45±1,15*#	10,98±1,42*#
легкие	6,88±0,33	19,54±1,70*	7,31±1,02#	16,30±1,97*	6,12±0,58#	17,31±1,05*	15,79±1,04*	6,28±0,72#	13,18±1,35*#	11,60±1,16*#
печень	10,45±0,78	21,02±1,11*	10,38±0,45#	19,56±1,10*	9,87±0,90#	19,62±1,68*	17,61±1,42*	9,53±0,29#	15,27±1,70*#	12,59±1,35#
почки	9,27±0,48	17,65±1,45*	9,92±0,87#	18,56±1,36*	8,94±0,52#	18,03±1,02*	16,18±1,01*	8,97±0,72#	13,22±1,31*#	11,42±1,34#
мышцы	8,94±0,27	13,59±1,31*	9,71±0,63#	14,93±0,96*	9,31±1,05#	13,85±1,05*	13,23±1,73*	7,42±1,50#	12,73±1,07*	12,91±0,74*

Примечание: *- $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС

Близкий характер изменения уровня ОШ отмечался в тканях (таблица. 2.6). Окислительный стресс сопровождался выраженным приростом этого параметра: в сердце на 99,2 % ($p < 0,001$), в лёгких на 111,3 % ($p < 0,001$), в печени на 81,8 % ($p < 0,001$), в почках на 121,3 % ($p < 0,001$), в мышцах на 54,5 % ($p < 0,001$). Модуляция L-аргинин-NO системы указанными выше средствами, как при изолированном их введении, так и в сочетании с ЛПС (за исключением L-NIL), существенно не влияла на изменение этого параметра по отношению к соответствующим контрольным группам. Содержание ОШ при введении L-NIL в условиях окислительного стресса было меньше в сердце на 13,8 % ($p < 0,01$), в лёгких на 26,1 % ($p < 0,001$), в печени на 19,6 % ($p < 0,001$), в почках на 16,8 % ($p < 0,001$), в мышцах на 12,2 % ($p < 0,01$). Предварительное введение L-аргинина и L-NIL характеризовалось более выраженным снижением этого показателя активности свободнорадикальных процессов. Так, в ткани сердца, по отношению к животным, получавшим ЛПС, снижение ОШ было на 21,4 % ($p < 0,001$), в лёгочной ткани на 32,3 % ($p < 0,001$), в печёночной ткани на 22,8 % ($p < 0,001$), в почечной ткани на 27,3 % ($p < 0,001$), в мышечной ткани на 13,8 % ($p < 0,001$). В то же время, снижение уровня ОШ не было достоверно значимым по отношению к группе животных, получавших ЛПС и L-NIL, за исключением лёгких и почек на 8,4 % ($p < 0,05$) и 12,6 % ($p < 0,001$), соответственно.

Важно было в этих условиях оценить состояние факторов, формирующих антиоксидантную защиту организма. Одним из её наиболее значимых параметров является каталаза, представляющая ферментативный компонент АОС. Развитие окислительного стресса характеризовалось снижением активности этого фермента: в сердце его значение снижалось с $41,28 \pm 1,79$ до $20,79 \pm 2,32$ ($p < 0,001$), в лёгких с $35,28 \pm 1,69$ до $17,04 \pm 3,18$ ($p < 0,001$), в печени с $93,69 \pm 1,14$ до $46,02 \pm 2,73$ ($p < 0,001$), в почках с $66,04 \pm 2,99$ до $28,24 \pm 4,82$ ($p < 0,001$), в мышцах с $44,04 \pm 2,38$ до $29,74 \pm 2,28$ ($p < 0,001$) ммоль H_2O_2 /сек*г белка.

Существенное изменение активности каталазы происходило при модуляции L-аргинин-NO системы в условиях окислительного стресса путём ингибирования экспрессии

Таблица 2.6 – Изменение концентрации оснований Шиффа (отн. ЕД/мг) в тканях у крыс при окислительном стрессе в условиях модуляции L-аргинин-NO системы ($\bar{x} \pm S_x$)

Ткань	Контроль	ЛПС	L-NAME	ЛПС+ L-NAME	L-аргинин	L-аргинин + ЛПС	L-аргинин + ЛПС + L-NAME	L-NIL	ЛПС+ L-NIL	L- аргинин + ЛПС + L-NIL
n	10	9	6	10	8	9	9	8	9	9
сердце	157,4±4,37	313,6±11,5*	163,4±7,59#	282,1±12,90*	157,6±4,15#	298,0±6,30*	284,1±4,03*#	158,7±5,73#	270,4±8,70*#	246,4± 9,55*#
легкие	182,1±5,83	384,7±4,86*	184,2±4,30#	325,2±9,75*#	187,9±6,67#	366,0±4,27*#	307,4±4,67*#	191,5±3,61#	284,4±6,61*#	260,6± 7,74*#
печень	201,7±6,40	366,7±7,05*	196,3±7,62#	372,7±5,37*	188,0±4,13#	322,9±6,70*#	308,2±9,51*#	190,5±3,59#	294,8±5,49*#	283,2± 4,12*#
почки	155,1±3,50	343,3±5,60*	163,2±6,90#	324,6±3,89*#	148,0±5,44#	326,1±6,25*	320,9±4,43*#	160,5±2,13#	285,6±5,57*#	249,6± 6,70*#
мышцы	160,5±3,16	248,0±6,26*	159,8±5,12#	237,2±6,90*	163,8±3,60#	221,7±4,13*#	216,6±5,69*#	157,3±4,74#	217,7±5,07*#	215,8± 2,77*#

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС

иNOC введением L-NIL. В этом случае значение данного параметра, в сравнении с группой с ЛПС, увеличивалось в сердце на 50,1 % (т.е. было $31,19 \pm 2,14$, $p < 0,01$), в лёгких на 52,5 % (т.е. было $25,99 \pm 2,18$, $p < 0,05$), в печени на 35,1 % (т.е. было $62,16 \pm 3,59$, $p < 0,01$), в почках на 65,8 % (т.е. было $46,83 \pm 4,41$, $p < 0,02$) ммоль H_2O_2 /сек*г белка, в мышцах достоверных отличий не отмечалось. Значимого потенцирования этого эффекта L-NIL при предварительном введении L-аргинина на модели окислительного стресса не выявлено.

Выявлено уменьшение содержания α -токоферола при окислительном стрессе: в сердце с $191,9 \pm 3,57$ до $123,4 \pm 7,66$ ($p < 0,001$), в лёгких с $280,1 \pm 5,90$ до $126,3 \pm 9,94$ ($p < 0,001$), в печени с $135,6 \pm 3,76$ до $94,3 \pm 4,38$ ($p < 0,001$), в почках с $181,1 \pm 4,59$ до $141,8 \pm 5,69$ ($p < 0,001$), в мышцах с $188,6 \pm 5,70$ до $123,8 \pm 4,45$ ($p < 0,001$) нмоль/г. Введение веществ, изменяющих состояние L-аргинин-NO системы при окислительном стрессе, наиболее значимо проявлялось на концентрации α -токоферола при инъекции L-NIL. Этот показатель был больше по отношению к группе животных с окислительным стрессом в сердце на 20,4 % ($p < 0,02$), в лёгких на 51,5 % ($p < 0,001$), в печени на 20,4 % ($p < 0,01$), в почках на 12,6 % ($p < 0,02$), в мышцах на 28,9 % ($p < 0,001$). Сочетанная модуляция NO-продуцирующей системы организма посредством введения L-аргинина и L-NIL несколько усиливала защитный эффект последнего. Наиболее значимо оцениваемый показатель возрастал в лёгочной ткани с $191,3 \pm 7,37$ до $212,4 \pm 5,72$ ($p < 0,05$) нмоль/г.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение ЛПС в используемой дозе (внутривенно 5 мг/кг) вызывало развитие к 180-й мин. окислительного стресса, сопровождающегося ростом уровней ДК и ОШ в тканях сердца, лёгкого, печени, почек, в меньшей степени мышц и снижением в них активности каталазы и содержания α -токоферола. Модуляция L-аргинин-NO системы с помощью исходного субстрата этой системы L-аргинина, неселективного ингибитора NO-синтазы (L-NAME) не ослабляла нарушения прооксидантно-антиоксидантного состояния, и только введение селективного ингибитора NO-синтазы (L-NIL) обладало позитивным эффектом.

Активация ПОЛ приводит к уплотнению, деструкции липидного бислоя мембраны, увеличению её микровязкости, уменьшению белковолипидных контактов, изменению мембранной проницаемости и поверхностного заряда, в целом, – к нарушению функционального состояния мембранно-рецепторного комплекса [Степовая Е.А. и др., 2004]. При активации процессов ПОЛ отмечается нарушение связи мембранных фосфолипидов с белками, сопровождающееся повышением активности фосфолипаз, которые, в свою очередь, приводят к увеличению свободных жирных кислот – основному субстрату свободнорадикального окисления.

Как известно, при окислительном стрессе, индуцированном введением эндотоксина, наблюдается массивное высвобождение NO, изменяющего состояние сердечно-сосудистой системы (гипотензия, снижение периферического сопротивления, угнетение функции сердца) [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002]. Образующиеся АФА при окислительном стрессе действуют на специфические мишени, такие как тиоловые, лизиновые активные центры, функциональное состояние которых зависит от скорости образования и потребления NO тканями.

В то же время нитрозирующие реакции могут обеспечивать и защиту клеток посредством регуляции сигнальных путей. Тщательное изучение реакций нитрозирования в конкретных экспериментальных условиях позволит установить, как тонкое равновесие между окислительным и нитрозирующим стрессом может участвовать в генезе различных патологических процессов [Ridnour L.A., Thomas D.D., 2004]. Окислительный стресс при ишемии-реперфузии и вдыхании NO характеризуется пятикратным увеличением уровня нитрозоальбумина, выраженным его артериовенозным градиентом, уменьшающимся при введении СОД [Jourdeuil D., McCord J.M., 2004]. В защите от окислительного и нитрозирующего стресса важное значение отводится медь-цинксодержащей СОД (Cu, Zn-СОД), катализирующей дисмутацию O_2^{*-} в O_2 и H_2O_2 ; последняя восстанавливается селенсодержащим ферментом, GSH-пероксидазой, которая может действовать и как пероксинитритредуктаза [Klotz L.O., Kroncke K.D., 2003]. В этом аспекте интересны данные о том, что миоглобин защищает

сердце от нитрозирующего стресса, опосредуемого иNOC, наблюдаемого у трансгенных мышей с кардиоспецифической чрезмерной экспрессией данной изоформы этого фермента [Godecke A., Molojavuı A., 2003]. Эффект NO зависит от выраженности окислительного стресса. Если повышенное образование NO уравнивается умеренным ростом кислородных радикалов, то он оказывает полезный эффект, и, наоборот, при чрезмерном образовании радикалов, по отношению к нему, индуцируются повреждающие эффекты [Berges A., Van Nassauw L., 2003]. Под влиянием ингибитора NO-синтазы L-NAME в эритроцитах детей с астматическим бронхитом и церебральным параличом содержание ОШ увеличивалось почти в два раза [Васильева Е.М., Баканов М.И., 1999]. В литературе содержатся противоречивые данные об эффекте ингибирования NO-синтазы, что, возможно, связано с различиями в используемых моделях септического шока и применяемыми дозами ингибиторов синтеза NO, стадией, на которой вводятся корригирующие средства, и реальной местной концентрацией NO [Connelly L. et al., 2001].

Выявленные особенности эффекта модуляции L-аргинин-NO системы, а именно, наличие позитивного эффекта при введении L-NIL, отсутствие его при использовании других средств, влияющих на состояние данной системы, отражают сложный и многосторонний механизм участия NO в развитии окислительного стресса. Очевидно, в его генезе играет решающую роль экспрессия, прежде всего, иNOC.

2.3 Активность свободнорадикального окисления липидов в тканях при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и изменения NO-образующей функции

В физиологических условиях в организме существует динамическое равновесие между выработкой свободных радикалов и их нейтрализацией, а также различные по организации механизмы его поддержания, обозначаемые прооксидантно-антиоксидантным равновесием [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999]. Окислительный стресс представляет собой состояние напряжения антиоксидантных систем, возникающее в

результате либо высокого уровня образования активных кислородных метаболитов, либо недостаточной эффективности работы антиоксидантных механизмов [Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., 1993]. Флавоноиды, как известно, обладают антиоксидантным действием, защищая организм от свободных радикалов. К ним, в частности, относится кверцетин. Изменение механизмов антиоксидантной защиты в условиях окислительного стресса нами осуществлялось путём введения кверцетина ("Sigma"). Данный препарат обладает антиоксидантным эффектом, а также воздействует на синтез белков теплового шока. Нами использовалась методика введения кверцетина, применяемая рядом авторов [Манухина Е.Б. и др., 1996; Трифонов А.И. и др., 1999]. Данный препарат перед введением растворяли в растворе диметилсульфоксида. Вводили кверцетин крысам в дозе 5 мг/кг однократно, внутривентриально в течение 4-х дней.

Среди различных факторов АОС в последнее время отмечается интерес к физиологически активным полифенолам растительного происхождения из семейства флавоноидов, и прежде всего к кверцетину. Проявление свойств антиоксиданта у этого флавоноида основано на механизме искусственной ловушки свободных радикалов, что предполагает использование его как возможного перспективного фармакологического средства для борьбы с окислительным стрессом на клеточно-тканевом уровне [Будагова К.Р. и др., 2003]. Кверцетин рассматривается как один из регуляторов экспрессии белков теплового шока [Nosokawa N., Hirayoshi K., 1992]. Индукция данных белков в стрессированных клетках является важным адаптивным механизмом, обеспечивающим минимизирование опасных последствий различных «протеотоксических» воздействий. В то же время, белки теплового шока в реализации своего действия тесно интегрируются с L-аргинин-NO системой. Одним из механизмов защитного действия белков теплового шока является блокада гиперпродукции NO [Малышев И.Ю., Малышева Е.В., 1998].

В связи с изложенным, в экспериментах, представленных в данном разделе, нами решалась задача по оценке активности процессов ПОЛ и состояния АОС при введении кверцетина и L-

NIЛ в условиях окислительного стресса, индуцированного введением ЛПС, у лабораторных крыс-самцов. Для создания окислительного стресса, индуцированного ЛПС, у крыс используются различные дозы этого препарата (наиболее часто применяются дозы от 2 до 20 мг/кг) и способы введения [Zhang S. et al., 2000; Проскуряков С.Я. и др., 2004], позволяющие создавать модель данного вида стресса различной степени тяжести. Окислительный стресс у крыс, продолжительностью 180 мин., мы моделировали путём внутривенного введения ЛПС от *Escherichia coli* (Serotype 0111:B4) в дозе 5 мг/кг (“Sigma”), что обеспечивало его развитие средней степени тяжести.

В условиях окислительного стресса использование кверцетина характеризовалось уменьшением значения показателей активности ПОЛ. Для ДК в сердечной ткани оно составило 27,3 % ($p < 0,05$), в лёгочной ткани 27,8 % ($p < 0,05$), в печёночной ткани 30,0 % ($p < 0,01$), в почечной ткани 25,9 % ($p < 0,05$). Уменьшение содержания ОШ составило: 12,7 % ($p < 0,02$) в сердце, 20,3 % ($p < 0,001$) в лёгких, 17,8 % ($p < 0,001$) в печени, 16,0 % ($p < 0,001$) в почках, 13,1 % ($p < 0,001$) в мышцах (рисунки 2.5–2.9). Применение кверцетина в сочетании с L-NIL практически не изменяло состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса при этом виде стресса. Однако изучаемые параметры активности ПОЛ в группе животных, получавших кверцетин и ЛПС, были выше, чем в контрольной группе (рисунки 2.5–2.9). Так, уровень ДК был увеличен в сердце на 72,8 % ($p < 0,01$), в лёгких на 104,9 % ($p < 0,001$), в печени на 40,9 % ($p < 0,02$), в почках на 41,0 % ($p < 0,05$), в мышцах на 36,8 % ($p < 0,01$); содержание ОШ было выше в сердце на 74,0 % ($p < 0,001$), в лёгких на 68,5 % ($p < 0,001$), в печени на 49,4 % ($p < 0,001$), в почках на 86,0 % ($p < 0,001$), в мышцах на 34,4 % ($p < 0,001$).

Состояние АОС приведено в таблицах 2.7–2.8. Как видим, её состояние существенно изменялось у крыс при окислительном стрессе в условиях введения антиоксиданта флавоноидной природы. В условиях окислительного стресса кверцетин не оказывал выраженного протективного действия в сравнении с контрольной группой животных (не получавших ЛПС), что характеризовалось снижением активности каталазы и содержания

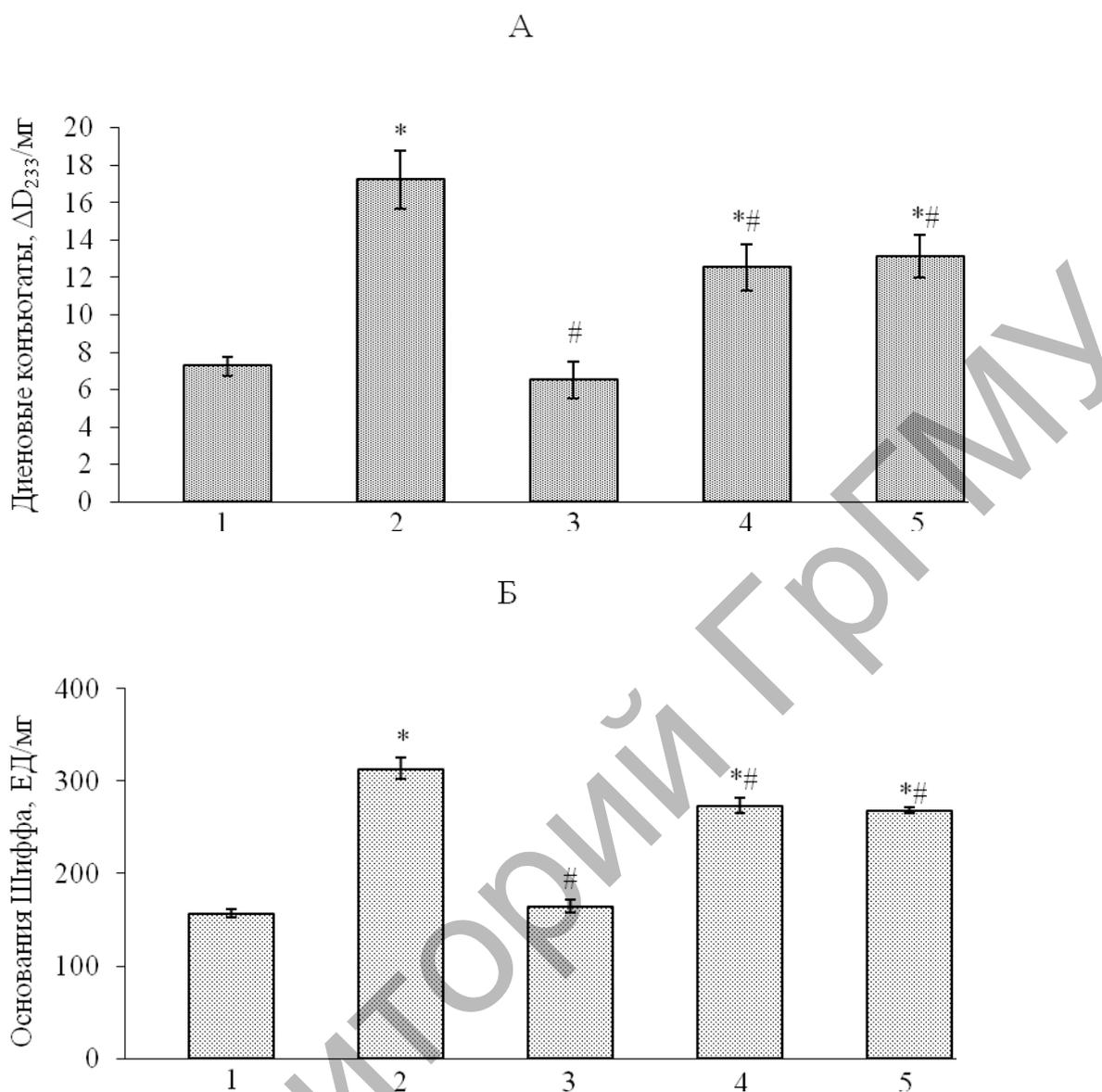


Рисунок 2.5 – Изменение содержания диеновых конъюгатов (А) и оснований Шиффа (Б) в сердце крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и L-лизина-NG-ацетамидина
 1- контроль, 2- ЛПС, 3- кверцетин, 4- кверцетин + ЛПС, 5- кверцетин + ЛПС + L-NIL.

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

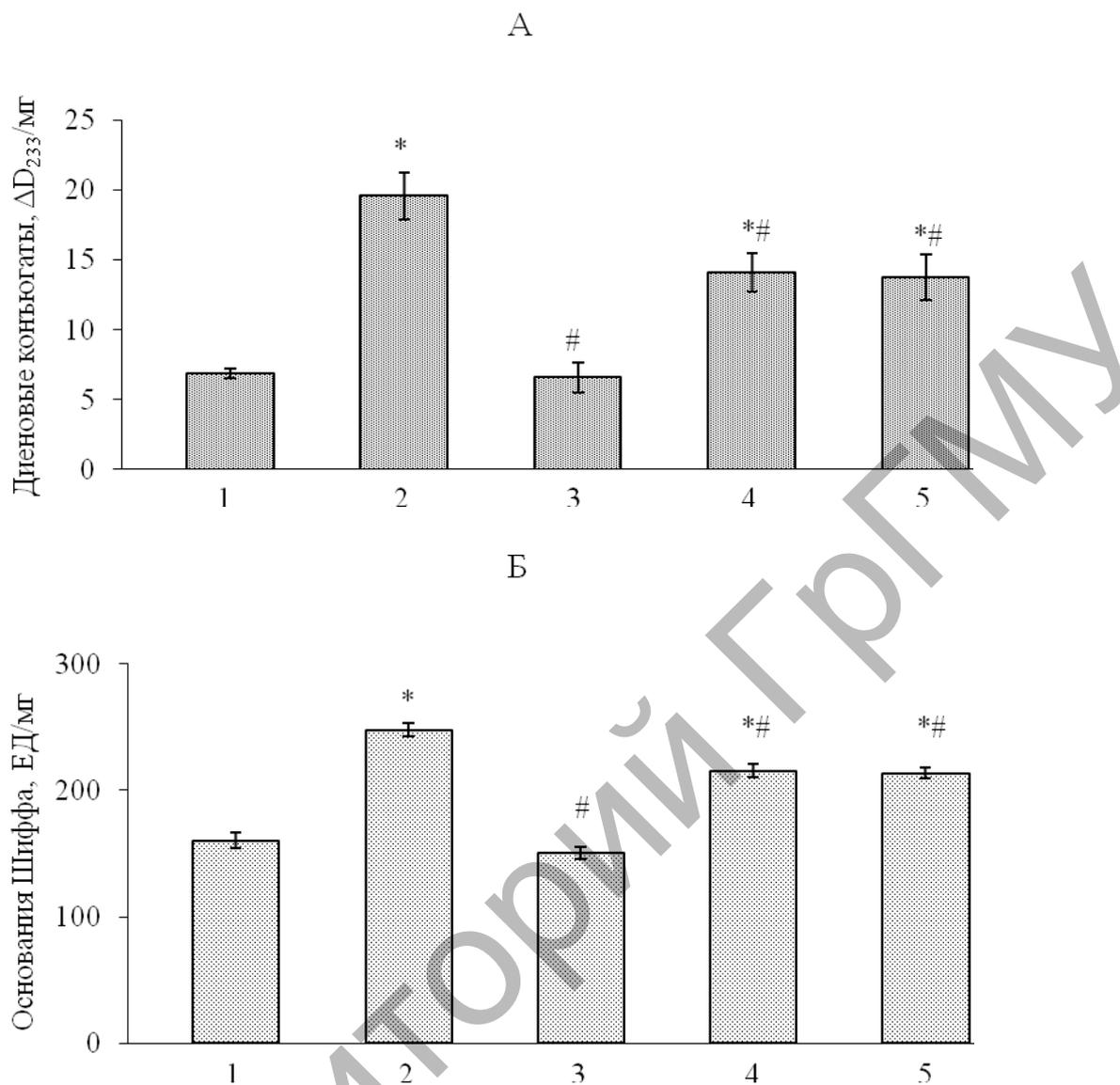
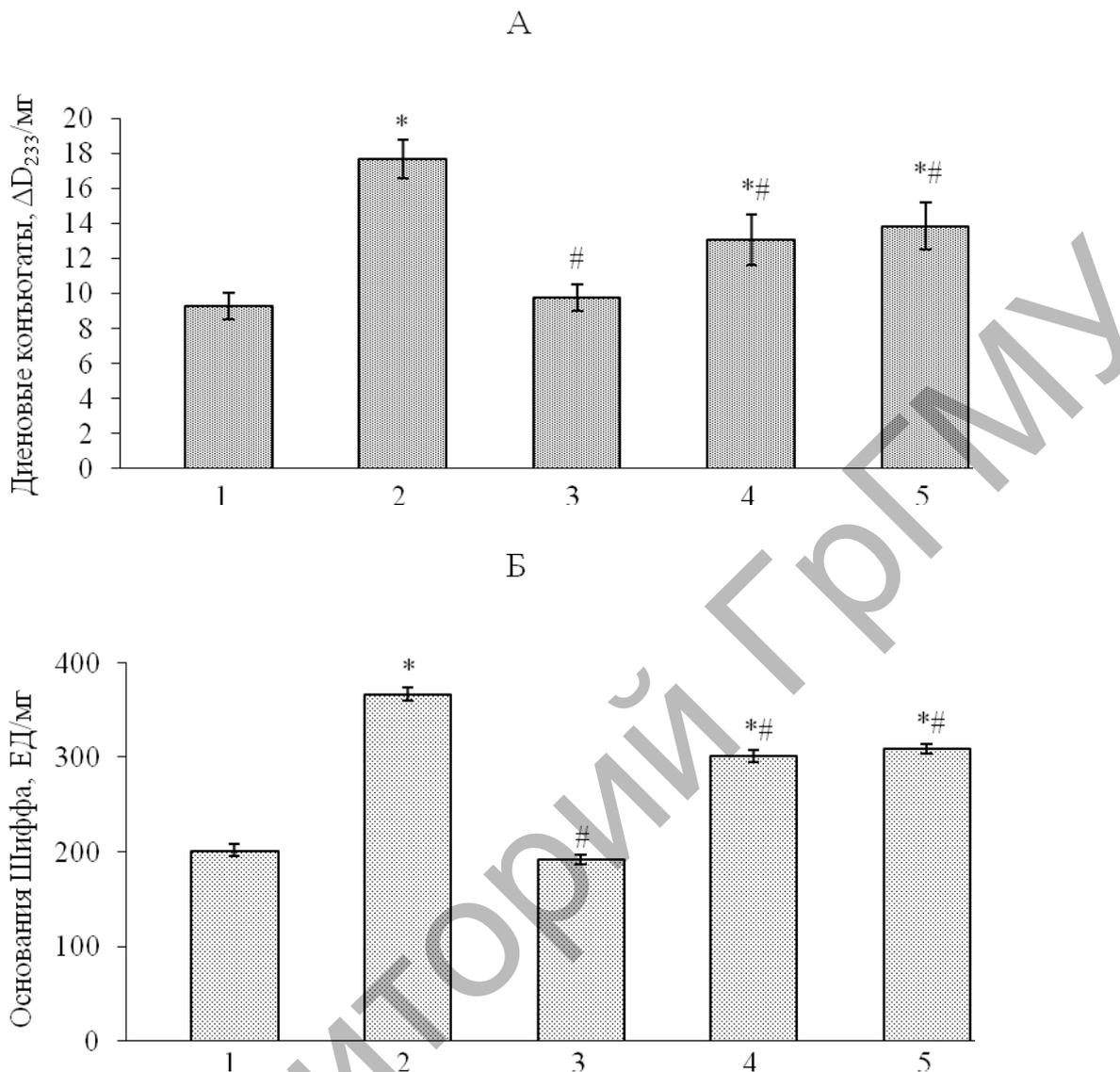


Рисунок 2.6 – Изменение содержания диеновых конъюгатов (А) и оснований Шиффа (Б) в легких крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и L-лизина-NG-ацетамидина
 1- контроль, 2- ЛПС, 3- кверцетин, 4- кверцетин + ЛПС, 5- кверцетин + ЛПС + L-NIL.

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.



Риснок 2.7 – Изменение содержания диеновых конъюгатов (А) и оснований Шиффа (Б) в печени крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и L-лизина-NG-ацетамидина
 1- контроль, 2- ЛПС, 3- кверцетин, 4- кверцетин + ЛПС, 5- кверцетин + ЛПС + L-NIL.

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

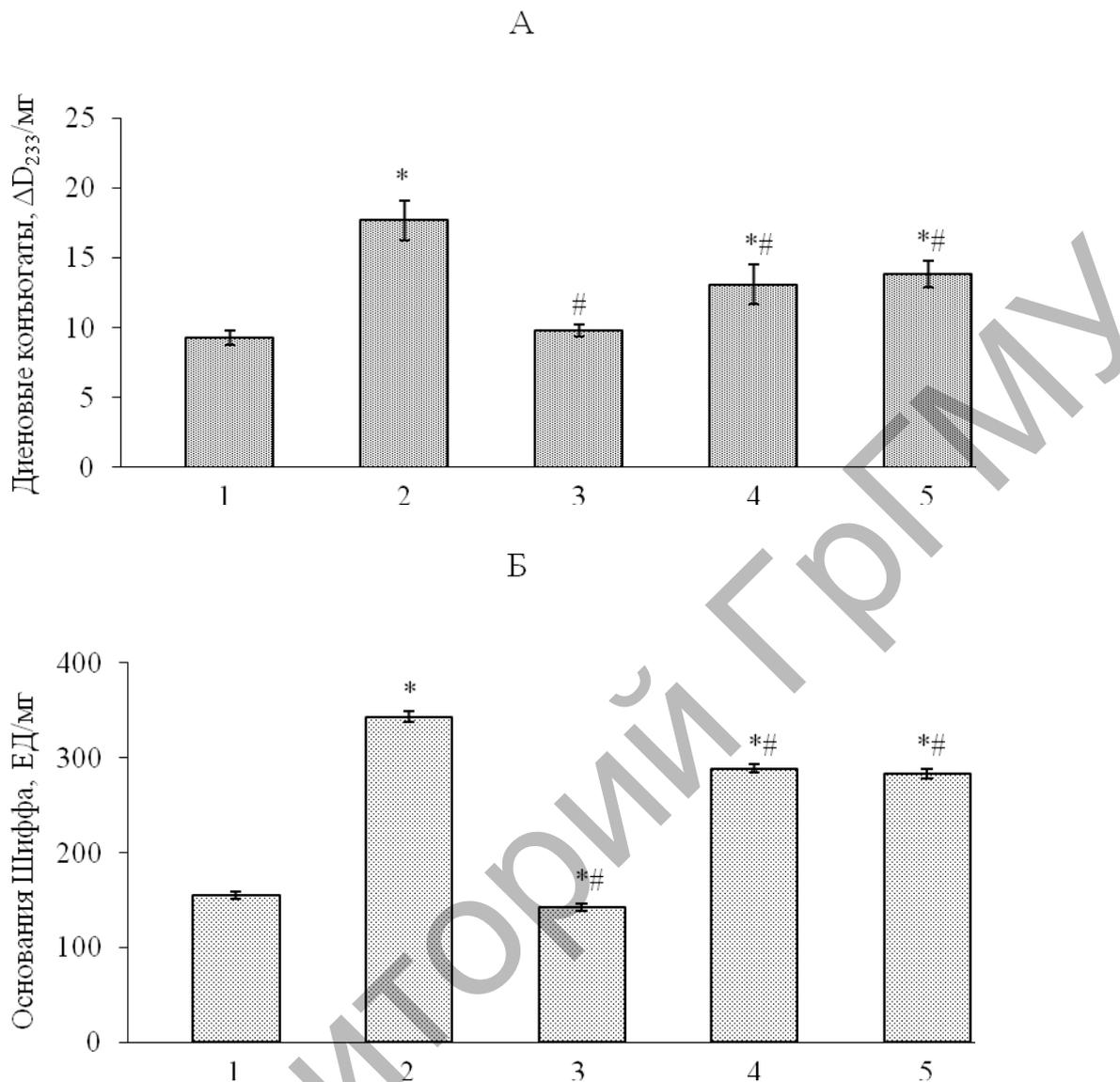


Рисунок 2.8 – Изменение содержания диеновых конъюгатов (А) и оснований Шиффа (Б) в почках крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и L-лизина-NG-ацетамидина
 1- контроль, 2- ЛПС, 3- кверцетин, 4- кверцетин + ЛПС, 5- кверцетин + ЛПС + L-NIL.

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

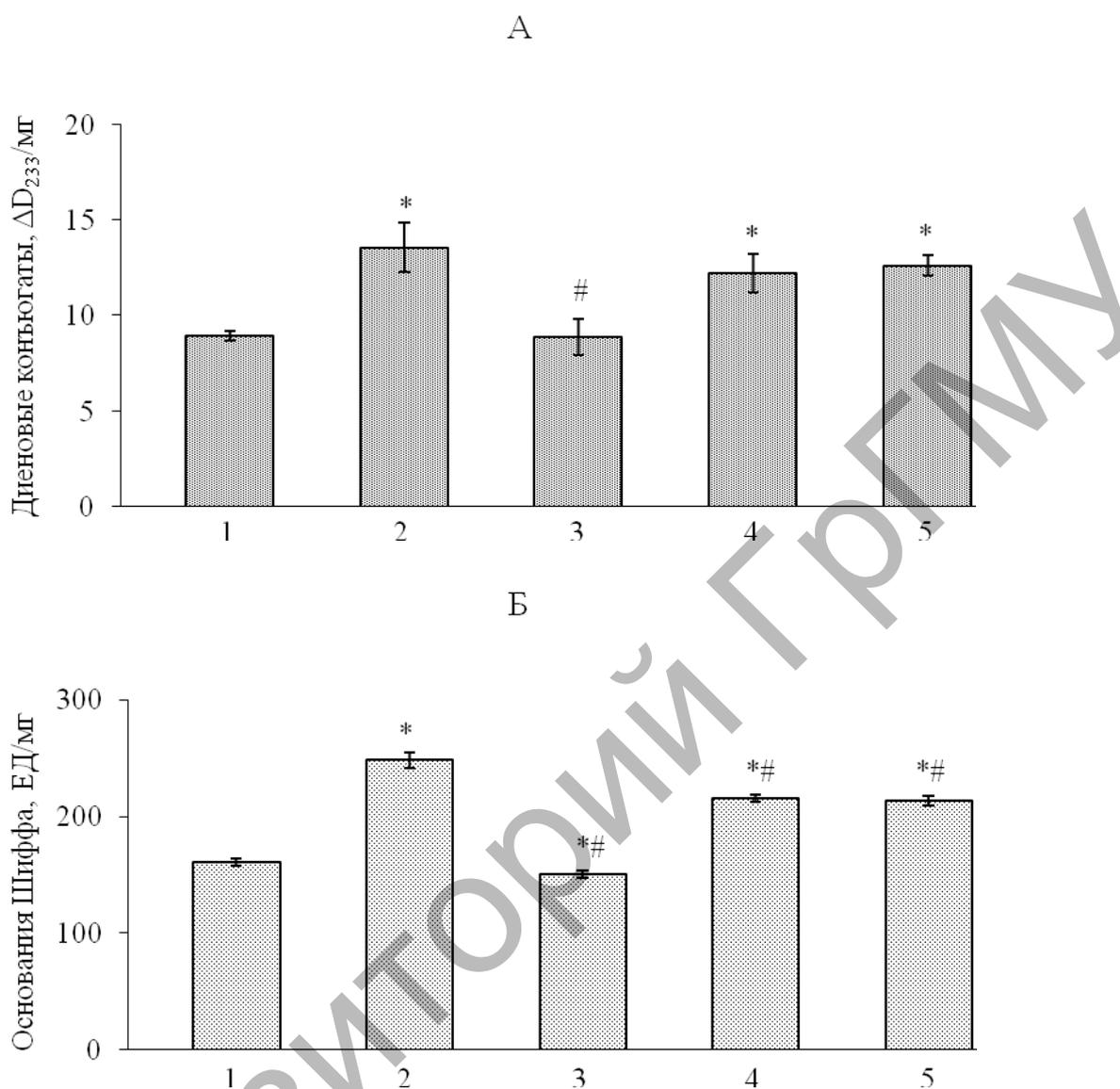


Рисунок 2.9 – Изменение содержания диеновых конъюгатов (А) и оснований Шиффа (Б) в мышцах крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и L-лизина-NG-ацетамина
 1- контроль, 2- ЛПС, 3- кверцетин, 4- кверцетин + ЛПС, 5- кверцетин + ЛПС + L-NIL.

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

Таблица 2.7 – Изменение активности каталазы (ммоль H₂O₂/сек*г белка) в тканях у крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и L-лизина-N^G-ацетамидина ($\bar{x} \pm S_x$)

Ткань	Контроль	ЛПС	Кверцетин	Кверцетин + ЛПС	Кверцетин + ЛПС + L-NIL
n	10	9	9	8	9
сердце	41,28±1,79	20,79±2,32*	43,85±1,69#	31,54±2,21*#	31,28±2,43*#
легкие	35,28±1,69	17,04±3,18*	35,22±3,77#	26,92±2,66*#	27,22±2,92*#
печень	93,69±1,14	46,02±2,73*	91,30±1,37#	57,79±4,67*#	63,90±3,63*#
почки	66,04±2,99	28,24±4,82*	64,09±2,36#	51,43±3,07*#	50,26±2,89*#
мышцы	44,04±2,38	29,74±2,28*	44,27±2,91#	36,62±4,12	39,44±3,35#

Примечание: *- p<0,05 по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

α-токоферола, соответственно, в сердце на 23,6 % (p<0,01) и 24,0 % (p<0,001), в лёгких на 23,7 % (p<0,02) и 34,1 % (p<0,001), в печени на 38,3 % (p<0,001) и 19,8 % (p<0,001), в почках на 22,1 % (p<0,01) и 12,8 % (p<0,001), в мышцах – на 16,1 % (p<0,001) уменьшалось достоверно только содержание α-токоферола. В то же время, защитный эффект кверцетина был достаточно выражен на процессы свободнорадикального окисления при окислительном стрессе, что проявлялось в значении соответствующих показателей АОС, характер изменения которых сопоставим с тем, что наблюдалось при введении селективного ингибитора NO-синтазы. Активность каталазы по отношению к крысам, получавшим только ЛПС, была в сердце выше на 51,7 % (p<0,01), в лёгких на 57,9 % (p<0,05), в печени на 25,6 % (p<0,05), в почках на 82,1% (p<0,001); увеличение содержания α-токоферола составило в сердце 18,2 % (p<0,05), в лёгких 46,2 % (p<0,001), в печени 15,4 % (p<0,05), в почках 11,4 % (p<0,05), в мышцах 27,9 % (p<0,001). В то же время, в условиях модуляции L-аргинин-NO системы (L-NIL), введение кверцетина существенного влияния на динамику изменения параметров АОС не оказывало.

Таблица 2.8 – Изменение концентрации α -токоферола (нмоль/г) в тканях у крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и L-лизина-N^G-ацетамидина ($\bar{x} \pm S_x$)

Ткань	Контроль	ЛПС	Кверцетин	Кверцетин + ЛПС	Кверцетин +ЛПС+ L-NIL
n	10	9	9	8	9
сердце	191,9 \pm 3,57	123,4 \pm 7,66*	186,2 \pm 2,24#	145,8 \pm 5,14*#	149,6 \pm 6,06*#
легкие	280,1 \pm 5,90	126,3 \pm 9,94*	267,4 \pm 6,46#	184,7 \pm 6,45*#	191,5 \pm 5,92*#
печень	135,6 \pm 3,76	94,3 \pm 4,38*	142,1 \pm 2,07#	108,8 \pm 4,01*#	117,6 \pm 3,83*#
почки	181,1 \pm 4,59	141,8 \pm 5,69*	188,0 \pm 3,49#	158,0 \pm 2,83*#	161,3 \pm 3,90*#
мышцы	188,6 \pm 5,70	123,8 \pm 4,45*	179,9 \pm 7,40#	158,3 \pm 4,15*#	151,7 \pm 3,76*#

Примечание: *- $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

Антиоксидантная активность флавоноидов обусловлена ингибированием фосфорилирования тирозина и активацией фосфолипазы D в активированных нейтрофилах МПО, а также связыванием переходных металлов, которые вовлечены в разложение H₂O₂ до гидроксильного радикала (реакция Габер-Вайса); кроме того, возможно образование комплексов флавоноидов с ионами металлов, снижающих тем самым их доступ к жирным кислотам фосфолипидов клеточных мембран [Федосова Н.Ф. и др., 2004]. Использование кверцетина, с одной стороны, обладающего антиоксидантным действием, а с другой – подавляющего экспрессию стресс-индуцированных белков теплового шока, и тем самым снижающего сопротивляемость стрессированных тканей, не столь однозначно [Будагова К.Р. и др., 2003].

Конститутивные белки теплового шока принимают участие в ряде клеточных процессов, таких как рост и дифференцировка клеток, функционирование стероидных рецепторов и тирозиновых киназ, репликация ДНК. Белки теплового шока, ограничивая агрегацию и денатурацию повреждённых протеинов, являются важным звеном клеточной системы, их репарации,

действие которой направлено на защиту процессов биосинтеза и структурной целостности [Малышев И.Ю., Малышева Е.В., 1998].

Изменения клеточных уровней АФК могут оказывать выраженное влияние на активность ионных каналов и функцию клеток по следующим механизмам: транскрипционной регуляции экспрессии генов, посттрансляционных модификаций белков, формирующих каналы (нитрозилирования, нитрования и окисления ключевых аминокислот), изменения нагрузки на сигнальные пути, что ведёт к изменению активности каналов или экспрессии генов каналов, изменению захвата или круговорота белков каналов (например, при активации NF-каппа кислородными радикалами с последующими изменениями протеосомальной деградации каналов) [Matalon S. et al., 2003].

Таким образом, полученные данные о характере изменения основных маркеров окислительного стресса при введении селективного ингибитора иNOC, демонстрируют вклад NO в защитные механизмы на действие эндотоксина и могут быть использованы для создания путей коррекции этих состояний. Проведенные исследования показали потенциальное повреждающее действие окислительного стресса, которое может быть ослаблено при соответствующем вмешательстве. Введение L-NIL, кверцетина ослабляло воспроизведение окислительного стресса. В условиях, когда имеет место снижение мощности АОС организма, на фоне нарушения функционирования мембранных электрон-транспортных цепей, усиления радикалообразования в митохондриях и микросомах, роста АФК и локального накопления карбонилированных белков, в реализации механизмов адаптации приобретают значение физиологические факторы, усиливающие устойчивость к стресс-воздействию. Учитывая вездесущую природу АФК внутри эукариотных клеток и множество структур, развившихся для их обезвреживания, важно отметить, что понимание путей ослабления патологических последствий окислительного стресса может быть достигнуто с учётом того, какой механизм повреждён, задействован в его реализации.

Выявленный характер изменения показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса при окислительном

стрессе, индуцированном введением ЛПС, а также выраженность этих изменений в условиях модуляции как L-аргинин-NO системы, так и введения кверцетина, отсутствие потенцирования их эффекта, определяется, вероятно, близкими механизмами, лежащими в основе генеза сложного комплекса нарушений при этом состоянии, обуславливающих изменение гомеостаза всего организма.

2.4 Активность процессов перекисного окисления липидов и показатели антиоксидантного состояния в течение первых 5 суток после введения липополисахарида

В нормальных аэробных условиях жизнедеятельности организма активность процессов ПОЛ и АОС уравнивают друг друга. Избыточное образование первичных, промежуточных и конечных продуктов ПОЛ оказывает повреждающее действие на уровне мембран и способствует деструкции клеток [Киричек Л.Т., Зубова Е.О., 2004]. Защиту против действия свободных радикалов обеспечивают антиоксиданты: неферментативные и ферментативные. При развитии окислительного стресса увеличивается соотношение окисленного/восстановленного GSH, изменяется метиониновый обмен с подавлением реакции трансметиляции, что приводит к повышению уровня гомоцистеина [Semmler A. et al., 2008].

ЛПС является компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий, состоящей из полисахаридной части (наружной полисахаридной зоны и внутренней гликолипидной), ковалентно связанной с консервативной липидной (длинная цепь жирных кислот), именуемой липидом А [Рябиченко Е.В. и др., 2004]. В литературе для изучения влияния ЛПС на функциональное состояние организма используются различные дозы от 0,5 до 1000,0 мкг/кг и более. Так, после введения ЛПС в дозе 0,5 мкг/кг в течение первого часа отмечается повышение температуры тела и вазоконстрикция сосудов кожи [Blessing W.W., 2004]. Внутривенная инъекция данного токсина (0,5–10,0 мкг/кг), наряду с увеличением температуры, вызывает повышение продукции свободных радикалов в тканях, увеличение уровня ФНО- α в плазме [Tsai

C.S. et al., 2006], в то время как в дозе 100 мкг/кг внутривенно – усиление аортальной сократимости [Bawolak M.T. et al., 2008]. Tzanela M. et al. [2007] в своих экспериментах использовали ЛПС в дозе 380 мкг/кг для изучения его влияния на гемодинамические и метаболические показатели. В работах Wiel E. et al. [2000, 2004], Pu Q. et al. [2001] показано введение ЛПС *E. coli* (500 мкг/кг) внутривенно болюсно в течение 5 суток, характеризующееся развитием метаболического ацидоза, суживанием эндотелиальных клеток, вазодилатацией и развитием эндотелиальной дисфункции. Инъекцией данного фактора в дозе 1400 мкг/кг в подпаутинное пространство также инициировали изменения, эквивалентные субарахноидальному кровоизлиянию [Recinos P.F. et al., 2006], а при дозе 1000 мкг/кг наблюдали в тканях кроликов микроциркуляторную гипоксию, вазодилатацию, нарушение клеточного метаболизма. Известны и более высокие дозы ЛПС (внутривенно 2000 мкг/кг, 5000 мкг/кг), приводящие к повреждению клеток сосудистого эндотелия, повышению внутрисосудистого свертывания, снижению артериального давления, метаболическим нарушениям, увеличению продукции NO, эндотоксемии и эндотоксическому шоку [Akbulut H. et al., 2005; Elmas M. et al., 2006].

Сорокин А.В. [1965] указывает, что токсическое действие липополисахаридных пирогенов проявляется при введении его животным в больших дозах: если оптимальная пирогенная доза для кролика равна 1 мкг/кг, то летальное действие проявляется при многократном её увеличении (до 50 мг/кг). Как известно, ЛПС является промотором оксидативного стресса при введении его в дозе 100–500 мкг/кг [Lomnitski L. et al., 2000; Matsuda N. et al., 2002; Tzanela M. et al., 2007], а выше 1000 мкг/кг вызывает эндотоксемию и септический шок [Akbulut H. et al., 2005; Elmas M. et al., 2006]. Следует также учитывать особенности различных сероваров ЛПС *E. coli*. Выделяют следующие виды серотипов ЛПС *E. coli*: O111:B4, O127:B8, O26:B6, O55:B5. Так, Serotype O111:B4 преимущественно используют в качестве индуктора окислительного стресса, а Serotype O55:B5 в основном для создания модели эндотоксинового шока [Lomnitski L. et al., 2000; Wiel E. et al., 2000; Wiel E. et al., 2004].

В данном разделе представлен характер изменений показателей ПОЛ и АОС в образцах тканей (легкие, сердце, печень, почки и аорта) и крови, а также уровень гомоцистеина в плазме через 12 часов, через 1 и 5 суток после введения ЛПС [Шульга Е.В., Зинчук В.В., 2009].

Результаты теста Краскела-Уоллиса свидетельствуют о наличии статистически значимой взаимосвязи между свободнорадикальными процессами, АОС и временем после инъекции ЛПС. В таблицах 2.9 и 2.10 представлены изменения показателей ПОЛ в тканях и крови на протяжении 5 суток после введения ЛПС. Через 12 часов наблюдается увеличение уровня ДК, ОШ в тканях и крови, но уже через сутки отмечается снижение активности свободнорадикальных процессов, а через 5 суток значения ДК и ОШ в тканях и крови приближаются к контролю. Так, через 12 часов после введения ЛПС уровень ДК увеличивается на 55,1% ($p < 0,008$) в аорте, на 34,1% ($p < 0,008$) в легких и на 45,3% ($p < 0,008$) в почках, а также на 97,3% ($p < 0,008$) в плазме и 16,7% ($p < 0,008$) в эритроцитах по отношению к контрольным величинам. Увеличение значений ОШ происходит во всех исследуемых тканях и крови через 12 часов после введения ЛПС. При этом данный показатель повышается в сердце, легких и почках на 33,9%, 87,9%, и 18,8% ($p < 0,008$), соответственно, а также в эритроцитах на 102,6% ($p < 0,008$) в сравнении с контролем.

Одновременно с процессами активации ПОЛ наблюдается угнетение АОС в тканях (таблица 2.11 и рисунок 2.10). Через 12 часов после введения ЛПС концентрация α -токоферола снижается на 28,8% ($p < 0,008$) в аорте и на 42,8% ($p < 0,008$) в сердце по отношению к контролю. Наблюдается также уменьшение содержания α -токоферола на 48,5% ($p < 0,008$) в плазме в сравнении с контролем (таблица 2.10). Через сутки отмечается увеличение уровня α -токоферол в исследуемых тканях и крови по отношению к контрольной группе, но значения остаются сниженными. Через пять суток они приближаются к контролю.

Таблица 2.9 – Характер изменений показателей перекисного окисления липидов в тканях кроликов после введения липополисахарида

Показатель		Контроль	После введения ЛПС через			Критерий Краскела-Уоллиса
			12 часов	1 сутки	5 суток	
n		6	8	6	5	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\Gamma$	Аорта	2,1±0,02	3,2±0,13*	2,9±0,18*	2,8±0,24	p=0,004
	Сердце	2,3±0,14	2,9±0,13	2,7 (2,6-3,0)	2,7±0,17	p=0,072
	Легкие	2,1±0,05	2,8±0,17*	2,1 (2,1-2,3)	2,2±0,06	p=0,004
	Печень	2,1 (2,1-2,7)	3,4 (3,1-4,4)*	2,5±0,08 [#]	2,5±0,08 [#]	p=0,001
	Почки	2,6±0,17	3,8±0,19*	2,9±0,26	2,6 (2,6-2,9) [#]	p=0,007
Основания Шиффа, отн. ЕД/Г	Аорта	167,0±9,38	309,9 (304,1-338,3)*	351,4±12,03*	262,8±7,58* [#]	p<0,001
	Сердце	410,2±8,03	549,3±11,37*	514,7±12,70*	447,1±11,11 [#]	p<0,001
	Легкие	227,0±4,56	426,6±8,13*	381,3±13,0*	278,7±8,95* [#]	p<0,001
	Печень	233,2±10,15	365,6 (332,2-371,4)*	338,8±9,60*	271,2±5,54 [#]	p<0,001
	Почки	231,5±7,45	275,0±6,87*	256,2±10,60	241,6±4,05 [#]	p=0,006

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к контролю (p<0,008) – *, по отношению к группе животных, получавших липополисахарид, через 12 часов (p<0,008) – [#] (критерий Манна-Уитни)

Таблица 2.10 – Изменение показатели прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови кроликов после введения липополисахарида

Показатель		Контроль	После введения ЛПС через			Критерий Краскела-Уоллиса
			12 часов	1 сутки	5 суток	
n		6	8	6	5	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\text{мл}$	Плазма	0,34±0,02	0,68± 0,07*	0,51 (0,50-0,52)*	0,32±0,01 [#]	p<0,001
	Эритроциты	4,64±0,18	5,42± 0,16*	4,67 (4,63-4,86)	4,60±0,07 [#]	p=0,003
Основания Шиффа, отн. ЕД/мл	Плазма	22,6±1,07	27,1±1,33	21,6±1,11	21,0±1,19 [#]	p=0,019
	Эритроциты	99,5±1,82	201,6±5,27*	120,1±2,5* [#]	116,1±9,54 [#]	p<0,001
α -токоферол, мкмоль/л	Плазма	20,3±0,3	10,5±0,29*	13,0±0,14* [#]	20,0±0,34 [#]	p<0,001
Каталаза, ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/$ мин/г Нв	Эритроциты	24,8±0,70	30,9±0,81*	28,5±0,68	24,8 (24,8-25,4) [#]	p=0,001

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределениях; изменения статистически значимы по отношению к контролю (p<0,008) – *, по отношению к группе животных, получавших липополисахарид, через 12 часов (p<0,008) – [#] (критерий Манна-Уитни)

Таблица 2.11 – Изменение содержания α -токоферола в тканях кроликов в течение 5 суток после введения липополисахарида

Показатель		Контроль	После введения ЛПС через			Критерий Краскела-Уоллиса
			12 часов	1 сутки	5 суток	
n		6	8	6	5	
α -токоферол, мкмоль/г	Аорта	11,3±0,15	8,0±0,22*	9,0±0,25*	10,4±0,25 [#]	p<0,001
	Сердце	8,5±0,11	4,8±0,25*	6,5 (6,3-6,8)* [#]	8,2±0,19 [#]	p<0,001
	Легкие	8,1±0,26	7,1±0,24	7,6±0,29	7,9±0,29	p=0,092
	Печень	9,0 (8,3-9,6)	5,6 (4,0-6,0)*	7,0±0,14* [#]	8,3±0,23 [#]	p<0,001
	Почки	9,0 (8,2-9,7)	6,7±0,25*	7,9±0,14 [#]	8,3±0,32 [#]	p<0,001

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к контролю (p<0,008) – *, по отношению к группе животных, получавших липополисахарид, через 12 часов (p<0,008) – [#] (критерий Манна-Уитни)

Во всех тканях активность каталазы снижается уже через 12 часов после введения ЛПС: в аорте на 74,0% (p<0,008), в сердце на 58,3% (p<0,008), в легких на 77,1% (p<0,008), в печени на 67,7% (p<0,008) и в почках на 52,1% (p<0,008) (рисунок 2.10). Через сутки после введения ЛПС наблюдается её дальнейшее снижение в сердце, а в других тканях показатель повышается или остается на том же уровне в сравнении с контролем. Через пять суток активность каталазы увеличивается и приближается к значению контрольной группы. Однако в эритроцитах через 12 часов после введения ЛПС отмечается повышение активности каталазы на 24,8% (p<0,008), а затем, на протяжении 5 суток, – снижение, до достижения цифр контроля (таблица 2.10).

При исследовании концентрации гомоцистеина в плазме крови (рисунок 2.11) отмечается изменение данного показателя в течение 5 суток (критерий Краскела-Уоллиса, p=0,027). Установлено, что через 12 часов после введения ЛПС содержание гомоцистеина повышается с 6,30±0,36 до 10,97±0,89 мкмоль/л (p<0,008) в сравнении с контролем, а в дальнейшем наблюдается

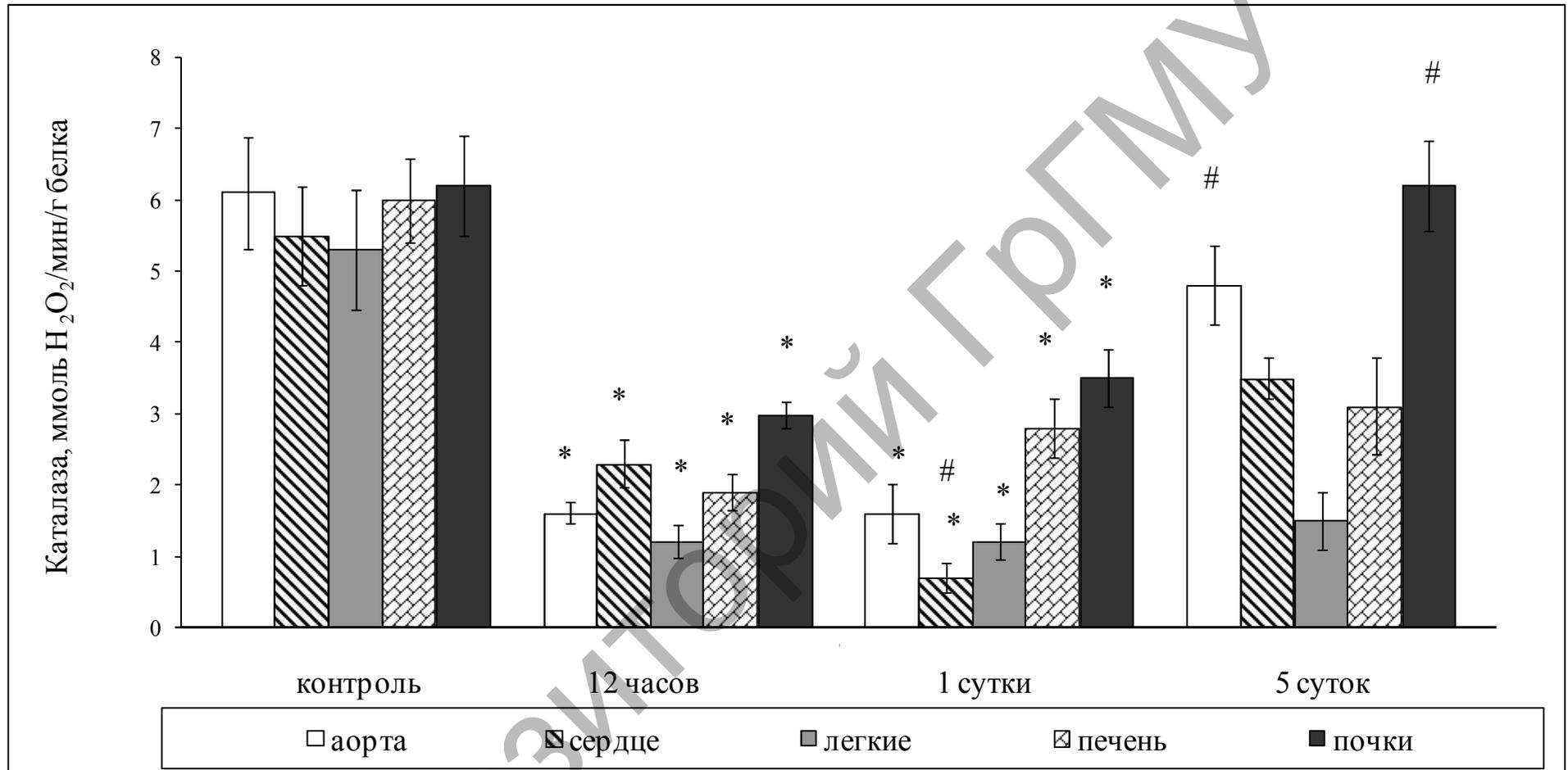


Рисунок 2.10 – Изменение активности каталазы в тканях в течение 5 суток после введения липополисахарида

Примечание – Изменения статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,008$) – *, по отношению к группе животных, получавших липополисахарид, через 12 часов ($p < 0,008$) – # (критерий Манна-Уитни)

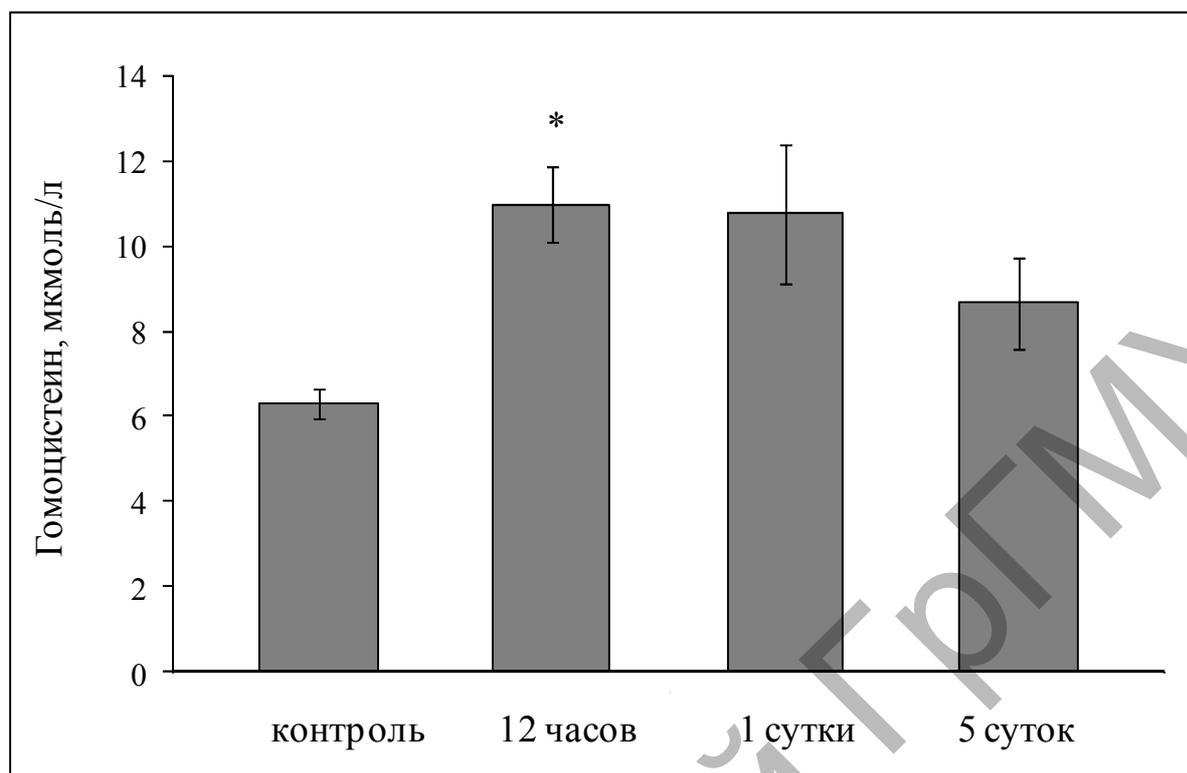


Рисунок 2.11 – Изменение содержания гомоцистеина в плазме крови кроликов в течение 5 суток после введения липополисахарида

Примечание – Изменения статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,008$) – * (критерий Манна-Уитни)

снижение, и через 5 суток его значение приближается к контролю.

Таким образом, после введения ЛПС отмечается сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону усиления свободнорадикальных процессов в тканях и крови, повышение уровня гомоцистеина в течение первых пяти суток. Однако наиболее выраженные изменения отмечаются через 12 часов после введения ЛПС.

АФК являются важными медиаторами повреждения клеток, макромолекул, вне- и внутриклеточных регуляторных процессов при эндотоксемии [Victor V.M. et al., 2005]. Учитывая их роль в осуществлении физиологических процессов в организме, важным является исследование механизмов, которые способны регулировать внутриклеточный уровень АФК, создавая условия, необходимые для поддержания клеточного гомеостаза и защиты тканей и органов от развивающегося окислительного стресса. Проведенные исследования показывают, что через 12 часов после введения ЛПС отмечаются наиболее значимые изменения КТФ

крови, уровня нитрат/нитритов и гомоцистеина, значений прооксидантно-антиоксидантного равновесия, а к 5 суткам показатели приближаются к контролю.

Как известно, гемоглобин, изменяя своё сродство к кислороду, может регулировать поток кислорода в ткани в соответствии с их потребностью в нём, и тем самым предупреждать избыточное его использование для свободнорадикального окисления, что позволяет рассматривать СГК как один из факторов, участвующих в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма [Зинчук В.В., 2005]. В этом аспекте интересно отметить, что после введения ЛПС, который снижает интенсивность капиллярного кровотока, ухудшает кровоснабжение тканей и усиливает системную гипоксию, трансфузия эритроцитов крови со сниженным СГК увеличивает выживаемость мышей [Huang F. et al., 2005].

Отмечаемое повышение уровня гомоцистеина способствует увеличению продукции АФК, активации NF- κ B [Chang L. et al., 2007], приводя к дисбалансу продукции NO [Lentz S.R., 2005]. ЛПС является мощным индуктором экспрессии иNOC, которая присутствует прежде всего в макрофагах и моноцитах. В наших исследованиях отмечается увеличение содержания нитрат/нитритов, что косвенно указывает на увеличение образования NO, который в реакции с супероксид-анионом образует пероксинитрит, обладающий выраженными окислительными свойствами, а также способностью тормозить экспрессию и активность эNOC [Марков Х.М., 2001]. Скорость этой реакции контролирует АОС, но под действием ЛПС происходит сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону усиления свободнорадикальных процессов в крови и тканях: легких, сердце, печени, почках и аорте.

2.5 Оценка действия аминогуанидина на активность процессов перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантного статуса организма через 12 часов после введения липополисахарида

Для коррекции L-аргинин-NO-системы использовали ряд селективных ингибиторов иNOC. АГ в различных дозировках (от

30 до 100 мг/кг) вводили для уменьшения нарушений почечной функции при эндотоксемии (ЛПС в дозе 400 мкг/кг) у кроликов [Wang L. et al., 2004]. Н. Takano et al. [1998] применяли АГ (150 мг/кг) подкожно за 30 мин. до окклюзии коронарных артерий. В работе других исследователей АГ в дозе 300 мг/кг вводили подкожно для изучения поздних эффектов при ишемии-реперфузии сердца [Wildhirt S.M. et al., 1999], а также для предотвращения окислительных повреждений миокарда при моделировании инфаркта [Dana A. et al., 2001]. Для проведения экспериментальной части нашей работы, получения предполагаемых результатов и обеспечения необходимой модификации генерации NO в организме было более приемлемо использовать селективный ингибитор иNOC. Коррекцию L-аргинин-NO-системы проводили АГ фирмы «Aldrich» (366494-100G), который разводили в 0,9% NaCl и доводили раствор до рН 7,4 с помощью 0,1 N NaOH, а затем вводили кроликам подкожно в дозе 300 мг/кг за 1 час до инъекции ЛПС. Данный метод был использован рядом авторов [Pagel P.S. et al., 2008; Wang C. et al., 2006; Krolikowski J.G. et al., 2006] у кроликов при ишемии-реперфузии миокарда.

АГ уменьшает нарушение функции почек у кроликов через NO-зависимый механизм после введения ЛПС [Wang L. et al., 2004], снижает уровень МДА в крови и тканях крыс, экспрессию иNOC [Ogetman Z. et al., 2006]. В данном разделе оценено действие АГ на активность процессов ПОЛ и состояние антиоксидантного статуса в образцах тканей (аорта, сердце, легкие, печень и почки) и крови, а также на уровень гомоцистеина в плазме через 12 часов после введения ЛПС [Шульга Е.В., 2009].

При окислительном стрессе, индуцированном ЛПС, отмечается нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в сторону активации свободнорадикальных процессов в тканях и крови. В таблице 2.12 отображено, что введение АГ перед инъекцией ЛПС способствует снижению прироста уровня ДК в аорте, сердце, печени и почках. При этом отмечается уменьшение данного показателя на 14,8% ($p < 0,05$) в сердце и на 16,7% ($p < 0,05$) в почках. Показано также снижение содержания МДА во всех исследуемых тканях, в частности, уменьшение на 20,3% ($p < 0,05$) в сердце и на 16,3% ($p < 0,05$) в печени в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС. Уровень продуктов ПОЛ

Таблица 2.12 – Характер изменений показателей перекисного окисления липидов и уровня α -токоферола в тканях кроликов после введения аминогуанидина и липополисахарида

Показатель		Липополисахарид	Аминогуанидин+ липополисахарид	Критерий Манна- Уитни
n		8	9	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\Gamma$	Аорта	3,2 \pm 0,13	2,6 (2,5-2,8) [#]	p=0,008
	Сердце	2,9 \pm 0,13	2,5 \pm 0,08 [#]	p=0,034
	Легкие	2,8 \pm 0,17	2,5 \pm 0,15	p=0,211
	Печень	3,4 (3,1-4,4)	3,0 \pm 0,12 [#]	p=0,021
	Почки	3,8 \pm 0,19	3,1 \pm 0,12 [#]	p=0,016
Малоновый диальдегид, мкмоль/г	Аорта	4,0 \pm 0,11	3,2 (3,1-3,3) [#]	p<0,001
	Сердце	2,6 \pm 0,11	2,1 \pm 0,11 [#]	p=0,012
	Легкие	4,2 (3,8-4,3)	2,9 \pm 0,18 [#]	p=0,001
	Печень	1,7 \pm 0,08	1,4 \pm 0,06 [#]	p=0,021
	Почки	4,2 (4,0-4,3)	2,8 \pm 0,18 [#]	p<0,001
α -токоферол, мкмоль/г ткани	Аорта	8,0 \pm 0,22	9,2 \pm 0,16 [#]	p=0,001
	Сердце	4,8 \pm 0,25	7,6 \pm 0,21 [#]	p<0,001
	Легкие	7,1 \pm 0,24	7,9 \pm 0,18 [#]	p=0,039
	Печень	5,6 (4,0-6,0)	6,6 \pm 0,21 [#]	p=0,002
	Почки	6,7 \pm 0,25	7,8 \pm 0,18 [#]	p=0,004

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни)

снижается также и в крови (таблица 2.13). Содержание ДК уменьшается в плазме на 44,6% (p<0,05) и в эритроцитах на 8,9% (p<0,05), а МДА – на 52,0% (p<0,05) в плазме по отношению к группе кроликов, получавших только ЛПС.

Одновременно со снижением активности свободно-радикальных процессов отмечается повышение уровня α -токоферола во всех тканях после введения АГ и ЛПС (таблица 2.12). Концентрация данного антиоксиданта увеличивается на 14,6% (p<0,05) в аорте, 57,7% (p<0,05) в сердце, 12,2% (p<0,05) в легких и на 16,6% (p<0,05) в почках в сравнении с группой животных, которым вводили только ЛПС.

Таблица 2.13 – Характер изменений показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, уровня гомоцистеина в крови кроликов после введения амингуанидина и липополисахарида

Показатель		Липополисахарид	Аминогуанидин+ липополисахарид	Критерий Манна- Уитни
n		8	9	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\text{мл}$	Плазма	0,68±0,07	0,38±0,02 [#]	p=0,001
	Эритроциты	5,42± 0,16	4,93±0,16 [#]	p=0,049
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	Плазма	1,81±0,06	0,87±0,09 [#]	p<0,001
	Эритроциты	23,97 (22,69- 24,23)	17,66±0,23 [#]	p<0,001
α -токоферол, мкмоль/л	Плазма	10,5±0,29	18,6±0,20 [#]	p<0,001
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ / мин/г Hb	Эритроциты	30,9±0,81	23,5±0,68 [#]	p<0,001
Гомоцистеин, мкмоль/л	Плазма	10,97±0,89	7,70±0,77 [#]	p=0,027

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни)

В данных условиях отмечается повышение активности каталазы с 1,6±0,15 до 3,5±0,21 ммоль H₂O₂/мин/г белка (p<0,05) в аорте, с 2,3±0,33 до 3,0±0,16 ммоль H₂O₂/мин/г белка (p<0,05) в сердце, с 1,2±0,23 до 2,7±0,17 ммоль H₂O₂/мин/г белка (p<0,05) в легких, с 1,9±0,25 до 2,8±0,19 ммоль H₂O₂/мин/г белка (p<0,05) в печени, с 3,0±0,19 до 3,9±0,13 ммоль H₂O₂/мин/г белка (p<0,05) в почках по отношению к группе животных, получавших только ЛПС (рисунок 2.12).

В таблице 2.13 показано, что после применения АГ и ЛПС увеличивается также содержание α -токоферола в плазме на 77,9% (p<0,05), однако в эритроцитах активность каталазы снижается на 23,9% (p<0,05) в сравнении с группой кроликов, которым вводили только ЛПС.

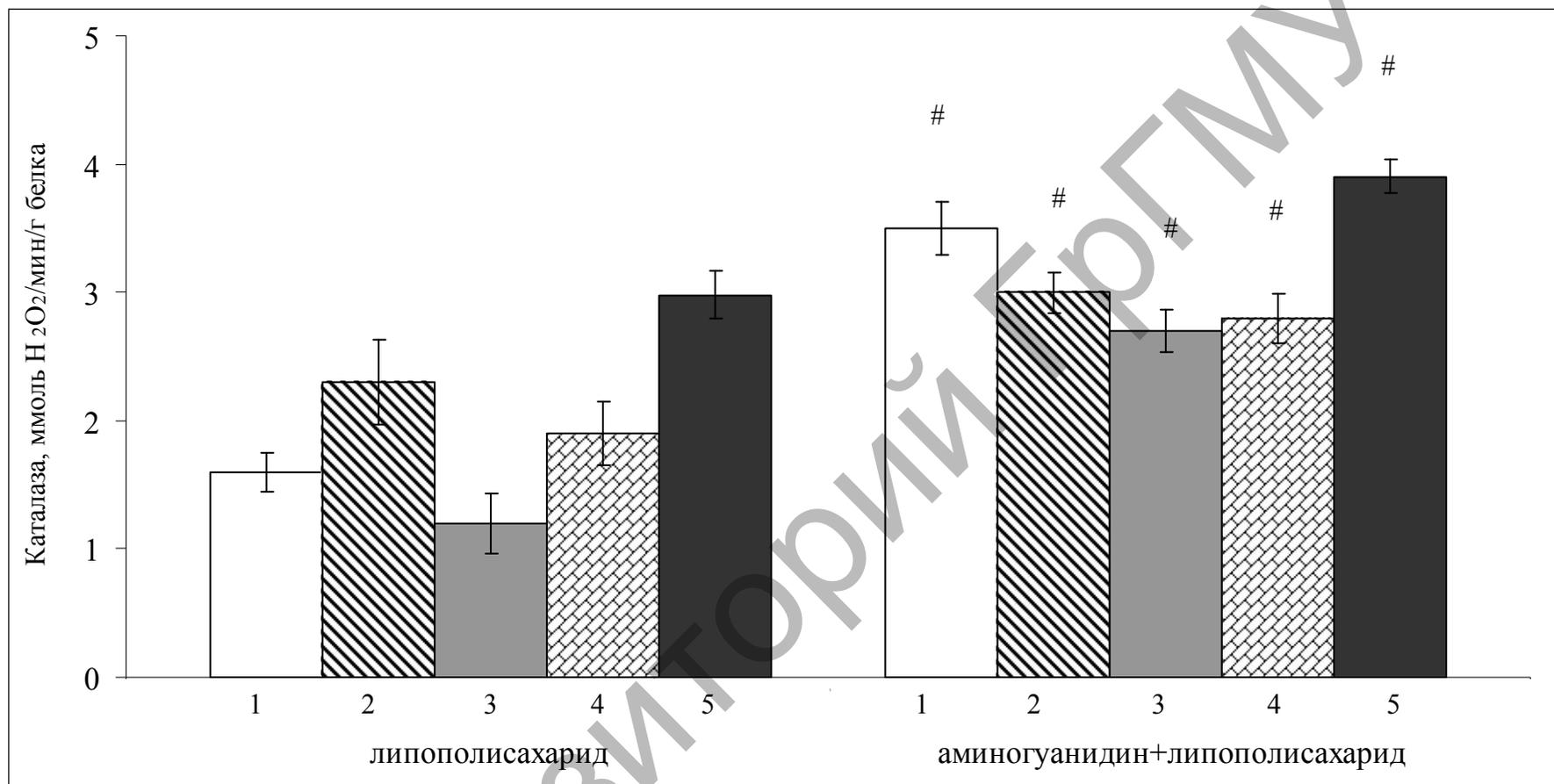


Рисунок 2.12 – Изменение активности каталазы в тканях кроликов после введения аминогуанидина и липополисахарида

1 – аорта, 2 – сердце, 3 – легкие, 4 – печень, 5 – почки

Примечание – Изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид ($p < 0,05$) – # (критерий Манна-Уитни)

В условиях направленной коррекции L-аргинин-NO системы после введения ЛПС уровень гомоцистеина уменьшается на 29,8% ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС (таблица 2.13).

В наших экспериментах АГ, введенный перед инъекцией ЛПС, снижает активность свободнорадикальных процессов и концентрацию гомоцистеина, повышает уровень антиоксидантных факторов защиты. Известно, что ЛПС является индуктором iNOS, под действием которой вырабатывается большое количество NO, обладающего цитотоксическим действием, так как при взаимодействии с супероксид-анионом образуется мощный окислитель пероксинитрит [Kawano T. et al., 2007]. Показано, что гомоцистеин в культуре эндотелиальных клеток повышает продукцию АФК, индуцирует экспрессию iNOS и уменьшает активность eNOS, вызывая развитие окислительного стресса [Tyagi N. et al., 2005]. Отмечается повреждающее действие гипергомоцистеинемии на функцию системы, ответственную за транспорт L-аргинина к эндотелиальным клеткам [Jin L. et al., 2007].

Очевидно, эффекты АГ при окислительном стрессе связаны с уменьшением стабильных метаболитов NO, а также продукции свободнорадикальных молекул и повышением активности СОД [Орлова Е.А., Комаревцева И.А., 2004]. Введение селективного ингибитора iNOS уменьшает избыточную генерацию NO, судя по снижению уровня общих нитритов в наших исследованиях, влияет на SGK, контролируя процессы оксигенации и поддержание прооксидантно-антиоксидантного баланса организма.

ГЛАВА 3 КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

3.1 Значение L-аргинин-NO системы в формировании кислородтранспортной функции крови

Сродство гемоглобина к кислороду определяет диффузию кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капилляров в ткань [Борисюк М.В., 1984; Samaja M., 1997; Гацура С.В., Зинчук В.В., 2004]. Свойство гемоглобина обратимо связывать кислород является частным случаем общей закономерности взаимодействия протеинов с лигандами [Иванов К.П., 1993; Hsia C.W., 1998]. Субъединицы гемоглобина внутри тетрамера при переходе от R- к T-конформации (т.е. R- и T-состояния) обуславливают кооперативные свойства, проявляющиеся в S-образной форме КДО. Такая её форма в обычных условиях обеспечивает процессы транспорта кислорода кровью, облегчая её максимальную оксигенацию при относительно низких pO_2 и деоксигенацию при относительно высоких pO_2 , улучшая доставку требуемых количеств O_2 в ткани при сравнительно малых величинах кровотока [Галенко-Ярошевский П.А. и др., 2000; Samaja M. et al., 2003]. Механизм кооперативности основан на стереохимической перестройке контактов субъединиц на мобильной аллостерической поверхности в зависимости от степени оксигенации. Аллостерические регуляторы, такие как 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ), Cl^- , H^+ , связываясь с молекулой гемоглобина в T-состоянии и облегчая, соответственно, высвобождение кислорода, проявляют свои эффекты при субэквивалентных количествах (т.е., когда их количество меньше, чем гемоглобина). Молекула гемоглобина, взаимодействуя с компонентами внутренней поверхности мембран эритроцитов, прежде всего, с 43 кДа цитоплазматическим фрагментом – белок полосы 3 (анионообменный белок AE1), изменяет сродство к O_2 : преимущественно связывает его при низких pO_2 и высвобождает при насыщении 2,3-ДФГ, что позволяет рассматривать данный

элемент мембраны как аллостерический регулятор функции гемоглобина [Путинцева О.В., Артюхов В.Г., 2000; Zhang Y. et al., 2003]. Представляет интерес изучение взаимодействия гемоглобина с NO, так как он имеет гораздо более высокое сродство к гемической группе дезоксигемоглобина, чем O₂ и CO, что позволяет предполагать его конкурентное связывание с кислородом на соответствующие участки на молекулах частично оксигенированного гемоглобина [Gladwin M.T. et al., 2000].

СГК определяется в значительной степени аллостерическим взаимодействием между гемоглобином и различными физиологическими модуляторами (H⁺, 2,3-ДФГ, CO₂ и др.), которые в совокупности на уровне клеточного компартмента крови образуют внутриэритроцитарную систему регуляции её кислородсвязывающих свойств [Иржак Л.И., 1975; Борисюк М.В., 1983; Борисюк М.В., 1984]. Исследования последних лет позволили предположить, что к факторам данной системы можно отнести монооксид азота, образование которого происходит из аминокислоты L-аргинина под контролем фермента NO-синтазы и ряда кофакторов (L-аргинин-NO система). S-нитрозирование гемоглобина может быть сберегающим механизмом, обеспечивающим доставку NO в области с низким рН или рO₂. Взаимодействие NO с гемоглобином ставит вопрос о паракринной и аутокринной функции NO. Транспорт NO как гормона в организме ограниченно проявляется при физиологических условиях, но в полной мере реализуется при фармакологических (высоких) уровнях NO [Schechter A.N., Gladwin M.T., 2003].

Эритроцитарная мембрана не ограничивает взаимодействие гемоглобина с NO в физиологических условиях. На модели ишемии кишечника, в которой создавалась окклюзия верхней брыжеечной артерии и оценивалось образование HbFe²⁺NO (нитрозилгемоглобина) и диэтилдитиокарбамата с железом, показано, что NO, высвобождаемый из эндотелиальных клеток, диффундирует прежде всего не в ткань, а в кровь [Kozlov A.V. et al., 2001]. Реакция NO с гемической группой гемоглобина может быть частично ограничена гидрофобным компонентом клеточной мембраны, лимитируя процесс его диффузии в эритроцит [Liu X. et al., 1998]. NO переносится через клеточную мембрану

посредством специального переносчика протеина АЕ1, или анион-обменника. Проницаемость эритроцитарной мембраны для NO сравнительно невысока, что может иметь значение для его реакции с гемоглобином [Vaughn M.W., Huang K.T., 2001]. Предполагается существование цитоскелетного барьера для диффузии NO, реализуемого через особые межбелковые поры в эритроцитарной мембране, пропускная способность которых регулируется и соответственно влияет на вход NO [Huang K.T. et al., 2001]. Скорость реакции NO с гемоглобином, находящимся в эритроцитах, в 800 раз меньше в сравнении с эквивалентным его количеством, находящимся в растворе [Liu X. et al., 1998]. В то же время есть мнение, что мембрана эритроцита не является барьером для NO и его производных и не лимитирует взаимодействие NO с гемоглобином [May J.M., Qu Z.C., 2000].

В артериальной крови NO в реакции с оксигемоглобином образует нитрат и метгемоглобин, а в венозной – нитрозилгемоглобин, способный при высоких pO_2 дезинтегрироваться с участием молекулярного кислорода до гемоглобина и NO_3^- [Wennmalm A. et al., 1993]. Гемоглобин взаимодействует с NO через высокоаффинные Fe^{2+} -связывающие участки на геме, его сродство к NO в 8000 раз выше, чем к кислороду. $HbFe^{2+}NO$ имеет шестикоординатную форму гемических групп [Kosaka H. et al., 1996]. Спектр ЭПР $HbFe^{2+}NO$ в растворе является суперпозицией спектров T- и R-конформеров гемоглобина с преимущественным образованием T-формы, которые обусловлены обратимыми переходами от сильного (R) до слабого (T) взаимодействия Fe^{2+} -гем с гистидином [Мильт Е.М., Каспаров В.В. и др., 2000]. Нитрозилгемоглобин характеризуется выраженным эффектом Бора, что может иметь особо важное значение при ацидозе [Yonetani T. et al., 1998].

В глобиновой цепи гемоглобина NO связывается в форме S-нитрозотиола, а именно S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb). Цистеин (93) β -белковой цепи идентифицировали как место связывания NO с гемоглобином [McMahon T.J. et al., 2000]. При очень больших концентрациях нитрозотиолов *in vitro* образуются и другие формы SNO-Hb, у которых нитрозилируется аминокислота цистеин в положении 12 и 104 β - и α -глобиновых цепей, соответственно [Mamone G., Sannolo N., 1999]. S-

нитрозилирование гемоглобина облегчает отсоединение NO от гема и поступление его к тканям, находящимся в условиях гипоксии. SNO-Hb выступает в роли акцептора или донора электронов, внося, тем самым, вклад в редокс-равновесие гема, однако значение этих функций минимально в условиях покоя [Gladwin M.T. et al., 2000].

Переход NO от S-нитрозотиола на гемоглобин регулируется аллостерически и функционально зависит от присоединения O₂. При связывании гемоглобина с O₂ в лёгких его сродство для S-нитрозотиола растёт, а при отдаче снижается, благодаря чему NO высвобождается в ткани. Существует O₂-зависимое равновесие между SNO-Hb и HbFe²⁺NO (при отсутствии низкомолекулярных тиолов, например, цистеина, мишенью NO является гем с Fe²⁺, а в его присутствии следует перенос NO-группы на цистеиновый остаток β-глобина) [McMahon T.J. et al., 2000]. Положение редокс-равновесия между SNO-Hb и HbFe²⁺NO связано с аллостерическим состоянием гемоглобина. Большие концентрации нитрозильного гемоглобина обнаруживаются в деоксигенированной крови, и наоборот [Kang E.S. et al., 2001]. Существует цикл связывания O₂ и NO в лёгких и их высвобождения на периферии.

Различные по происхождению молекулы NO реагируют с SH-группами белков и, прежде всего, альбуминами с образованием долгоживущих комплексов RSNO, обладающих вазодилататорным действием. Среди этих соединений наиболее значимым является S-нитрозо-GSH. Внутри эритроцита существует равновесие между NO, связанным с тиолами в гемоглобине (SNO-Hb), и мембранным белком полосы 3, на которое влияет локальное pO₂, регулируя тем самым вазодилатацию в соответствии с метаболическими потребностями [Stamler J.S., 2004]. SH-группа S-нитрозотиола существенно защищает NO от гашения присоединением к гему. Равновесие между HbFe²⁺NO и SNO-Hb связано с конформацией белка: образование SNO-Hb облегчается в R-структуре, а HbFe²⁺NO преимущественно образуется в T-структуре. Высвобождению NO из тиолов способствуют дезоксигенация и окисление гема (T-структура, высокоспиновая), что согласуется с термодинамическими особенностями его связывания [Eaton W.,

Henry E.R., 1999]. Первичным аддуктом гемоглобина и NO, образуемого при вдыхании NO, у нормальных индивидуумов является $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и в небольшом количестве SNO-Hb [Gladwin M.T. et al., 2002]. GSH влияет на равновесие SNO-Hb и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, что оказывает эффект на процессы оксигенации и деоксигенации крови в капиллярах малого и большого кругов кровообращения. NO, высвобождаемый из SNO-Hb в присутствии GSH, не вызывает заметных сосудистых эффектов в изолированном лёгком в связи с быстрым окислением NO и образованием метгемоглобина [Deem S., Gladwin M.T., 2001]. Главным продуктом взаимодействия восстановленного GSH с SNO-Hb *in vivo*, вероятно, является $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, за счёт чего происходит модификация SGK, сдвиг КДО вправо. По мнению Gow A.J. et al. [1999], взаимодействие NO с оксигемоглобином не уничтожает его активность, более того, обеспечивает его сохранение («гемоглобин рационально вводит новую химию, когда его насыщение кислородом высоко, лимитируя окисление NO и сохраняя его биоактивность»).

Гемоглобин способен выполнять функцию депо NO в микроциркуляторной сосудистой сети [Stepuro I., Chaikovskaya N., 1994]. В циркуляторном сосудистом русле нитрозотиолы, образуемые при опосредуемом NO нитрозировании тиолов, играют важную роль в транспорте, хранении и метаболизме NO [Jourdeuil D. et al., 2000a]. Предполагается, что SNO-Hb действует как «аллостерически контролируемый буфер NO» [Perutz M.F., 1996], обменивающий свою NO-группу с тиолами среды, в том числе с GSH и, тем самым, изменяет кровоток (выполняет роль критического фактора, определяющего доставку кислорода). Сравнительно стабильные вазоактивные соединения могут служить системой хранения NO. Депонирование монооксида азота можно рассматривать как фактор адаптационной защиты; существует NO-индуцированная активация различных защитных факторов (белки теплового шока, простагландины, антиоксидантная система) [Малышев И.Ю., Манухина Е.Б., 1998]. Эндотоксемия резко повышает образование циркулирующих S-нитрозотиолов (через 5 часов после внутрибрюшинного введения крысам ЛПС уровень циркулирующего S-нитрозоальбумина возрастал примерно в 3,4

раза, а SNO-Hb – в 25 раз по сравнению с контролем) [Jourdeuil D., Gray L., 2000b]. Содержание S-нитрозированного гемоглобина и альбумина в крови, по данным разных авторов, колеблется от 30-50 нмоль до 2,5-7 мкмоль, что может быть результатом эффекта присутствия в плазме NO_2^- , нестабильности SNO-Hb в присутствии гемоглобина [Gladwin M.T., Lancaster J.R., 2003]. В гемолизатах эритроцитов крыс с индуцированным стрептозотоцином диабетом был обнаружен значимо больший уровень SNO-Hb, чем у контрольных крыс, что позволяет предполагать участие гликозилированного гемоглобина в процессах S-нитрозилирования, которое, в свою очередь, может нарушать функцию сосудов и участвовать в генезе диабетической микроангиопатии [Padron J., Peiro C., 2000]. Обратимая секвестрация NO гемоглобином (через $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$) играет важную роль в развитии ряда заболеваний почек [Kang E.S., Miles D.E., 2001]. При трансплантации печени обнаружен максимум $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ через 60 мин. после операции, что отражает его участие в ишемически-реперфузионных повреждениях [Battista S., Mengozzi G., 2002]. Предполагается, что большая уязвимость зрелых внутриэритроцитарных форм возбудителя малярии частично может быть опосредована через NO, его производные и их вклад в иммуноэффекторную функцию организма [TaylorRobinson A.W., 2000].

В тканях, сопровождающихся значительным стрессом (находящимся в условиях гипоксии), SNO-Hb может быть механизмом доставки NO [Gladwin M.T., Ognibene F.P., 2000]. Повышенное высвобождение NO из нитрозоформ при гипоксии снижает региональное сосудистое сопротивление [Deem S., Gladwin M.T., 2001], что является примером аллостерических свойств гемоглобина, которые улучшают транспорт кислорода путём приведения в соответствие кровотока региональным потребностям в нём. Нитрозилирование гема и нитрозирование цистеина (93) в β -полипептидной цепи гемоглобина играют важную роль в транспорте и метаболизме NO кровью. Образование SNO-Hb может способствовать высвобождению NO из гема [Gladwin M.T., Ognibene F.P., 2000]. Взаимодействие между NO и гемоглобином важно для регуляции функций обеих молекул, однако при нахождении гемоглобина в плазме

доминирующим становится гашение NO. Процессы деоксигенации SNO-окси-Hb в капиллярах обуславливают аллостерический переход гемоглобина (из R- в T-состояние), что инициирует выход NO. При физиологическом дефиците кислорода в тканях гемоглобин за счёт конформационных изменений в положении цистеина (93) β-белковой цепи приводит местный кровоток в соответствие с кислородными потребностями [Stamler J.S., 2004].

Эритроциты, секвестрируя NO в терминальных артериолах и капиллярах, уменьшают его участие в вазодилатации, и тем самым, казалось бы, противодействуют реализации КТФ крови. Однако кислородзависимый характер равновесия между $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и SNO-Hb обеспечивает соответствие кровотока с его потребностью, т.е. оптимальный баланс между потребностью в кислороде и его доставкой.

Эритроциты несут примерно в 1000 раз больше NO, чем это требуется для регуляции кровотока или дилатации кровеносных сосудов [Carter T.D., Bettache N., 1997]. Высвобождение нитрозотиолов в большом объёме (из гемоглобина) при каждом артериовенозном цикле несовместимо с жизнью, так как оно должно вызывать угрожающую для жизни гипотензию и шунтирование крови (регуляция кровотока требует лишь малых наномолярных количеств нитрозотиолов); также это создавало бы в организме непереносимую метаболическую нагрузку. Значение NO-соединений с гемоглобином необходимо оценивать через их эффект на СГК [Зинчук В.В., 2003].

Различные соединения NO-производных с гемоглобином могут по-разному влиять на СГК всей крови [Зинчук В.В., 2009]. Метгемоглобин и SNO-Hb повышают СГК, а $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ его снижает; соответственно, первые смещают КДО влево, а последний – вправо. NO изменяет СГК через переход гемоглобина из конформационного состояния R в T, повышение уровня эритроцитарного метгемоглобина, образование нитрозотиолов и дополнительных продуктов окисления гемоглобина [Head C.A., Brugnara C., 1997]. Показатель p50 SNO-Hb имеет значение менее 10 мм рт. ст. [Bonaventura C., Ferruzzi G., 1999], для раствора SNO-Hb (с 30% нитрозилированием цистеина (93) в β-белковой цепи) – $4,3 \pm 0,27$

мм рт. ст. [Patel R.P. et al., 1999], а для $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ его величина составляет $39,6 \pm 1,5$ мм рт. ст. [Kosaka H., Seiyama A., 1996]. L-аргинин и ингибитор NO-синтазы (N^G -нитро-L-аргинин) при лихорадке, индуцированной введением ЛПС, увеличивает $p50_{\text{станд}}$ с $33,7 \pm 1,1$ до $37,1 \pm 1,3$ мм рт. ст., что, в частности, обусловлено различными эффектами NO-производных гемоглобина на СГК [Зинчук В.В., 2005]. Введение нитроглицерина внутривенно крысам приводило к увеличению метгемоглобина на 217,1 % и $p50$ на 29,2 %, а в условиях введения ЛПС и предварительного повышения СГК эти эффекты донора NO усиливались [Зинчук В.В., 2005]. У больных серповидноклеточной анемией, дышавших воздухом с низким содержанием NO в течение 45 минут, а также при инкубации такой крови с NO в течение 5 минут отмечались близкие изменения СГК (значение $p50$ уменьшалось примерно на 15%), у здоровых таких изменений не выявлено, что, возможно, связано с малым объемом выборки [Head S.A. et al., 1997]. Это предполагает единый механизм формирования кислородсвязывающих свойств крови с участием NO, реализуемый на эритроцитарном уровне. Обработка крови различными концентрациями NO либо донорами NO (соль Анжели и др.) повышает СГК, линейно коррелирующее с уровнем метгемоглобина, что предполагает ведущую роль последнего в модификации транспорта кислорода кровью [Hrinczenko V.W. et al., 2000].

При вдыхании воздуха, содержащего 80 промилей NO, уровень $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ возрастал в 10 раз до микромолярной области, а SNO-Hb существенно не изменялся и не имел значимых артериовенозных градиентов [Cannon R.O. et al., 2001]. Монооксид азота участвует в изменении кислородсвязывающих свойств крови при проведении его ингаляции (рисунок 3.1).

Концентрация SNO-Hb и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ в крови такова, что на каждые из этих дериватов приходится 1000 тетрамеров обычного гемоглобина, и это делает относительно малым их влияние на кислородсвязывающие свойства крови в обычных условиях [Yonetani T. et al., 1998], но при концентрациях NO выше

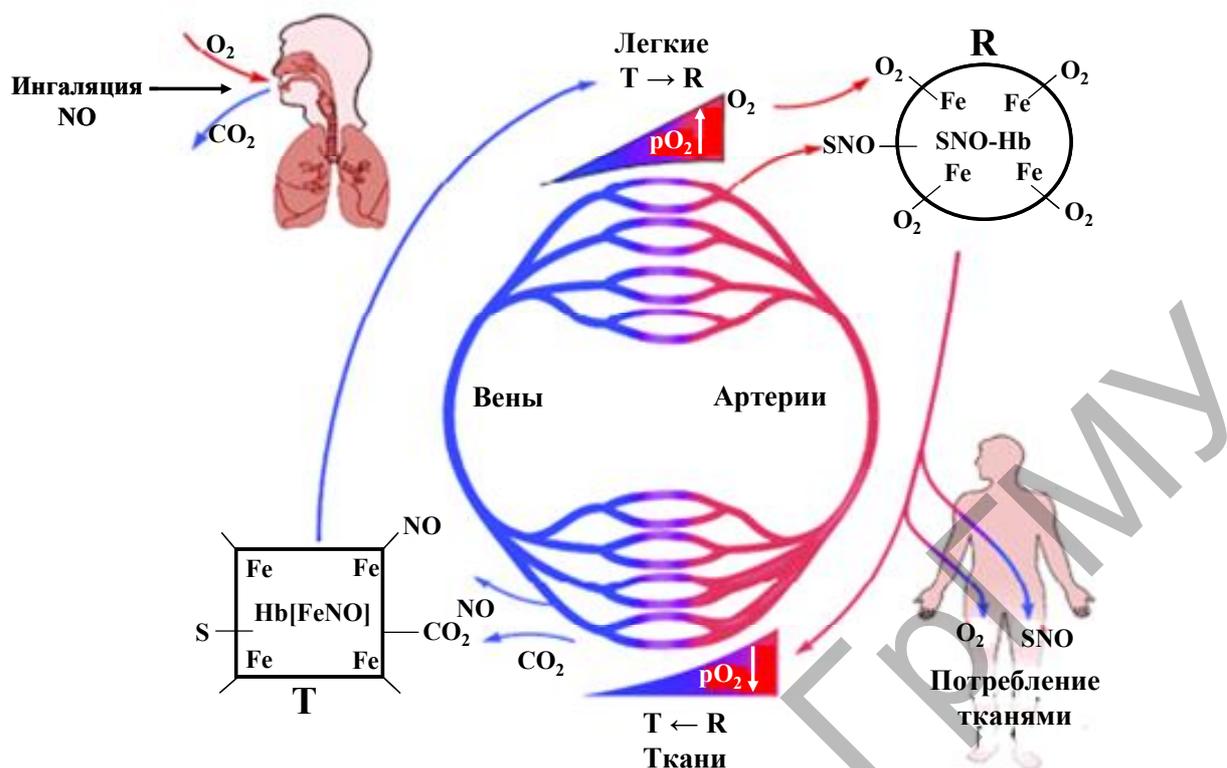


Рисунок 3.1 - Участие монооксида азота в изменении кислородсвязывающих свойств крови при проведении его ингаляции [сMahon TJ, Doctor A., 2006]

физиологических параметров (при низком рН, добавлении инозитолгексафосфата, низкой температуре) это вполне возможно. Их влияние на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови проявляется при высоких концентрациях (5 и более %), но в то же время их эффект может иметь важное значение для процессов газообмена на уровне капилляра [Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., 2002; Зинчук В.В., 2003].

Одним из субстратов, необходимых для синтеза NO, является кислород (константа Михаэлиса для него в этой реакции лежит в физиологической области), что позволяет предполагать его лимитирующую роль для образования NO [LeCras T.D., McMurtry I.F., 2001]. При $pO_2 < 30$ мм рт.ст. ферментативный синтез NO снижается [Kourembanas S., Marsden P.A., 1991]. Кислород является важным фактором, определяющим активность NO-синтазы при гипоксии в тканях или в сосудистом русле. Её активность может ингибироваться гипоксией [Whorton A.R., Simonds D.B., 1997]. В гепатоцитах крыс выявлен механизм кислородной регуляции экспрессии гена иNOC: низкое pO_2

индуцирует синтез NO, что может иметь значение для формирования резистентности этих клеток к ишемическому повреждению [Vargiu C. et al., 2000]. Концентрация $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, судя по его ЭПР-спектроскопии в артериальной и смешанной венозной крови нормоксических и гипоксических овец при ингаляции NO, зависит от уровня O_2 и NO. Существует выраженная отрицательная корреляция между уровнем $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и степенью насыщения крови кислородом [Takahashi Y. et al., 1998]. Метаболический цикл NO может активироваться при различных гипоксических состояниях, так как в условиях дефицита кислорода восстановленные гемсодержащие белки переносят электроны на ионы NO_2^- , восстанавливая их до NO [Меньщикова Е.Б. и др., 2000].

NO взаимодействует с O_2^{*-} с образованием пероксинитрита (мощного окислителя) [Squadrito G.L., Pryor W.A., 1995], который может быть модификатором свойств гемоглобина через различные реакции [Minetti M., Scorza G., 1999]. Существуют два основных типа реакций пероксинитрита с гемоглобином – с гемом или аминокислотами полипептидных цепочек глобина (тирозином, цистеином) [Стародубцева М.Н., Черенкевич С.Н., 2003]. В обычных условиях внутриэритроцитарный гемоглобин взаимодействует с нитрит-ионами с преимущественным образованием метгемоглобина, при окислительном стрессе – преимущественно с возникновением нитритного метгемоглобина, который способен реагировать с H_2O_2 , образуя, в частности, пероксинитрит, участвующий в лизисе эритроцитов [Стародубцева М.Н., Игнатенко В.А., 1999]. Пероксинитрит обуславливает прямое окисление железа, а также нитрование остатков тирозина на молекуле гемоглобина [Alayash A.I., 1999]. Гемоглобин может обеспечивать защиту от пероксинитрита, выполняя функцию внутриклеточного антиоксиданта. Его способность связывать NO не только в результате образования комплексов с гемовым железом, но и путём образования комплексов с тиоловыми группами, обеспечивает защиту клеток и субклеточных структур от избыточного образования NO. Существует определённая связь между SGK и процессами его аутоокисления и окислительной модификацией. Гемоглобин выступает в роли редокс-активного соединения,

осуществляющего псевдоперокси-дазный каталитический цикл, возникающий между Fe^{3+} и Fe^{4+} при поглощении гемоглобином H_2O_2 [Alayash A.I., 1999]. Гемоглобин, регулируя содержание NO в том или ином регионе организма, формирует определённый уровень прооксидантно-антиоксидантного состояния. При нормальных физиологических условиях, когда количество образуемого NO невелико, прооксидантные эффекты $ONOO^-$ и H_2O_2 угнетаются антиоксидантной функцией NO. В условиях сдвига прооксидантно-антиоксидантного баланса, чрезмерного образования O_2^{*-} и, соответственно, $ONOO^-$ и H_2O_2 реализуется прооксидантный эффект NO [Alayash A.I., 2000]. СГК, регулируя уровень NO, может вносить вклад в равновесие между ним и O_2^{*-} в сосудистой сети [Зинчук В.В., 2003].

NO может модифицировать СГК через внутриэритроцитарные механизмы регуляции, кислородзависимый характер образования NO, регуляцию сосудистого тонуса, действие пероксинитрита. Это может иметь важное значение для процессов газообмена за счёт гетерогенности эндотелия по NO-образующей функции и особенностей объёмного содержания крови в разных отделах сердечно-сосудистой системы (в терминальных артериолах и капиллярах) (рисунок 3.2).

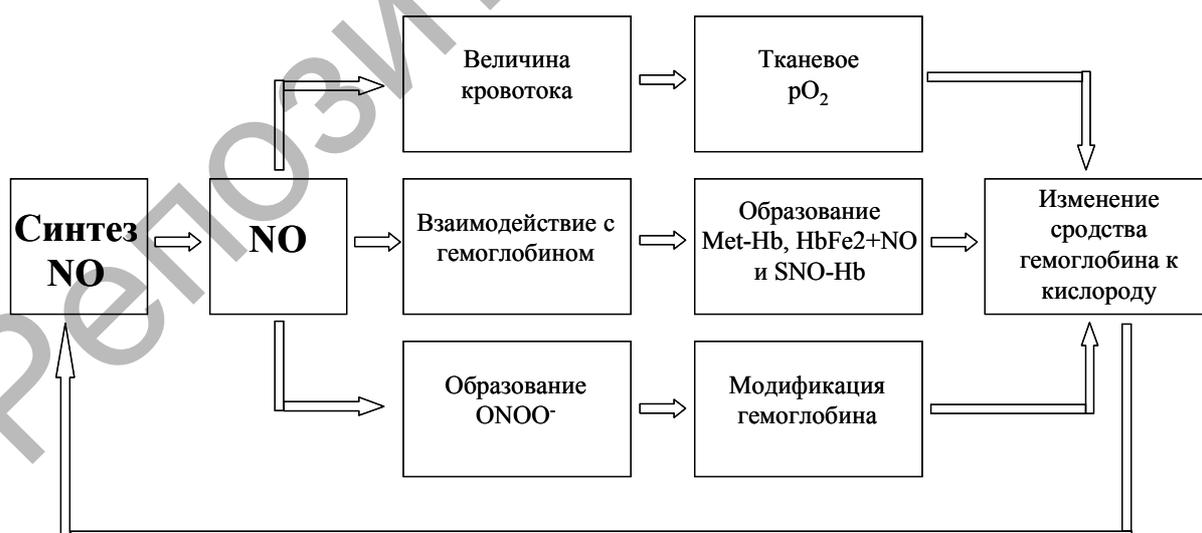


Рисунок 3.2 - Основные механизмы реализации эффекта NO на сродство гемоглобина к кислороду [Зинчук В.В., 2003]

За последнее десятилетие были достигнуты значимые успехи в выяснении участия NO в генезе окислительного стресса. Детальное понимание вклада L-аргинин-NO системы, роли и взаимодействия отдельных её эффекторов и модификаторов в каскаде активации патогенеза данного состояния может быть решающим для разработки мероприятий по лечению септического шока. При использовании ингибиторов медиаторов септического шока важно учитывать, что многие из патогенетических механизмов этого состояния представляют собой многосторонний компенсаторный ответ организма на действие ЛПС. Понимание конкретных механизмов, регулирующих процессы воспаления, позволит более эффективно влиять на патогенез повреждения тканей без существенного нарушения защиты организма. Имеющиеся данные предполагают участие кислородсвязывающих свойств крови и монооксида азота в повреждении тканей, вызываемом ЛПС, что должно быть использовано для исследований в целях коррекции таких патологических состояний.

3.2 Динамика изменения кислородсвязывающих свойств крови при окислительном стрессе в условиях модуляции образования NO

Важный вклад в сложную иерархию прооксидантно-антиоксидантного равновесия вносит NO, который является свободнорадикальной молекулой, способной, с одной стороны, ограничивать окислительное повреждение (как обрывающий гаситель цепи радикалов), с другой – быть источником активных форм азота [Klatt P., Lamas S., 2000]. Взаимодействие между NO и свободными радикалами формирует определённое равновесие (система гасителей O_2^{*-} конкурирует с NO за образование $ONOO^-$), ведущее к развитию в биологическом объекте окислительного (нитрозирующего) стресса [Esprey M.G. et al., 2000]. В последнее время активно изучается взаимодействие NO и гемоглобина. Известны три основные формы соединения гемоглобина с NO: метгемоглобин, нитрозилгемоглобин и нитрозогемоглобин. В молекуле нитрозилгемоглобина NO соединён с Fe^{2+} -участком на геме, а нитрозогемоглобин является результатом взаимодействия NO с цистеином (93) на β -

глобиновой цепи гемоглобина [Gladwin M.T. et al., 2000]. Эти соединения гемоглобина с NO по-разному влияют на СГК всей крови. Метгемоглобин и SNO-Hb имеют повышенное сродство к кислороду, а $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ – пониженное. Их эффект на формирование кислородсвязывающих свойств крови может иметь важное значение для процессов газообмена и оксигенации тканей.

После введения липополисахаридного эндотоксина отмечались изменения показателей кислотно-основного состояния в крови у кроликов (таблица 3.1), свидетельствующие о развитии декомпенсированного метаболического ацидоза. pH уменьшался с $7,322 \pm 0,015$ до $7,137 \pm 0,037$ ($p < 0,001$) ед. Изменение кислородсвязывающих свойств крови (таблица 3.1) характеризовалось снижением величины $p\text{O}_2$ на 16,9 % ($p < 0,05$) в сравнении с исходным уровнем. Величина стандартного $p50$ уменьшалась на 9,7 % ($p < 0,05$) и 10,6 % ($p < 0,05$) к концу 120-й и 240-й мин., соответственно. Однако с учётом реальных значений pH, $p\text{CO}_2$ и температуры тела характер изменений СГК при окислительном стрессе оказался иным. Так, на 240-й мин. после введения ЛПС реальное значение $p50$ возрастало на 9,3 % ($p < 0,05$), что обуславливало сдвиг реальных КДО вправо (рисунок 3.3). Функционирование внутриэритроцитарной системы регуляции кислородсвязывающих свойств крови, обеспечивающей положение реальной КДО при различных гипоксических состояниях, а, соответственно, и значение показателя $p50_{\text{реал}}$, определяется влиянием многих факторов [Борисюк М.В., 1983]. При этом изменение показателей $p50_{\text{стан}}$ и $p50_{\text{реал}}$ может иметь разнонаправленный характер, степень выраженности которых зависит от тяжести патологического процесса. Выявлено увеличение содержания продуктов утилизации NO ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$), более выраженное на 240-й мин. стресса (133,6 %, $p < 0,001$) по отношению к исходному уровню (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Показатели кислородсвязывающих свойств крови у кроликов и концентрации нитратов/нитритов в плазме крови при окислительном стрессе ($\bar{x} \pm S_x$)

Показатель	Исходный уровень	Окислительный стресс	
		120-я минута	240-я минута
n	9	9	9
Метгемоглобин, %	0,28±0,09	0,88±0,11*	0,72±0,07*
pO ₂ , мм рт.ст.	33,8±2,23	30,9±2,50	28,1±1,34*
p50 _{реал} , мм рт.ст.	35,5±0,77	37,1±1,48	38,8±1,13*
p50 _{станд} , мм рт.ст.	31,0±1,14	28,0±0,53*	27,7±0,91*
pH, ед.	7,322±0,015	7,191±0,035*	7,137±0,037*
pCO ₂ , мм рт.ст.	47,6±3,12	38,2±2,47*	43,4±1,33
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	24,11±1,08	14,20±1,03*	14,28±0,94*
TCO ₂ , ммоль/л	25,43±1,09	15,37±1,04*	15,51±0,89*
ABE, ммоль/л	-1,97±1,37	-12,83±1,43*	-13,71±1,47*
SBC, ммоль/л	22,46±1,11	13,81±1,01*	13,14±1,22*
NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻ , мкмоль/л	6,11±0,36	11,41±0,52*	14,27±0,44*#

Примечание: *- p < 0,05 по отношению к исходному уровню, # - по отношению к 120-й минуте эксперимента.

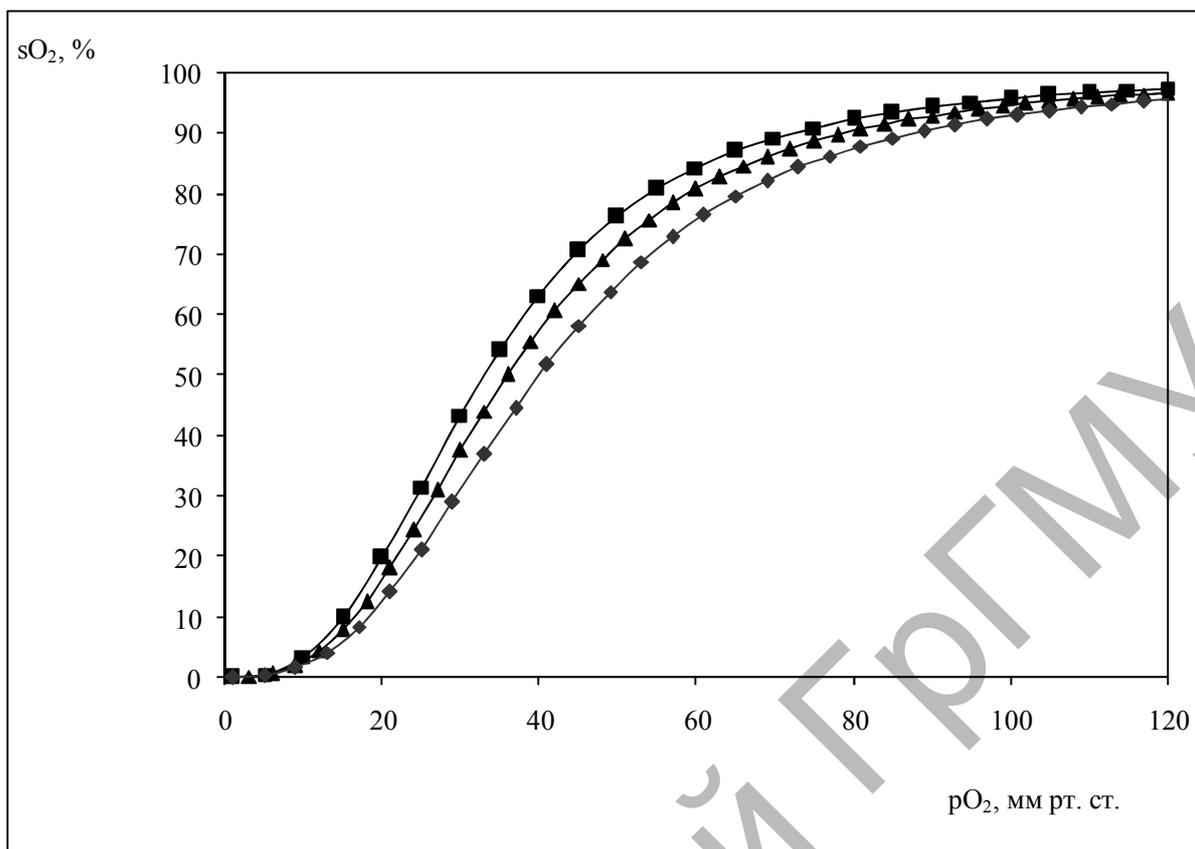


Рисунок 3.3 Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, pCO₂ и температуры у кроликов при окислительном стрессе: исходный уровень (■), 120-я (▲) и 240-я (◆) минуты эксперимента ($\bar{x} \pm S_x$, n=9)

Изменение показателей кислотно-основного состояния крови при окислительном стрессе в условиях ингибирования NO-синтазы (таблица 3.2) свидетельствовало о развитии на 240-й мин. декомпенсированного смешанного ацидоза. Уменьшение pH было более выражено, чем в предыдущей группе, и составило на 240-й мин. $0,324 \pm 0,021$ ($p < 0,001$) ед. Изменение кислородсвязывающих свойств крови при развитии окислительного стресса (таблица 3.2) характеризовалось развитием гипоксии, которая была ещё более выражена при ингибировании NO-синтазы. Снижение pO₂ достигало 33,9 % ($p < 0,02$), т.е. его значение изменялось с $31,6 \pm 2,01$ до $20,9 \pm 3,04$ мм рт. ст. После введения ингибитора NO-синтазы при окислительном стрессе p50_{реал} увеличивался на 31,3 % ($p < 0,001$) и 29,5 % ($p < 0,001$) на 120-й и 240-й мин., что отражает более выраженный сдвиг реальных КДО вправо (рисунок 3.4).

Таблица 3.2 – Основные показатели кислотно-основного состояния крови у кроликов при окислительном стрессе в условиях применения метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) ($\bar{x} \pm S_x$)

Показатель	Исходный уровень	Окислительный стресс + L-NAME	
		120-я минута	240-я минута
n	8	8	7
Метгемоглобин, %	0,28±0,08	0,56±0,07*	1,07±0,10*#
pO ₂ , мм рт.ст.	31,6±2,01	26,2±2,21	20,9±3,04*
p50 _{реал} , мм рт.ст.	33,9±0,95	44,5±2,14*	43,9±1,32*
p50 _{станд} , мм рт.ст.	31,4±0,74	31,3±0,90	29,8±0,74
pH, ед.	7,353±0,020	7,103±0,040*	7,029±0,023*
pCO ₂ , мм рт.ст.	48,7±3,87	47,2±3,36	61,5±2,80*#
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	26,63±1,80	14,27±1,95*	14,75±1,73*
TCO ₂ , ммоль/л	28,11±1,85	15,53±1,93*	16,37±1,59*
ABE, ммоль/л	0,98±1,73	-14,98±2,69*	-16,46±1,90*
SBC, ммоль/л	24,13±1,65	12,88±2,11*	9,06±1,69*

Примечание: * - p<0,05 по отношению к исходному уровню, # - по отношению к 120-й минуте эксперимента.

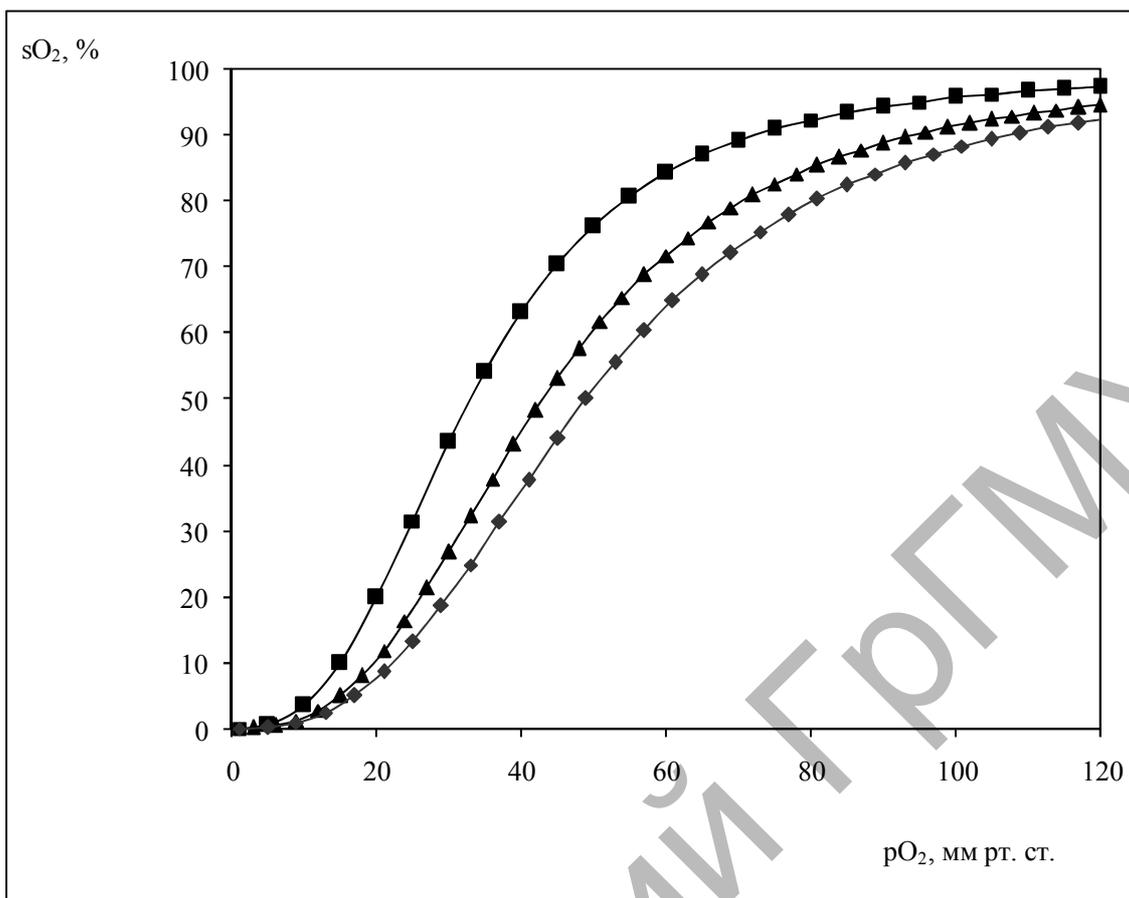


Рисунок 3.4 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, pCO₂ и температуры у кроликов при окислительном стрессе в условиях применения метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME): исходный уровень (■), 120-я (◆) и 240-я (▲) минуты эксперимента

Уровень нитратов/нитритов в плазме крови отражён на рисунке 3.5. Их прирост на 240-й мин. (126,4 %, $p < 0,001$) был достоверен, но меньше, чем в группе животных, получавших только ЛПС. Как видим, окислительный стресс в условиях ингибирования NO-синтазы характеризуется сдвигом реальной КДО вправо, более выраженной активацией процессов ПОЛ и снижением факторов антиоксидантной защиты в крови и тканях. Нитрозогемоглобин в концентрациях, превышающих нормальный физиологический уровень в 10 и более раз, индуцирует существенные модификации функциональной активности гемоглобина человека. Перестройка третичной структуры гемоглобина и модификация железопорфирина, вызванные присоединением NO, обуславливают конформационные изменения апобелка в областях ближайшего

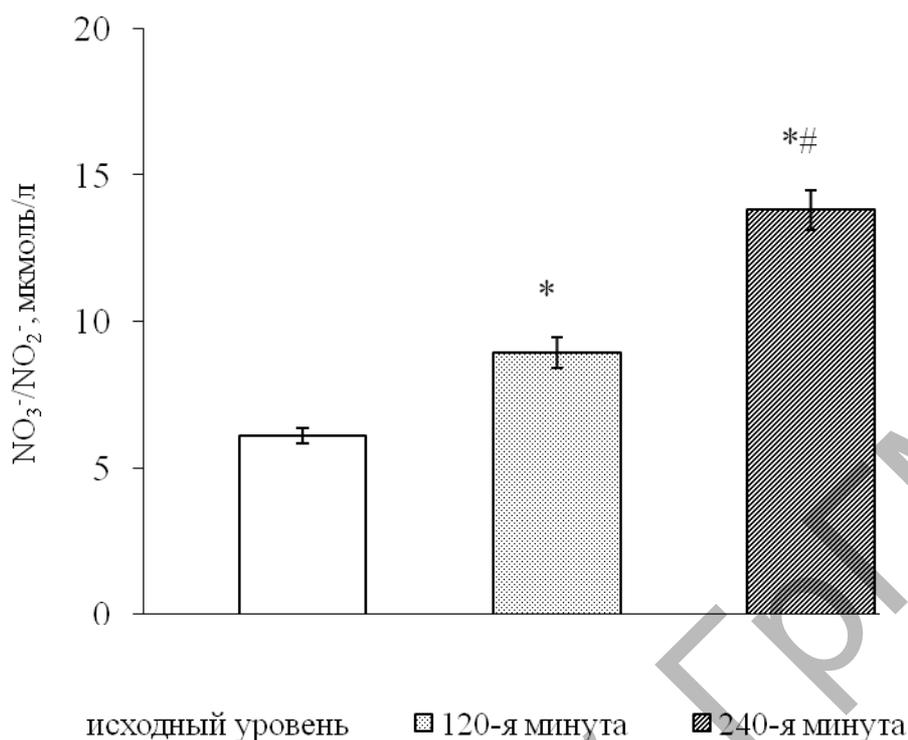


Рисунок 3.5 – Концентрация нитратов/нитритов в плазме крови у кроликов при окислительном стрессе в условиях применения метилового эфира NG-нитро-L-аргинина (L-NAME)

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню, # - по отношению к 120-й минуте эксперимента.

белкового окружения гема и субъединичных контактов, ослабление кооперативных взаимодействий в тетрамерах. Эти изменения характеристик смесей гемопротееидов позволяют предположить, что молекулы HbO_2 и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ вступают в определённые взаимодействия, результатом которых является формирование комплекса с низким сродством к кислороду [Артюхов В.Г., Калаева Е.А., 2004]. Нитрозогемоглобин выполняет важную физиологическую роль, связанную с удалением NO из гема и предотвращением накопления железонитрозидов, путём экспорта NO из эритроцитов в реакциях транснаитрозирования. Это соединение как донор/акцептор электронов вносит вклад в редокс-равновесие гема, способствует высвобождению NO из гема; кроме того, NO как лиганд к цистеину (93) β -белковой цепи, разрушая солевой мостик, повышает сродство гемоглобина к кислороду [Hobbs A.J. et al., 2002].

Таким образом, введение липополисахаридного эндотоксина вызывало у кроликов развитие окислительного стресса, сопровождающегося нарушением прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови и тканях, увеличением содержания нитратов/нитритов в плазме крови и уменьшением СГК при реальных значениях рН, рСО₂ и температуры. Применение неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина в условиях окислительного стресса сопровождалось усилением активности свободнорадикальных процессов и выраженностью изменений КТФ крови. Данные, полученные при исследовании патологической роли изменений СГК при окислительном стрессе, индуцированном ЛПС, могут иметь значение для усиления диссоциации оксигемоглобина, что способствует экстракции кислорода гипоксическими тканями при патологических состояниях, связанных с нарушением эндогенной выработки NO. Однако остаётся открытым вопрос о конкретных механизмах участия L-аргинин-NO системы, вклада NO различного происхождения в развитие окислительного стресса, в частности, через механизмы формирования КТФ крови, что и будет предметом исследований, результаты которых приведены в следующих главах.

Противоречие между использованием кислорода для поддержания процессов жизнедеятельности и токсичностью его метаболитов определяет основной парадокс аэробной жизни, т.е. необходимость существования в условиях непрекращающегося окислительного стресса [Davies K.J., 1995]. Окислительный стресс рассматривают как дефект аэробного метаболизма, стохастический процесс выработки свободных радикалов и неспецифического повреждения тканей, нерегулируемый механизмами антиоксидантной защиты [Hensley K. et al., 2000]. В сосудистой сети NO вырабатывается ферментативной системой эNOC, регулируемой Ca²⁺ и конститутивно экспрессируемой [Moncada S., Higgs E.A., 1993]. NO является главным регулятором гомеостаза сосудов, влияет на исходный тонус сосудов, агрегацию тромбоцитов, адгезию лейкоцитов, пролиферацию интимы и гладких мышц. Эта субстанция играет важную роль в поддержании нормального вазомоторного тонуса. Недавно полученные данные предполагают участие гемоглобина в ре-

гуляющей активности NO в сосудистом компартменте [Schechter A.N., Gladwin M.T., 2003]. Предполагается, что NO транспортируется гемоглобином в качестве третьего дыхательного газа и вызывает вазодилатацию по взаимосвязанному с кислородом (аллостерически) механизму [Gow A.J. et al., 1999; Stamler J.S., 2004]. Гемоглобин способен вне эритроцита связывать вырабатываемый эндотелием NO в 800 раз быстрее, чем внутри эритроцитов, тем самым нарушая гомеостаз NO, что может вести к вазоконстрикции, снижению кровотока, активации агрегации тромбоцитов и, в конечном итоге, повреждению органов [Liu X. et al., 1998]. Дезоксигемоглобин восстанавливает NO_2^- в NO и расширяет сосуды в циркуляторном русле людей в соответствии с физиологическими градиентами кислорода. [Gladwin M.T., Crawford J.H., 2004]. Теория сосудистого «сохранения» и транспорта монооксида азота SNO-Hb привлекательна, так как сигнальное действие NO в сосудистой сети достаточно кратковременно ввиду быстрой реакции NO с гемовой группой гемоглобина и его высокой концентрацией в сосудах. Наличие обильной (высокая концентрация гема в цельной крови) высокоаффинной «ловушки» NO существенно уменьшает его диффузионное расстояние и, таким образом, ограничивает вазодилатацию. В присутствии $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, очевидно, происходят изменения пространственного расположения отдельных фрагментов полипептидных цепей в области гемового кармана, что облегчает доступ лиганда к активному центру молекулы. $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ играет в этом процессе роль своеобразного аллостерического регулятора функциональной активности исследуемого гембелка на уровне отдельных тетрамеров [Артюхов В.Г., 2004].

В экспериментах данного раздела нами решалась задача по оценке параметров КТФ крови в условиях модуляции разными путями L-аргинин-NO системы при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС [Глебов А.Н., Зинчук В.В., 2005; Glebov A.N., Zinchuk V.V., 2005]. Исследования были выполнены на крысах-самцах. Окислительный стресс создавали путём внутривенного введения ЛПС в дозе 5 мг/кг. Модуляция L-аргинин-NO системы выполнялась внутривенной инъекцией L-

аргинина, L-NAME и селективного ингибитора NO-синтазы L-NIL.

Изменения основных показателей кислотно-основного состояния крови у крыс после введения в кровоток ЛПС (при окислительном стрессе) в условиях модуляции L-аргинин-NO системы представлены в таблице 3.3. Введение ЛПС приводило к снижению рН на $0,122 \pm 0,011$ ($p < 0,001$) ед. При этом отмечалось снижение HCO_3^- на 21,4 % ($p < 0,001$), TCO_2 на 19,4 % ($p < 0,001$), АВЕ на 217,6 % ($p < 0,001$), SBC на 13,9 % ($p < 0,01$). Полученные данные свидетельствуют о развитии декомпенсированного метаболического ацидоза. При окислительном стрессе L-NAME, L-аргинин и их совместное использование существенно не влияли на характер изменения кислотно-основного состояния. Инъекция L-NIL снижала значение рН на $0,074 \pm 0,008$ ($p < 0,001$) ед. в сравнении с контролем, но оно было выше на $0,048 \pm 0,010$ ($p < 0,01$) ед., чем у животных, получавших ЛПС. Дополнительная модуляция L-аргинин-NO системы (L-аргинин и L-NIL) не усиливала этот эффект.

Характер изменения показателей КТФ крови (таблица 3.3) при окислительном стрессе отражает развитие гипоксии. Введение ЛПС приводило к снижению $p\text{O}_2$ на $6,4 \pm 0,75$ ($p < 0,001$) мм рт. ст. Введение веществ, изменяющих функциональное состояние L-аргинин-NO системы, существенно не влияло на кислородный гомеостаз организма. В то же время, установлено, что ингибирование синтеза NO с помощью селективного блокатора L-NIL уменьшает кислородную недостаточность. Значение $p\text{O}_2$ уменьшилось на 11,5 % ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой животных, но оно было выше на 14,9 % ($p < 0,01$) в сравнении с группой крыс, получавших только ЛПС. Следует отметить характер изменения содержания гемоглобина и его производных (таблица 3.3). Концентрация гемоглобина во всех группах практически не изменялась. Однако содержание метгемоглобина имело отличия. Его прирост у крыс, получавших ЛПС, составил 280,3 % ($p < 0,001$). При инъекции L-NAME в условиях окислительного стресса отмечалось увеличение концентрации метгемоглобина на 83,1 % ($p < 0,01$) в сравнении с

Таблица 3.3 – Основные показатели кислотно-основного состояния крови у крыс при окислительном стрессе в условиях модуляции L-аргинин-NO системы ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатель	Контроль	ЛПС	L-NAME	ЛПС + L-NAME	L-аргинин	L-аргинин + ЛПС	L-аргинин + ЛПС + L-NAME	L-NIL	ЛПС + L-NIL	L-аргинин + ЛПС + L-NIL
n	10	9	6	10	8	9	9	8	9	9
pO ₂ , мм рт.ст.	27,9±0,72	21,5±0,87*	27,4±0,67#	21,4±0,76*	26,3±1,04#	22,3±0,78*	22,6±0,68*	28,6±0,94#	24,7±0,63*#	24,9±0,68*#
p50 _{реал.} , мм рт.ст.	38,0±0,44	47,2±0,37*	37,1±0,43#	46,2±0,67*	35,3±0,74*#	47,4±0,56*	46,9±0,80*	39,3±0,65#	42,2±0,49*#	41,7±0,61*#
p50 _{станд.} , мм рт.ст.	32,8±0,72	38,3±0,91*	32,3±0,92#	38,0±0,96*	31,4±0,87#	39,5±0,97*	38,6±1,08*	33,2±0,93#	35,0±0,74*#	34,8±0,81#
pH, ед	7,285±0,009	7,163±0,013*	7,293±0,014#	7,158±0,008*	7,297±0,008#	7,184±0,012*	7,189±0,009*	7,281±0,013#	7,211±0,008*#	7,209±0,011*#
pCO ₂ , мм рт.ст.	50,0±0,91	51,9±1,08	50,4±0,94	50,1±1,61	49,1±1,26	52,9±1,31	52,3±1,10	51,6±1,04	51,4±0,77	49,8±0,83
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	23,43±0,34	18,41±0,52*	23,58±0,49#	17,32±0,55*	23,49±0,36#	19,35±0,59*	19,24±0,38*	23,51±0,61#	20,04±0,37*#	19,22±0,42*
TCO ₂ , ммоль/л	24,71±0,51	19,92±0,23*	25,22±0,54#	18,52±0,63*	25,14±0,77#	20,82±0,48*	20,68±0,60*	25,11±0,39#	21,52±0,46*#	20,49±0,33*
ABE, ммоль/л	-3,12±0,17	-9,91±0,30*	-2,81±0,36#	-11,04±0,42*#	-2,92±0,30#	-8,83±0,51*	-9,10±0,44*	-3,08±0,27#	-7,64±0,47*#	-8,35±0,37*#
SBC, ммоль/л	17,71±0,55	15,25±0,43*	18,03±0,47#	12,99±0,29*#	19,42±0,35*#	15,72±0,39*	15,18±0,38*	19,35±0,45*#	16,99±0,38#	13,54±0,47*#

Примечание: *- p < 0,05 по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

контролем, но в то же время она была ниже, чем у животных, получавших ЛПС, на 51,9 % ($p < 0,001$). Введение L-аргинина в комбинации с ЛПС повышало содержание метгемоглобина на 212,7 % ($p < 0,001$) в сравнении с контролем, а при комбинированном введении с L-NAME его прирост был 91,6 % ($p < 0,01$), но на 49,6 % ($p < 0,001$) меньше, чем при введении только ЛПС. Важно подчеркнуть, что в этих группах метгемоглобин на СГК не влиял. При окислительном стрессе введение L-NIL, как и в комбинации с L-аргинином, вызывало уменьшение содержания метгемоглобина на 58,5 % ($p < 0,001$) и 47,0 % ($p < 0,001$), соответственно, в сравнении с группой животных, получавших ЛПС.

Содержание нитратов/нитритов отражает NO-образующую активность организма. Их концентрация в плазме крови зависит от общей скорости образования NO и родственных соединений, а также последующего взаимодействия со свободнорадикальными молекулами [Lauer T. et. al., 2001]. При введении ЛПС отмечался рост уровня нитратов/нитритов на $103,0 \pm 2,45$ ($p < 0,001$) мкмоль/л (рисунок 3.6). В этих условиях введение неселективного ингибитора NO-синтазы (L-NAME) уменьшало концентрацию $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на $12,99 \pm 4,12$ ($p < 0,05$) мкмоль/л в сравнении с группой крыс, получавших ЛПС. Однако наиболее значимое снижение их концентрации в плазме крови выявлено при введении L-NIL; она составила $92,76 \pm 3,41$ мкмоль/л, что было на $29,49 \pm 3,61$ ($p < 0,001$) мкмоль/л меньше, чем у крыс, получавших только ЛПС. Комбинированная инъекция L-аргинина и L-NIL существенно не изменяла содержание нитратов /нитритов в плазме крови.

СГК оценивалось по параметру $p50$, его значения приведены на рисунке 3.7. Показатель $p50_{\text{станд}}$ возрастал с $32,8 \pm 0,72$ до $38,3 \pm 0,91$ ($p < 0,001$) мм рт. ст. через 180 мин. после введения ЛПС. В изменении СГК особое значение имеют такие факторы, как pH, $p\text{CO}_2$ и температура. Сочетанное влияние этих факторов при определённой динамике изменения стандартного $p50$ и обуславливает различное СГК при реальных значениях pH, $p\text{CO}_2$ и температуры. С учётом их реальных величин показатель $p50_{\text{реал}}$ имел значение $47,2 \pm 0,37$ ($p < 0,001$) мм рт. ст., что вызывало сдвиг КДО вправо в сравнении с контролем ($p50_{\text{реал}} 38,0 \pm 0,44$ мм рт. ст.) (рисунок 3.7).

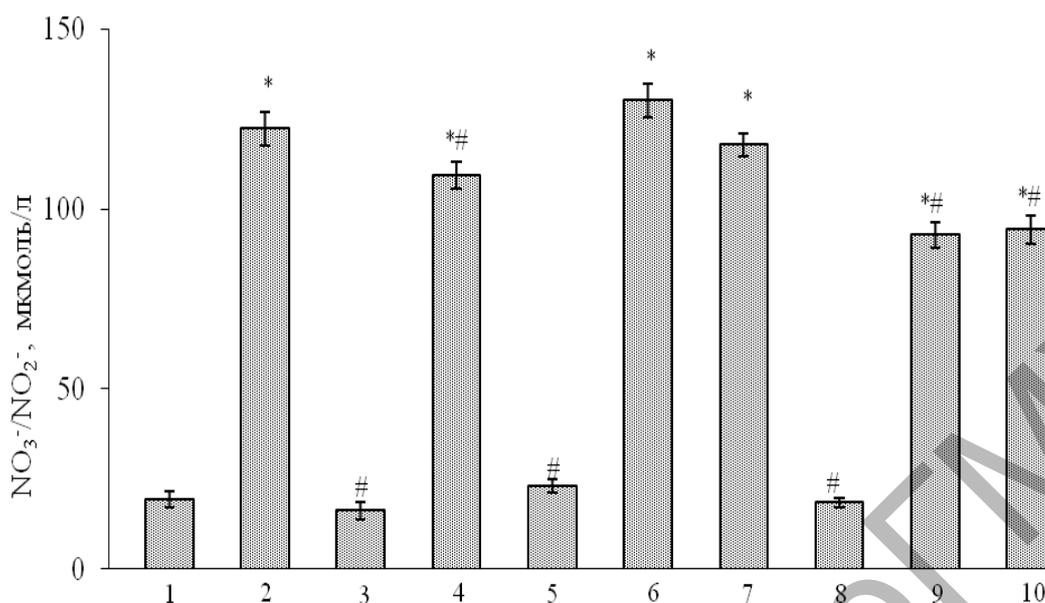


Рисунок 3.6 – Концентрация нитратов/нитритов в плазме крови у крыс при окислительном стрессе в условиях модуляции L-аргинин–NO системы

1- контроль, 2- ЛПС, 3- L-NAME, 4- ЛПС + L-NAME, 5- L-аргинин, 6- L-аргинин + ЛПС, 7- L-аргинин + ЛПС + L-NAME, 8- L-NIL, 9- ЛПС + L-NIL, 10- L-аргинин + ЛПС + L-NIL.

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

Принимая во внимание тот факт, что система транспорта кислорода имеет важное значение для эффективного функционирования основных биоэнергетических процессов организма, можно предположить, что состояние КТФ крови имеет значение в возникающих изменениях активности процессов свободнорадикального окисления при окислительном стрессе. Модуляция окислительного стресса путём введения L-NAME снижала SGK при реальных значениях pH, pCO_2 и температуры у крыс на 21,6 % ($p < 0,001$) в сравнении с контрольной группой. Введение L-NIL уменьшало показатель $p50_{\text{станд}}$ на 8,6 % ($p < 0,02$), хотя в сравнении с контролем он был выше на 6,7 % ($p < 0,05$); $p50_{\text{реал}}$ также уменьшался на 10,6 % ($p < 0,001$) в сравнении с группой животных, получавших ЛПС. Дополнительное предварительное введение L-аргинина в этих условиях существенно не меняло характер изменения SGK (как в стандартных, так и в реальных условиях). Положение соответствующих КДО приведено на рисунке 3.7, а именно, их

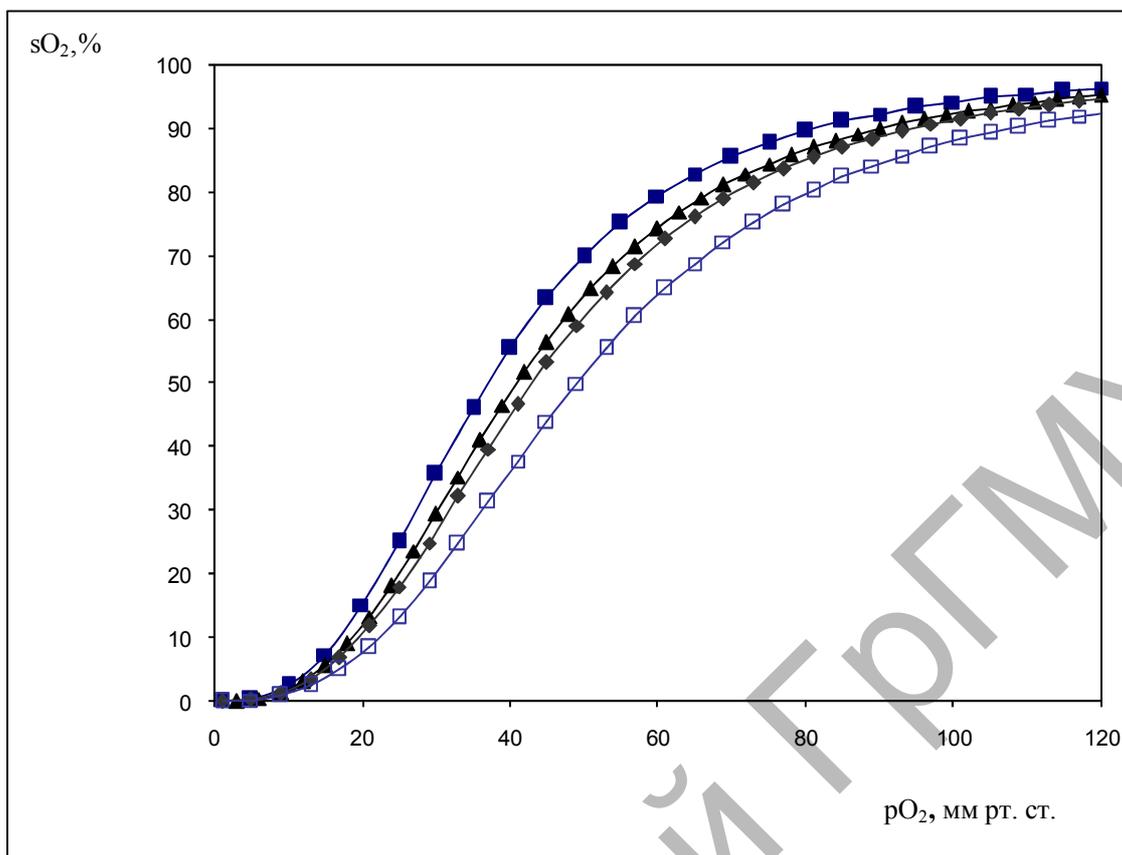


Рисунок 3.7 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, pCO₂ и температуры у крыс при окислительном стрессе в условиях модуляции L-аргинин-NO системы: контроль (■), ЛПС (□), ЛПС + L-NIL (◆) и L-аргинин + ЛПС + L-NIL (▲)

сдвиг вправо, но в меньшей степени, чем в группе крыс, получавших только ЛПС. Данные изменения SGK, с одной стороны, могут иметь значение для оксигенации тканей, формирования оптимального потока кислорода, с другой – для создания определённого прооксидантно–антиоксидантного баланса в организме.

Метгемоглобин (продукт взаимодействия NO и оксигемоглобина) не способен связываться с кислородом, что, казалось бы, снижает кислородную ёмкость крови. Однако существуют редуктазные системы как в эритроците, так и вне его, которые способны обеспечить восстановление метгемоглобина. Также следует учитывать возможность образования других NO-форм гемоглобина, а именно, HbFe²⁺NO и SNO-Hb. Разнообразные эффекты NO реализуются в условиях

высокого содержания гемоглобина в крови. В то же время, существуют определённые механизмы, обеспечивающие модуляцию редокс-чувствительных сигнальных путей, а именно: образование NO-производных гемоглобина, наличие гидрофобной клеточной мембраны эритроцита (как барьера для диффузии NO), существование вокруг эритроцита плазменной зоны [Patel R.P., 2000].

Выявленные особенности эффекта модуляции L-аргинин-NO системы на КТФ крови, прежде всего при введении L-NIL, и отсутствие его при использовании других средств отражают сложный механизм участия NO в развитии окислительного стресса, реализуемый через кислородсвязывающие свойства крови.

3.3 Кислородтранспортная функция крови при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и модуляции синтеза NO

Исходя из данных, полученных в экспериментах, представленных в предыдущем разделе, была поставлена задача по оценке КТФ крови при введении кверцетина и L-NIL в условиях окислительного стресса, индуцированного введением ЛПС. Инъекция кверцетина существенно не изменяла значения показателей кислотно-основного состояния и кислородсвязывающих свойств крови (таблица 3.4) в сравнении с контролем. В условиях окислительного стресса введение данного препарата характеризовалось развитием метаболического ацидоза в сравнении с контрольной группой животных (не получавших ЛПС). Так, величина рН при окислительном стрессе уменьшалась с $7,285 \pm 0,009$ до $7,163 \pm 0,013$ ($p < 0,001$) ед., но при введении кверцетина его значение было на $0,035 \pm 0,011$ ($p < 0,05$) ед. выше, чем у животных, получавших только ЛПС. В этой группе животных pO_2 крови также увеличилось с $21,5 \pm 0,87$ до $24,5 \pm 0,60$ ($p < 0,02$) мм рт. ст., т.е. на 14,0 %. В целом динамика изменения показателей кислотно-основного состояния крови и кислородсвязывающих свойств крови (таблица 3.4) отражала некоторое снижение проявлений метаболического ацидоза и гипоксии при окислительном стрессе в условиях введения

кверцетина в сравнении с животными, получавшими только ЛПС. При этом дополнительное введение L-NIL на характер нарушений кислородного режима существенного влияния не оказывало.

В этой серии (кверцетин и ЛПС) отмечалось уменьшение СГК, которое проявлялось в увеличении показателей $p50$ как при стандартных, так и реальных значениях pH , pCO_2 и температуры. Их прирост, в сравнении с контрольной группой, составил 7,3 % ($p < 0,02$) и 17,1 % (0,001) соответственно, что было на 8,1 % ($p < 0,01$) и на 5,7 % ($p < 0,001$) меньше, чем в группе животных с окислительным стрессом. Соответствующие КДО при стандартном и реальном значениях pH , pCO_2 и температуры смещались вправо, что, в целом, отражало усиление потока кислорода в ткани (рисунок 3.8). Характер изменения СГК при использовании кверцетина и L-NIL примерно такой же.

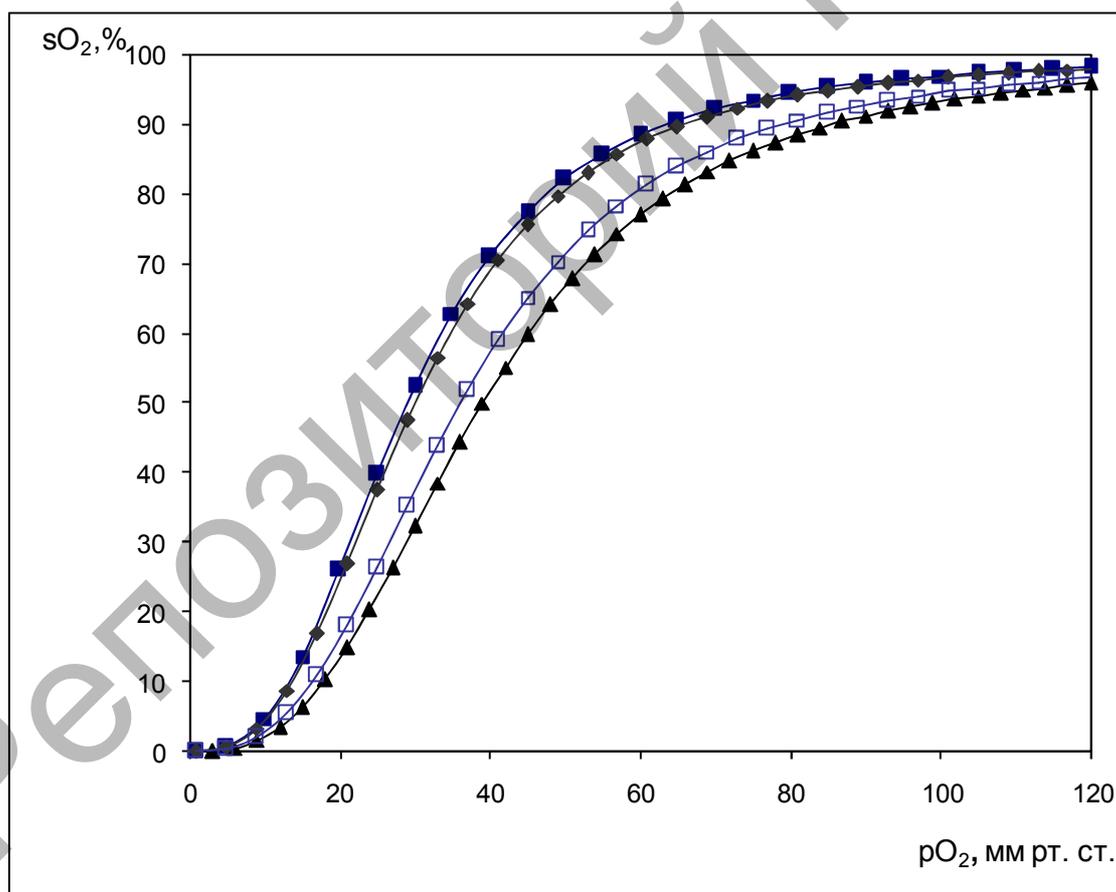


Рисунок 3.8 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH , pCO_2 и температуры у крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина: контроль (■), ЛПС (▲), кверцетин (◆), кверцетин + ЛПС (□)

Концентрация одного из NO-производных гемоглобина, а именно, метгемоглобина (таблица 3.4), возростала с $0,71 \pm 0,05$ до $1,92 \pm 0,22$ ($p < 0,001$) %, т.е. на 170,4 %. Однако она была на 28,9 % ($p < 0,05$) меньше в сравнении с концентрацией метгемоглобина у крыс, получавших только ЛПС. Применение в этих условиях L-NIL характеризовалось некоторым уменьшением содержания метгемоглобина, а именно, на 54,5 % ($p < 0,001$) по отношению к группе с ЛПС, но всё же концентрация его была больше, чем в контроле, на 73,2 % ($p < 0,001$). Данный характер изменения содержания метгемоглобина, как одного из потенциальных модуляторов SGK, отражает его незначительное участие в наблюдаемом сдвиге КДО.

Концентрация нитратов/нитритов в плазме крови в данных условиях опыта приведена в таблице 3.4. Введение кверцетина при окислительном стрессе характеризовалось снижением их концентрации на 14,8 % ($p < 0,02$). Ингибирование iNOS вызывало уменьшение концентраций нитратов/нитритов в плазме крови на 21,1 % ($p < 0,001$) в сравнении с группой крыс, получавших только ЛПС, что, в целом, свидетельствует о снижении функциональной активности L-аргинин-NO системы. Основным источником NO в организме является эндотелий, стимуляция eNOS ацетилхолином дозозависимо повышало уровень NO_2^- венозной крови [Lauer T. et al., 2001].

Однонаправленный характер изменения параметров КТФ крови при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, а также выраженность этих изменений в условиях модуляции как L-аргинин-NO системы, так и введения кверцетина, отсутствие взаимоусиливающего эффекта определяется, вероятно, общими механизмами, лежащими в основе сложного комплекса нарушений при данном состоянии.

Известно влияние NO на различные показатели КТФ крови. Нарушение структуры мембран, внутриклеточного метаболизма и связанные с ними изменения формы эритроцитов при патологических процессах определяют агрегационные и реологические свойства клеток крови [Степовая Е.А. и др., 2004]. Установлен эффект NO на структурные и функциональные свойства эритроцитов: инкубация крови со спермин-NONO-атом

Таблица 3.4 – Кислородсвязывающие свойства крови, концентрация нитратов/нитритов в плазме крови у крыс при окислительном стрессе в условиях введения кверцетина и L-лизина-N^G-ацетамидина ($\bar{x} \pm S_x$)

Показатель	Контроль	ЛПС	Кверцетин	Кверцетин + ЛПС	Кверцетин + ЛПС + L-NIL
n	10	9	9	8	9
Метгемоглобин, %	0,71±0,05	2,70±0,27*	0,83±0,09#	1,92±0,22*#	1,23±0,11*#
pO ₂ , мм рт.ст.	27,9±0,72	21,5±0,87*	27,2±1,16#	24,5±0,60*#	24,3±0,57*#
p50 _{реал} , мм рт.ст.	38,0±0,44	47,2±0,37*	38,1±0,51#	44,5±0,43*#	44,5±0,39*#
p50 _{станд} , мм рт.ст.	32,8±0,72	38,3±0,91*	33,5±0,54#	35,2±0,47*#	34,9±0,50*#
pH, ед.	7,285±0,01	7,163±0,01*	7,290±0,01#	7,198±0,01*#	7,201±0,01*#
pCO ₂ , мм рт.ст.	50,0±0,91	51,9±1,08	52,1±1,09	50,5±1,28	49,3±1,12
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	23,43±0,34	18,41±0,52*	24,59±0,62#	18,53±0,26*	18,14±0,51*
TCO ₂ , ммоль/л	24,71±0,51	19,92±0,23*	26,23±0,64#	20,01±0,38*	19,53±0,41*
ABE, ммоль/л	-3,12±0,17	-9,91±0,30*	-2,11±0,17*#	-9,30±0,45*	-9,82±0,57*
SBC, ммоль/л	17,71±0,55	15,25±0,43*	19,52±0,57*#	14,35±0,45*	15,10±0,42*
NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻ , мкмоль/л	19,25±2,25	122,25±4,75*	22,68±2,20#	104,17±4,09*#	95,25±2,61*#

Примечание: *- p < 0,05 по отношению к контрольной группе, # - по отношению к группе, получавшей ЛПС.

снижает деформируемость эритроцитов и p50 (в зависимости от концентрации NO, не влияя на активность ПОЛ) [Mesquita R., Pícarra B., 2002].

Химически модифицированные гемоглобины, разработанные как средства кислородной терапии, предназначены для устранения недостатка кислорода, вызываемого ишемией при различных патологических ситуациях, но возникающие окислительные процессы (иногда усиливаемые при введении

модификаций, снижающих сродство к кислороду) могут ограничивать безопасность этих белков. Связанные с гемоглобином прямые цитотоксические эффекты относят к редокс-реакциям между гемоглобином и перекисями (т.е. перекисью водорода, перекисями липидов и пероксинитритом) на клеточном, тканевом и органном уровнях. Эффекты реакций между гемоглобином и АФК могут быть значимыми для окислительного повреждения, включая нарушения различных редокс-чувствительных сигнальных путей [Yeh L.H., Alayash A.I., 2003], затрагивая, на наш взгляд, механизм модификации самого гемоглобина.

Таким образом, выявлено, что у крыс при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, уменьшается сродство гемоглобина к кислороду крови при реальных значениях рН, рСО₂ и температуры, увеличивается содержание нитратов/нитритов в плазме крови. В условиях окислительного повреждения данные нарушения кислородсвязывающих свойств крови были выражены в большей степени при введении неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина, и в меньшей степени – при введении селективного ингибитора NO-синтазы L-лизина-N^G-ацетамидина и кверцетина. Изменение SGK через NO-зависимые механизмы может влиять на поток кислорода в ткани и его долю в свободнорадикальных реакциях при окислительном стрессе. Можно предположить, что уменьшение SGK при окислительном стрессе путём увеличения количества молекулярного кислорода в крови создаёт предпосылки, в условиях неэффективной утилизации кислорода, для чрезмерной активации процессов ПОЛ.

Изменение SGK через NO-зависимые механизмы различной природы может влиять не только на поток кислорода в ткани, но и на прооксидантно-антиоксидантный баланс организма при окислительном стрессе (рисунок 3.9).

Высокие дозы нитроглицерина (источник NO) вызывают увеличение образования HbFe²⁺NO, коррелирующее с ростом значения р50 и соответствующим сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо [Kosaka H., Seiyama A., 1996]. В опытах на животных, получавших L-аргинин и подвергавшихся гипотер-

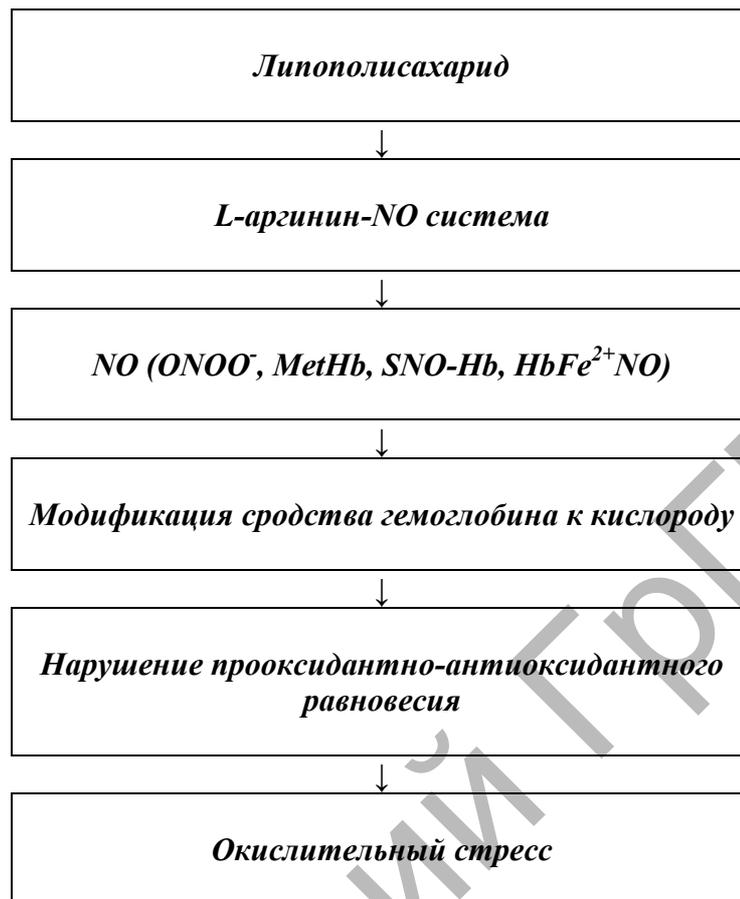


Рисунок 3.9 – Участие кислородсвязывающих свойств крови в патогенезе окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом

мии, отмечался наименьший сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево, вызываемый низкой температурой [Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., 2002].

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, определяя развитие окислительного стресса, а как следствие снижения вклада других факторов в антиоксидантный потенциал организма и, в частности, изменение СГК [Zinchuk V.V., Khodosovsky M.N., 2003]. Степень дисбаланса показателей прооксидантно-антиоксидантного равновесия у животных с повышенным СГК (за счёт его направленной модификации) при введении ЛПС была наименьшей, модуляция L-аргинин-NO системы при этом практически не влияла на уровень ОШ и содержание

антиоксидантов [Зинчук В.В., 2005], что предполагает схожесть механизмов их антиоксидантного действия.

Результаты выполненных исследований доказывают, что инфузия селективного ингибитора NO-синтазы L-NIL при окислительном стрессе, индуцированном ЛПС, уменьшает кислородную недостаточность, обуславливает наименьший дисбаланс прооксидантно-антиоксидантного состояния, в то время как введение неселективного ингибитора NO-синтазы или L-аргинина не вызывает улучшения антиоксидантной защиты. При смещении КДО вправо (введение ЛПС) наблюдается сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону активации ПОЛ и снижение резерва антиоксидантной системы.

Выявлены характер изменений показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса и КТФ крови при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, а также их выраженность в условиях модуляции как L-аргинин-NO системы, так и введения кверцетина. Отсутствие потенцирования их эффекта (кверцетин+L-NIL) обусловлено близкими механизмами, реализуемыми также через кислородсвязывающие свойства крови и NO. Представляется перспективным создание новых фармакологических средств, основанных на образовании адекватных количеств NO, для коррекции осложнений, вызываемых ЛПС. Выявленные изменения КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса у кроликов и крыс при введении ЛПС в условиях модуляции L-аргинин-NO системы и АОС организма отражают участие исследуемых механизмов в патогенезе окислительных повреждений органов. Целенаправленным воздействием на механизмы транспорта кислорода кровью и образования NO можно ослабить повреждающее действие ЛПС.

3.4 Исследование механизмов транспорта кислорода кровью в течение первых 5 суток после введения липополисахарида

ЛПС является облигатным компонентом клеточной мембраны грамотрицательных бактерий, которые широко распространены в природе. Известно его влияние на различные механизмы и процессы, обеспечивающие сопряжение системы

терморегуляции с другими функциональными системами [Гурин В.Н., Гурин А.В., 2004]. Показано изменение афферентной импульсации в блуждающих нервах и ректальной температуры [Лапша В.И. и др., 2001], бульбарных механизмов регуляции болевой чувствительности после введения эндотоксина *E. coli* [Кульчицкий С.В. и др., 2000], а также его эффект на активность периферических и центральных звеньев интероцептивных рефлексов у крыс, благодаря чему в естественных условиях поддерживается определенный уровень тонической активности чувствительных афферентных волокон в постганглионарных нервах, а также вагусных эфферентов под диафрагмой [Солтанов В.В., 2006]. ЛПС в больших дозах индуцирует опосредуемый рецепторами каскад сигналов, ведущий к активации NF- κ B, транскрипции и, далее, к высвобождению моноцитами и макрофагами цитокинов и других провоспалительных медиаторов. При избыточной продукции последних возникает синдром септического шока [Sakaguchi S., Furusawa S., 2006], в результате чего в организме накапливаются продукты, приводящие к серьёзным нарушениям прооксидантно-антиоксидантного равновесия, то есть окислительного стресса. Вопрос о влиянии ЛПС на показатели транспорта кислорода кровью в течение более длительного периода времени остается недостаточно изученным.

Отмечается ухудшение основных показателей кислотно-основного состояния и КТФ крови на протяжении 5 суток после введения ЛПС [Шульга Е.В., Зинчук В.В., 2009]. Наблюдается статистически значимая зависимость между исследуемыми параметрами и временем после инъекции ЛПС (критерий Краскела-Уоллиса), что представлено в таблице 3.5. Через 12 часов отмечается смещение рН крови в кислую сторону: значение этого показателя снижается на 1,85% ($p < 0,008$), а затем, через пять суток, его величина приближается к значению контрольной группы. Параметры $p\text{CO}_2$, SBC, SBE, ABE, TCO_2 и HCO_3 уменьшаются также через 12 часов после введения ЛПС, но уже через одни сутки отмечается восстановление значений, достигая уровня контрольной группы через пять суток. Показатель SO_2 после снижения через 12 часов ($p < 0,008$) увеличивается через

Таблица 3.5 – Изменение показателей кислородтранспортной функции крови кроликов после введения липополисахарида

Показатель	Контроль	После введения липополисахарида через			Критерий Краскела-Уоллиса
		12 часов	1 сутки	5 суток	
n	6	8	6	5	
pH, ед.	7,425±0,012	7,288±0,019*	7,397±0,021 [#]	7,426 (7,416-7,452)	p=0,004
pCO ₂ , мм рт.ст.	40,4±1,92	28,2±1,30*	29,65 (27,80-32,0)	41,6±1,82 [#]	p<0,001
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	26,70±0,88	13,64±0,59*	19,33±0,78* [#]	26,64±1,84 [#]	p<0,001
TCO ₂ , ммоль/л	27,95±0,93	14,49±0,62*	20,32±0,81* [#]	27,90±1,87 [#]	p<0,001
ABE, ммоль/л	2,78±0,75	-11,0±0,70*	-4,10±0,83* [#]	2,38±2,05 [#]	p<0,001
SBE, ммоль/л	2,10±0,87	-13,18±0,79*	-5,68±0,92* [#]	1,72±2,24 [#]	p<0,001
SBC, ммоль/л	26,77±0,66	15,70±0,59*	20,35 (20,0-22,0)* [#]	26,10±1,62 [#]	p<0,001
CvO ₂ , мл O ₂ /л	8,75±1,26	6,64±0,65	7,87±0,54	6,84±0,44	p=0,328
SO ₂ , %	75,17±1,45	59,76±2,38*	64,27±3,20	57,44±4,19*	p=0,004
MetHb, %	1,68±0,23	1,08±0,23	1,48±0,15	1,70±0,53	p=0,349
pO ₂ , мм рт. ст.	43,2±1,22	38,5±1,45	35,8±1,45	34,0±1,82	p=0,012
p50 _{реал} , мм рт. ст.	33,2±0,70	39,2±0,93*	33,8±0,78 [#]	33,4±0,48 [#]	p<0,001
p50 _{станд} , мм рт. ст.	31,0±0,21	29,5±0,45	29,5±0,28*	31,5±0,50	p=0,007
T, °C	38,9±0,17	39,4 (39,3-39,5)	39,2±0,25	38,3±0,17 [#]	p=0,024

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к контролю (p<0,008) – *, по отношению к группе животных, получавших липополисахарид, через 12 часов (p<0,008) – [#] (критерий Манна-Уитни).

одни сутки (p=0,025) и снижается через пять суток (p<0,008) после введения ЛПС.

Значение p50_{станд} в сравнении с контролем уменьшается через одни сутки на 4,8% (p<0,008) после введения ЛПС, а через пять суток наблюдается приближение его к контролю. Показатель p50_{реал} через 12 часов после инъекции ЛПС возрастает на 18,0% (p<0,008), что характеризует смещение КДО вправо при реальных значениях pH, pCO₂ и температуры, а затем, в течение пяти суток, значение p50 снижается, приближаясь к контролю (рисунок 3.10).

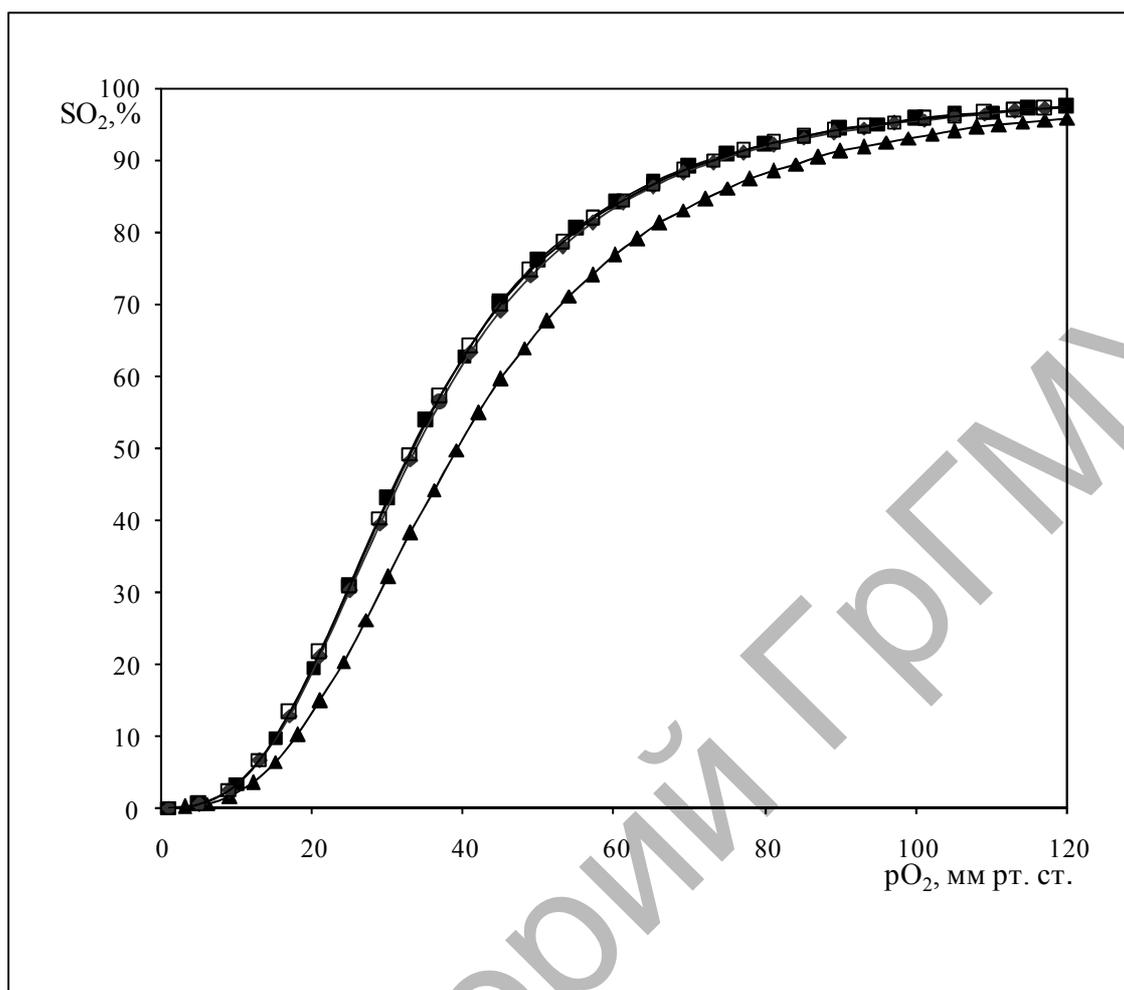


Рисунок 3.10 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях рН, рСО₂ и температуры в контроле (0,9% NaCl) (■), через 12 часов (▲), 1 сутки (◆) и 5 суток после введения липополисахарида (□)

Известно, что низкие концентрации NO, продуцируемые эNOC в течение нескольких секунд, оказывают цитопротекторное действие, уменьшают продукцию провоспалительных цитокинов, в то время как чрезмерно большое количество NO, генерируемое иNOC под действием ЛПС в течение длительного периода времени, обладает цитотоксическими эффектами [Guzik T.J. et al., 2003]. Установлено, что введение селективного ингибитора иNOC (N⁶-(1-iminoethyl)-L-lysine hydrochloride) крысам предотвращает нарушения гемодинамических показателей и газового состава крови при септическом шоке, вызванном наложением лигатуры на толстый кишечник [Kadoi Y, Goto F., 2004].

Суммарное содержание нитрат/нитритов увеличивается через 12 часов после введения ЛПС на 7,3 мкмоль/л ($p < 0,008$), через одни сутки – на 15,5 мкмоль/л ($p < 0,008$), а через пять суток этот параметр снижается и приближается к значению контрольной группы.

Таким образом, введение ЛПС приводит к ухудшению КТФ крови. Попадая в организм, он может вызывать в первые часы действия изменения углеводного, липидного метаболизма, апоптоз эндотелия микрососудов, инфильтрацию воспалительных клеток [Рябиченко Е.В. и др., 2005]. ЛПС индуцирует системный воспалительный ответ за счет чрезмерной секреции провоспалительных медиаторов [Bhattacharyya J. et al., 2004]. По данным некоторых авторов, в течение первых пяти суток после введения ЛПС *E. coli* Serotype O55:B5 (0,5 мг/кг) наблюдается снижение массы тела животных на 5–9%, субэндотелиальная вакуолизация, слущивание эндотелиальных клеток, обнажение эндотелия в крупных сосудах и развитие эндотелиальной дисфункции [Wiel E. et al., 2000].

В результате проведенных исследований было установлено, что после введения ЛПС наблюдается развитие метаболического ацидоза, снижение СГК при реальных значениях рН, рСО₂ и температуры в течение первых пяти суток. Наиболее значимые изменения имеют место через 12 часов, затем отмечается некоторое улучшение исследуемых показателей, а через пять суток – приближение их значений к контрольной группе.

3.5 Изучение влияния аминогуанидина на кислородтранспортную функцию крови через 12 часов после введения липополисахарида

ЛПС повышает уровень провоспалительных цитокинов, таких как ФНО- α , активирует NF- κ B, увеличивает продукцию свободных радикалов [Victor V.M. et al., 2005], при этом также происходит повышение в плазме крови уровня нитрат/нитритов за счет активации иNOS, увеличение циклооксигеназы-2 в печени, легких, аорте и лимфоцитах [Shen K.P. et al., 2007]. АГ обратимо инактивирует иNOS, изменяя конформацию белка и ковалентно связываясь с геном, но без изменения его структуры [Бонарцев

А.П. и др., 2004]. Он полностью блокирует ЛПС-индуцированную активацию синтеза индуцибельных Hsp70 во всех типах макрофагов и защищает от ЛПС-индуцированного апоптоза [Малышева Е.В. и др., 2006]. В наших экспериментах изучалось действие АГ на показатели КТФ крови после введения ЛПС [Шульга Е.В., 2009]. Данный селективный ингибитор иNOS в дозе 300 мг/кг вводили подкожно кроликам-самцам за 1 час до внутривенной инъекции ЛПС (500 мкг/кг), а затем, через 12 часов, осуществляли забор смешанной венозной крови из правого предсердия.

Введение АГ перед инъекцией ЛПС приводит к изменению показателей КТФ крови, что отображено в таблице 3.6. Наблюдается повышение рН на 0,62% ($p < 0,05$), а также увеличение значений АВЕ на 35,3% ($p < 0,05$), pCO_2 на 23,8% ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС. После введения данного фактора наблюдается ухудшение показателей КТФ крови, в то время как использование АГ и ЛПС приводит к увеличению показателей C_vO_2 , SO_2 и pO_2 на 22,2% ($p < 0,05$), 12,6% ($p < 0,05$) и 12,0% ($p < 0,05$), соответственно. Как известно, эндотоксин уменьшает венозное pO_2 в почечных сосудах и доставку кислорода к тканям [Mik E.G. et al., 2008], в то время как АГ улучшает доставку и потребление кислорода в данных условиях [Tang H.X., Fan X.M., 2003].

Применение АГ перед введением ЛПС приводит к снижению показателя $p50$ при реальных значениях рН, pCO_2 и температуры на 6,2% ($p < 0,05$) в сравнении с группой кроликов, получавших только ЛПС, что соответствует отклонению положения КДО влево (рисунок 3.11). В то же время показатель $p50_{\text{станд}}$ достоверно не изменяется.

В таких условиях отмечается уменьшение NO-продуцирующей активности организма: уровень нитрат/нитритов в плазме крови снижается с $22,28 \pm 1,32$ до $6,34 \pm 0,51$ мкмоль/л ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС.

Таким образом, результаты проведенной работы показывают, что введение АГ обуславливает улучшение показателей кислотно-основного состояния, повышение СГК при реальных значениях рН, pCO_2 и температуры, а также снижение

Таблица 3.6 – Показатели кислородтранспортной функции крови у кроликов после введения аминокуанидина и липополисахарида

Показатель	Липополисахарид	Аминокуанидин+ липолисахарид	Критерий Манна-Уитни
n	8	9	
pH, ед.	7,288±0,019	7,333±0,006 [#]	p=0,039
pCO ₂ , мм рт.ст.	28,2±1,30	34,9±0,67 [#]	p=0,003
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	13,64±0,59	16,26±1,07	p=0,102
TCO ₂ , ммоль/л	14,49±0,62	17,30±1,11	p=0,075
ABE, ммоль/л	-11,0±0,70	-7,10±0,66 [#]	p=0,006
SBE, ммоль/л	-13,18±0,79	-10,47±1,30	p=0,178
SBC, ммоль/л	15,70±0,59	15,71±1,04	p=0,665
CvO ₂ , мл O ₂ /л	6,64±0,65	8,11±0,39 [#]	p=0,049
SO ₂ , %	59,76±2,38	67,32±1,45 [#]	p=0,049
MetHb, %	1,08±0,23	1,09±0,06	p=0,630
pO ₂ , мм рт. ст.	38,5±1,45	43,1±1,11 [#]	p=0,030
p50 _{реал} , мм рт. ст.	39,2±0,93	36,7±0,38 [#]	p=0,034
p50 _{станд} , мм рт. ст.	29,5±0,45	29,2 (29,2-30,9)	p=0,386
Температура, °С	39,4 (39,3-39,5)	38,9±0,06 [#]	p=0,011

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределениях; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни).

активности процессов ПОЛ и содержания гомоцистеина, повышение уровня факторов антиоксидантной системы через 12 часов после введения ЛПС.

Известные механизмы антиоксидантной защиты на клеточном уровне, не предотвращая образование супероксидного

аниона и других активных интермедиатов кислорода, способны лишь в определённых пределах устранять «свободнорадикальное

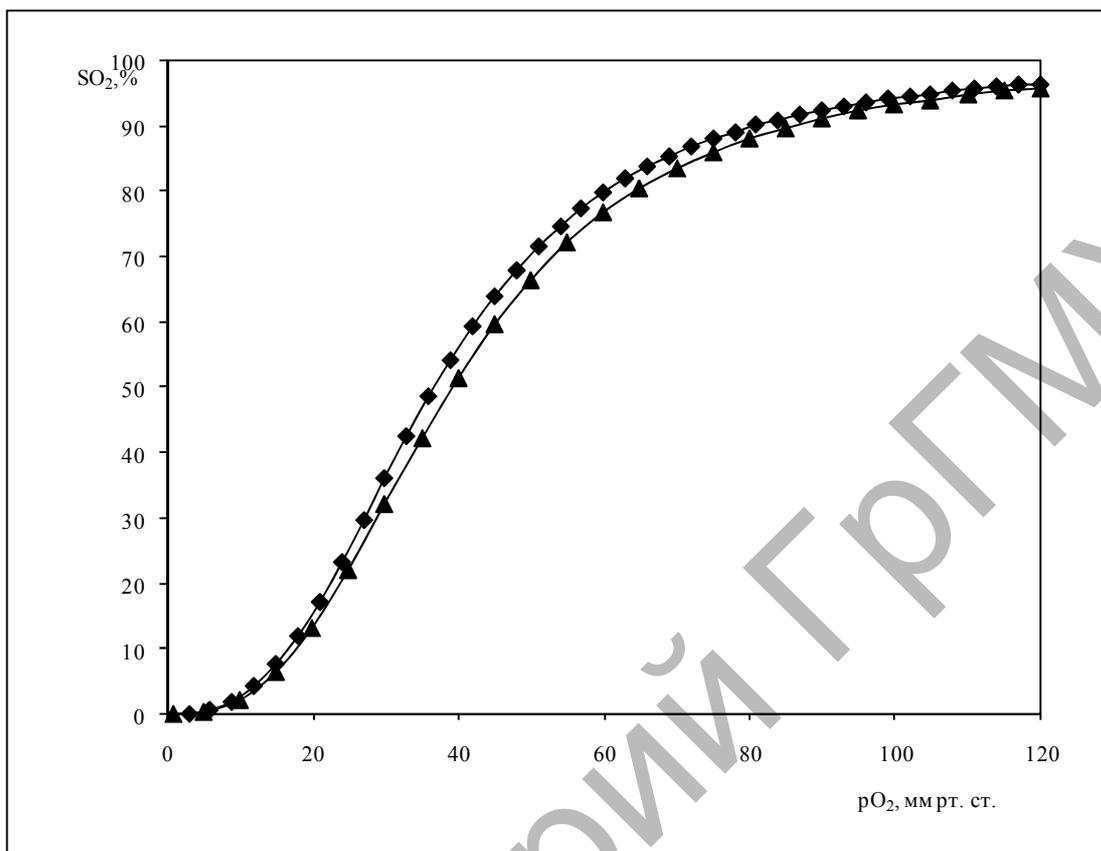


Рисунок 3.11 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях рН, рСО₂ и температуры у кроликов в условиях действия липополисахарида (▲) и аминогуанидина + липополисахарида (◆)

зло» [Скулачев В.П., 1995], что предопределяет интерес к другим факторам АОС. Гемоглобин, изменяя своё сродство к кислороду, может регулировать поток кислорода в ткани в соответствии с их потребностью в нём и, тем самым, предупреждать избыточное его использование для свободнорадикального окисления, что позволяет рассматривать SGK как один из факторов, участвующих в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма [Борисюк М.В., 1989; Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999]. Составной частью защитных механизмов при инициируемом гидроперекисями окислительном стрессе является оксигемоглобин, про- либо антиоксидантные качества которого зависят как от его кислородсвязывающих свойств, так и от состояния самой молекулы гемоглобина [Заводник И.Б.,

Лапшина Е.А., 1996]. Предполагается возможность ослабления прооксидантного потенциала модифицированным гемоглобином [Privalle С., Talarico Т., 2000]. Показано участие СГК в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия при целенаправленном его повышении в условиях введения ЛПС в малых дозах [Zinchuk V.V., Borisiuk M.V., 1997].

Гемоглобин регулирует вытеснение NO, а поскольку кровоток регулируется наномолярными уровнями нитрозотиолов, образование монооксида азота важно не только для расширения кровеносных сосудов, но и оксигенации крови и тканей [Зинчук В.В., 2003; Pronko Т.Р., Zinchuk V.V., 2009]. На наш взгляд, значение NO-соединений с гемоглобином необходимо оценивать и через их эффект на СГК. Их влияние на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови проявляется при высоких концентрациях (5 и более %), но в то же время их эффект может иметь важное значение для процессов газообмена на уровне капилляра [Zinchuk V., Borisiuk V., 1998; Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., 2002]. Следует учитывать гетерогенность эндотелия по NO-образующей функции по ходу сосудистого русла. Различие эндотелия по активности NO-синтаз и особенности объёмного содержания крови (на долю терминальных артериол и капилляров приходится 69% от общей площади сосудистой системы, объём содержащейся в них крови составляет 10%) в разных отделах сердечно-сосудистой системы [El-Yassin I. et al., 1978] предполагает более высокое содержание NO и его производных на микроциркуляторном участке сосудистого русла (в 100 и более раз) и, соответственно, его большую долю, непосредственно взаимодействующую с гемоглобином [Зинчук В.В., 2003]. На уровне микроциркуляции крови это может быть чрезвычайно важным для модификации кислородсвязывающих свойств гемоглобина и, в конечном итоге, для оптимальной оксигенации тканей. Это может иметь важное значение в модификации функциональных свойств гемоглобина и его участия в формировании потока кислорода в ткани, поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме [Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., 2002].

Ингибирование иNOC при введении эндотоксина, ведущего к росту содержания свободных радикалов в 20-50 раз, не всегда

оказывается эффективным, что, по-видимому, связано с участием других нейрогуморальных механизмов [Проскураков С.Я. и др., 2004]. Известно, что при различных патологических состояниях использование L-аргинина вызывает в ряде случаев позитивный эффект, который реализуется через сосудистые механизмы, в том числе через активацию эНОС («аргининовый парадокс») [Moncada S., Higgs E.A., 1993; Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., 2002]. В наших экспериментах защитное действие L-аргинина на активацию свободнорадикальных процессов не выявлено. Очевидно, это обусловлено дисбалансом в функционировании L-аргинин-NO системы, в частности, чрезмерной экспрессией иНОС. Существенных различий в изменении показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, в условиях модуляции как L-аргинин-NO системы, так и введения кверцетина, не выявлено. Установлено антиоксидантное действие экзогенных растительных фенолов (в т.ч. флавоноидов), обладающих способностью предупреждать возникновение свободных радикалов, нейтрализовать развитие эффектов АФК путём предотвращения пероксидации липидов и образования хелатных комплексов с металлами, что определяет высокую реакционную активность флавоноидов, которые защищают от окисления другие соединения или способствуют их восстановлению [Залесский В.И., Великая Н.В., 2003]. Очевидно, отсутствие потенцирования их эффекта связано с развитием близких механизмов, лежащих в основе генеза этого состояния.

ГЛАВА 4 РЕГУЛЯЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СОСТОЯНИЯ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

4.1 Физиологическое значение мелатонина

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), продуцируемый в эпифизе, сетчатке глаза, клетках APUD системы пищеварительного тракта, печени, желчном пузыре, почках, надпочечниках, легких, плаценте, эндометрии, яичниках, предстательной железе, тимусе, эндотелии, клетках крови (лейкоцитах, тромбоцитах), регулирует циркадную динамику физиологических функций [Барабой В.А., 2000; Комаров Ф.И. и др., 2004; Бондаренко Л.А., Бабенко Н.А., 2006]. Из аминокислоты триптофан синтезируется серотонин, а под воздействием фермента N-ацетилтрансферазы он превращается в мелатонин с участием ферментов N-ацетилтрансферазы и гидроксиндол-О-метилтрансферазы (рисунок 4.1).

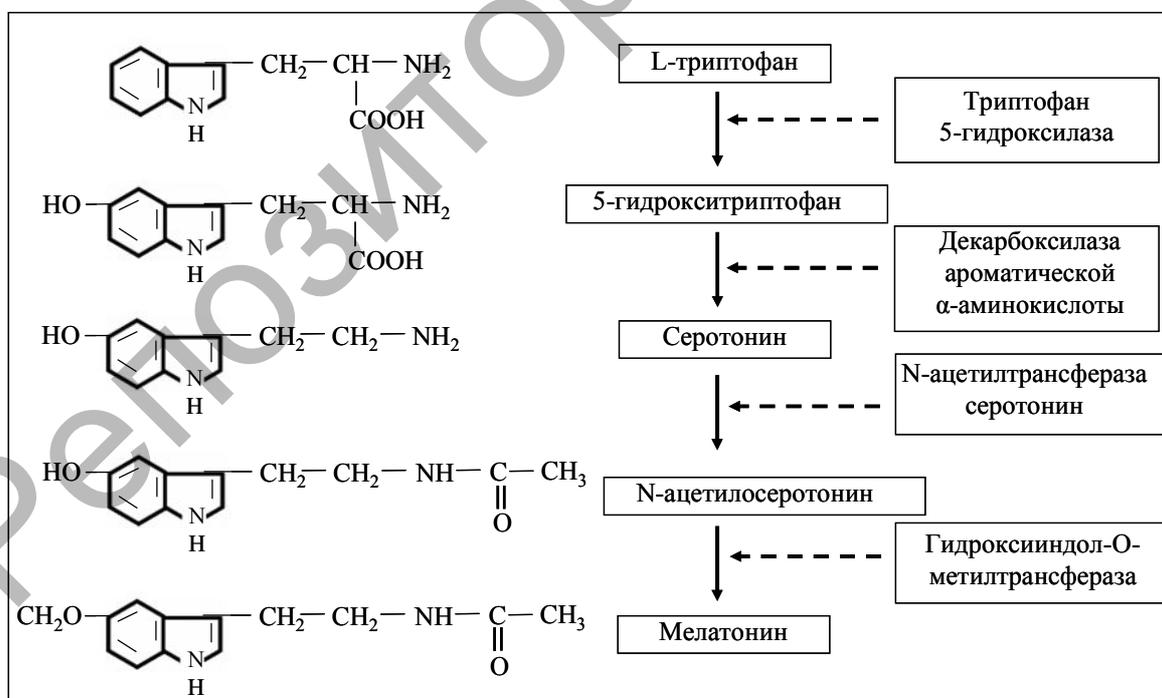


Рисунок 4.1 – Основные пути синтеза мелатонина

Данный гормон является универсальным эндогенным адаптогеном, который поддерживает гомеостаз организма на определенном уровне и обеспечивает приспособление к непрерывно меняющимся условиям внешней среды [Анисимов В.Н., 2008]. Воздействие постоянного освещения усиливает активность свободнорадикальных процессов и снижает уровень АОС [Илюхина В.А. и др., 2005], тогда как введение мелатонина уменьшает эти изменения [Hussein M.R. et al., 2007]. Угнетение функции эпифиза, достигаемое путем его удаления или содержанием при постоянном освещении (физиологическая эпифизэктомия), приводит к десинхронизации циркадных ритмов многих физиологических функций организма [Анисимов В.Н., 2008].

Спектр физиологических эффектов, вызываемых мелатонином, достаточно широк (рисунок 4.2). Действие данной

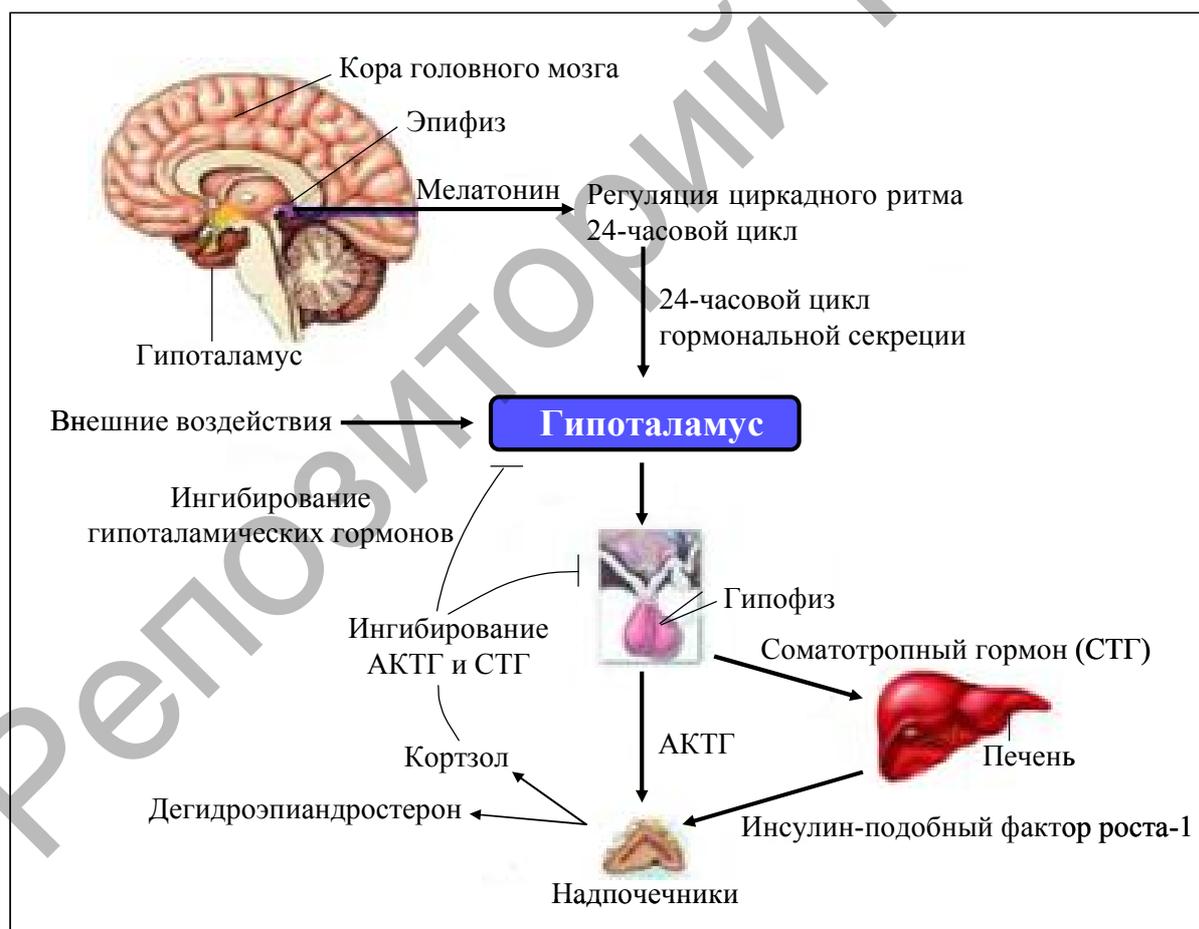


Рисунок 4.2 – Участие мелатонина, продуцируемого эпифизом, в функционировании «биологических часов» и в основных физиологических процессах организма [Brzozowski I. et al., 2009]

субстанции реализуется на системном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях [Комаров Ф.И. и др., 2004], обусловленное его способностью хорошо растворяться как в воде, так и в липидах, благодаря чему он проникает через клеточные мембраны и обеспечивает осуществление различных физиологических процессов [Catalá A., 2007; Анисимов В.Н., 2008]. Мелатонин взаимодействует с мембранными рецепторами (MT 1 и MT 2), G-белками, которые расположены в разных участках ЦНС, сетчатке глаза, кровеносных сосудах, желудочно-кишечном тракте, печени, почках, коже, клетках иммунной системы, а также с внутриклеточными белками, такими как хинонредуктаза 2, кальмодулин, кальретикулин и тубулин [Pandipregumal S.R. et al., 2008].

Взаимодействие одной молекулы мелатонина с 2 молекулами оксигемоглобина вызывает образование метаболитов данного гормона [Allegra M. et al., 2003; Tan D.X. et al., 2007], которые обуславливают большое количество эффектов. Так, N1-ацетил-N2-формил-5-метоксикинурамин и N-ацетил-5-метоксикинурамин проявляют прямые антиоксидантные свойства, являясь «ловушкой» свободных радикалов, увеличивают уровень антиоксидантных ферментов, стабилизируют клеточные мембраны, селективно ингибируют экспрессию генов провоспалительных ферментов и цитокинов, а также iNOS, и, как следствие, чрезмерную генерацию NO, развитие апоптоза, индуцированные ЛПС [Mayo J.C. et al., 2005; Tan D.X. et al., 2007].

Известно, что мелатонин является мощным антиоксидантом. Способность гормона проникать через биомембраны обеспечивает возможность защиты от окислительных повреждений как мембранных структур, так и ядерной ДНК [Барабой В.А., 2000]. Отмечается, что мелатонин, с одной стороны, проявляет прямые антиоксидантные свойства, выступая в роли «скавенджера» свободных радикалов, и подавляет активность процессов ПОЛ, а с другой – может усиливать активность ферментов АОС и повышать их уровень (СОД, каталаза, GSH-пероксидазы и др.), превосходя по силе действия естественный антиоксидант – α -токоферол [Reiter R.J. et al., 2000].

Мелатонин оказывает модулирующее действие на сосудистый тонус [Silva C.L. et al., 2007], а также предупреждает развитие эндотелиальной дисфункции, действуя синергистически с витаминами С и Е, GSH, снижая уровни провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α , интерферон- γ) и активность процессов ПОЛ, повышая АОС [Broncel M. et al., 2007]. В опосредованные данным гормоном эффекты на тонус сосудов, болевую чувствительность, кардиореспираторную функцию, а также влияние на центры регуляции соматических и вегетативных функций на разных уровнях ЦНС вовлечен серотонин [Тропникова Г.К. и др., 2007].

Следует отметить, что мелатонин оказывает защитное действие при ишемии/реперфузии в разных органах (сердце, легкие, печень), снижая активность свободнорадикальных процессов и повышая антиоксидантную защиту [Sahna E. et al., 2008], уменьшая вазоконстрикцию, сосудистую проницаемость, уровень нитрат/нитритов и улучшая состояние микроциркуляции [Bertuglia S., Reiter R.J., 2007]. Повышение уровня гомоцистеина в крови способствует образованию АФК, инициации процессов ПОЛ и подавлению активности антиоксидантных ферментов, в то время как использование мелатонина предотвращает данные изменения, снижая уровень гомоцистеина и ингибируя генерацию свободных радикалов [Baydas G. et al., 2006].

Отмечается, что мелатонин может выступать антагонистом действия ЛПС, уменьшая лихорадку и предотвращая образование простагландинов, цитокинов [Гурин В.Н., Гурин А.В., 2004]. Эффекты гормона после введения данного токсина связаны с усилением активности антиоксидантных ферментов (СОД, GSH-пероксидаза) и со стабилизацией структурно-функциональной организации клеточных мембран [Ozdemir D. et al., 2007], а также с ингибированием процессов ПОЛ, экспрессии NF- κ B и iNOS, снижением продукции NO [De Filippis D. et al., 2008]. Мелатонин, проявляя антиоксидантные и антиапоптотические свойства, регулирует уровень про- и противовоспалительных цитокинов в условиях введения ЛПС [Xu D.X. et al., 2007]. Так, в частности, он уменьшает продукцию ФНО- α , ИЛ-12, интерферона, но в то же время повышает ИЛ-10, а также снижает уровень

нитрат/нитритов [Carrillo-Vico A. et al., 2005], образование пероксинитрита [Blanchard B. et al., 2000].

Мелатонин в условиях введения ЛПС ингибирует экспрессию иNOC и необходимую для этого процесса транскрипцию NF-kB, что в результате приводит к снижению продукции NO и уменьшению вазодилатации сосудов [Tamura E.K. et al., 2009]. Отмечается, что фосфорилирование NF-kB, вызванное образованием свободных радикалов при развитии окислительного стресса, способствует индукции экспрессии Bcl-2 и белков Вах, что связано с активацией апоптоза, тогда как мелатонин, снижая окислительные повреждения и активность NF-kB, иNOC, уменьшает индукцию Вах, но не Bcl-2 [Chetsawang B. et al., 2006], а также повышает уровень Bcl-XL [Lee Y.D. et al., 2009].

Следует отметить, что мелатонин предотвращает повреждения тканей (легких, печени, почек, кишечника), вызванные введением ЛПС, снижая уровни МПО и МДА, экспрессию иNOC, продукцию NO и цитокинов, развитие апоптоза, а также повышая активность GSH-пероксидазы и GSH-редуктазы [Mei Q. et al., 2005; Wang H. et al., 2007]. Установлено, что его применение через NO-зависимый механизм улучшает микроциркуляцию слизистой оболочки желудка и предупреждает развитие различных гастропатий, индуцированных данным токсином [Liaw S.J. et al., 2002].

В условиях моделирования сахарного диабета введение ЛПС увеличивает продукцию цитокинов (ФНО- α , ИЛ-6) и повышает уровень таких гормонов в плазме, как адренокортикотропный гормон, кортикотропин, тогда как введение мелатонина предупреждает эти изменения, уменьшает окислительные повреждения и нормализует уровень глюкозы в крови [Zhong L.Y. et al., 2009]. Выявлено, что мелатонин оказывает защитное действие при повреждении митохондриальной дыхательной цепи в условиях действия ЛПС, ингибируя активность митохондриальной NO-синтазы и развитие окислительного стресса [Escames G. et al., 2006].

Использование данного средства ежедневно в течение 7 суток вызывает уменьшение количества нейтрофилов, предотвращает нарушение эритропоэза в костном мозге у крыс

после введения ацетата свинца [Othman A.I. et al., 2004]. Мелатонин оказывает влияние на основные механизмы транспорта кислорода кровью. Так, длительное его использование способствует повышению содержания эритроцитов и росту количества гемоглобина, особенно на фоне пониженных значений этих показателей [Арушанян Э.Б. и др., 2006]. Однако есть данные, что в условиях тяжелой физической нагрузки мелатонин может снижать прирост содержания эритроцитов и гемоглобина [Johe P.D. et al., 2005]. Данная субстанция предотвращает усиление процессов ПОЛ (повышение МДА) и увеличение уровня NO на фоне ухудшения деформируемости эритроцитов, что улучшает микроциркуляцию эритроцитов после введения ЛПС внутривенно в дозе 10 мг/кг [Yeger M.V. et al., 2004]. Введение мелатонина в условиях гипотермии (снижение температуры до 19 °С) и последующего отогревания (в течение 120 минут) улучшает показатели КТФ крови, приводя к смещению КДО вправо и оптимизации процессов оксигенации тканей, снижает активность процессов ПОЛ (уровень ДК, ОШ) и повышает факторы АОС (α -токоферол, каталаза) [Зинчук В.В., Глуткин С.В. 2008; Hlutkin S.V., Zinchuk V.V., 2008].

Однако, как видим, использование мелатонина для уменьшения нарушений КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантного состояния, вызванных действием ЛПС (500 мкг/кг) на протяжении отдаленного периода времени (12 часов) не изучено, что предопределяет интерес к данной субстанции и её использование как средства коррекции возникающих окислительных нарушений.

4.2 Влияние мелатонина на кислородтранспортную функцию крови после инъекции липополисахарида

Введение ЛПС в больших дозах приводит к развитию окислительного стресса, к существенному снижению pO_2 в тканях и уменьшению насыщения гемоглобина кислородом в микроциркуляторном русле [Maier S. et al., 2009].

Мелатонин является производным серотонина, который синтезируется из аминокислоты триптофана в темновой период суток и выступает в качестве эффективной «ловушки» свободных

радикалов (гидроксил-радикала, перокси-радикала, супероксид-аниона, синглетного кислорода, NO и пероксинитрита), в силу чего проявляет прямые антирадикальные эффекты [Барабой В.А., 2000]. В то же время он может действовать и как вторичный антиоксидант, стимулируя активность антиоксидантных ферментов: GSH-пероксидазы, СОД, каталазы [Reiter et al., 2000]. Получены данные о том, что мелатонин влияет на систему крови [Hlutkin S, Zinchuk V., 2008]. Его регуляторное влияние на процесс образования и функцию основных элементов крови обеспечивает адаптивный характер их изменений при неблагоприятных воздействиях [Арушанян Э.Б., Бейер Э.В., 2006], однако влияние данной субстанции непосредственно на показатели транспорта кислорода кровью, свободнорадикальные процессы в условиях введения ЛПС мало изучено.

Мелатонин обладает выраженной способностью вмешиваться в функцию эритроцитов, которая носит защитный характер и базируется, по-видимому, как на системных, так и местных его эффектах [Арушанян Э.Б., Бейер Э.В., 2006]. В представленном разделе исследовано действие мелатонина на КТФ крови после инъекции ЛПС *E. coli*. Для изучения действия мелатонина, продукта метаболизма триптофана, используют разные дозы. В своих исследованиях К. Winiarska et al. [2006] вводили мелатонин (1 мг/кг) внутрибрюшинно в течение 3 недель для уменьшения проявлений окислительного стресса. В другой работе данное средство использовали в дозе 10 мг/кг подкожно в течение 15 суток, а также 3 месяцев для предотвращения окислительных повреждений головного мозга у кроликов [Abd-Elghaffar S.Kh. et al., 2005]. Kerman M. et al. [2005] изучали антиоксидантное действие мелатонина в дозе 2,5 мкг/кг, введенной 4 раза в сутки внутрибрюшинно, на модели травматического окислительного стресса, тогда как Aydin M.V. et al. [2005] вводили данное средство однократно в дозе 5 мг/кг внутрибрюшинно на модели субарахноидального кровоизлияния. Наиболее приемлемо в нашей работе, с точки зрения постановки эксперимента и выраженности предполагаемых эффектов, было использование способа введения мелатонина, применяемого Er H. et al. [2006]. Данный фактор (500 мкг/кг) вводили внутривенно кроликам, которые предварительно в течение трёх суток

получали внутривенные инъекции мелатонина (4 мг/кг/сут).

Показатели кислотно-основного состояния и КТФ крови у кроликов после введения мелатонина и ЛПС представлены в таблице 4.1 [Зинчук В.В. и др., 2008; Зинчук В.В., Шульга Е.В., 2010].

Таблица 4.1 – Изменение показателей кислородтранспортной функции крови у кроликов после введения мелатонина и липополисахарида

Показатель	Липополисахарид	Мелатонин + липополисахарид	Критерий Манна- Уитни
n	8	7	
pH, ед.	7,288±0,019	7,343±0,017 [#]	p=0,049
pCO ₂ , мм рт.ст.	28,2±1,30	31,2±1,66	p=0,132
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	13,64±0,59	16,64±1,05 [#]	p=0,032
TCO ₂ , ммоль/л	14,49±0,62	17,61±1,08 [#]	p=0,028
ABE, ммоль/л	-11,0±0,70	-8,40±0,80 [#]	p=0,049
SBE, ммоль/л	-13,18±0,79	-9,49±1,30 [#]	p=0,037
SBC, ммоль/л	15,70±0,59	18,31±0,92 [#]	p=0,049
CvO ₂ , мл O ₂ /л	6,64±0,65	9,37±0,66 [#]	p=0,021
SO ₂ , %	59,76±2,38	65,20 (64,90-73,40) [#]	p=0,049
MetHb, %	1,08±0,23	1,17±0,19	p=0,862
pO ₂ , мм рт. ст.	38,5±1,45	42,1±0,59 [#]	p=0,049
p50 _{реал} , мм рт. ст.	39,2±0,93	34,1±0,86 [#]	p=0,003
p50 _{станд} , мм рт. ст.	29,5±0,45	28,6 (28,3-29,0)	p=0,105

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни).

Инъекция ЛПС приводит к развитию метаболического ацидоза. У животных, которым вводили мелатонин перед инъекцией ЛПС, отмечается повышение рН на 0,77% ($p < 0,05$) по отношению к группе кроликов, получавших только ЛПС. После введения мелатонина и ЛПС наблюдается также увеличение значений SBC на 16,7% ($p < 0,05$), SBE на 28,0% ($p < 0,05$), ABE на 23,5% ($p < 0,05$), TCO₂ на 21,6% ($p < 0,05$) и HCO₃ на 22,0% ($p < 0,05$). После введения ЛПС наблюдается ухудшение КТФ крови, в то время как предварительное использование мелатонина приводит к увеличению C_vO₂ и pO₂ на 41,2% ($p < 0,05$) и 9,5% ($p < 0,05$), соответственно.

Применение мелатонина и ЛПС снижает значение p50 при реальных значениях рН, pCO₂ и температуры на 13,1% ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС, повышает СГК, что соответствует сдвигу КДО влево (рисунок 4.3).

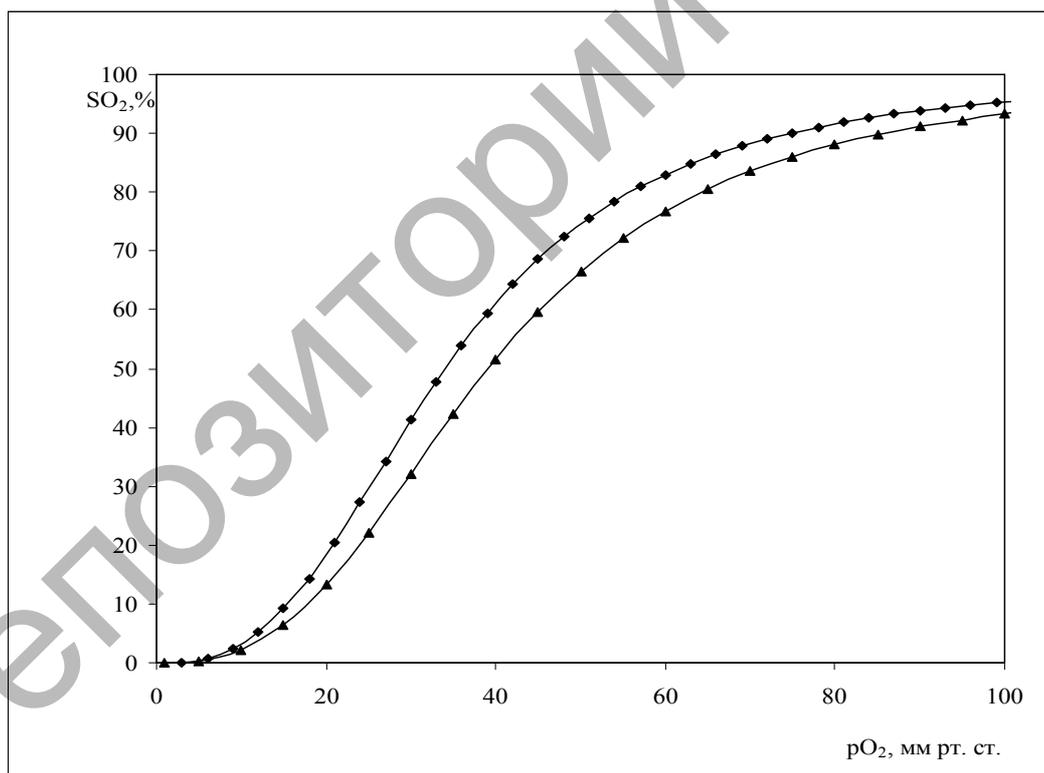


Рисунок 4.3 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях рН, pCO₂ и температуры у кроликов в условиях действия липополисахарида (▲) и мелатонина + липополисахарида (◆)

По изменению суммарного содержания нитрат/нитритов судят об уровне продукции NO в организме (рисунок 4.4). После введения мелатонина и ЛПС отмечается снижение данного показателя на 50,7% ($p < 0,05$) по отношению к группе кроликов, получавших только ЛПС.

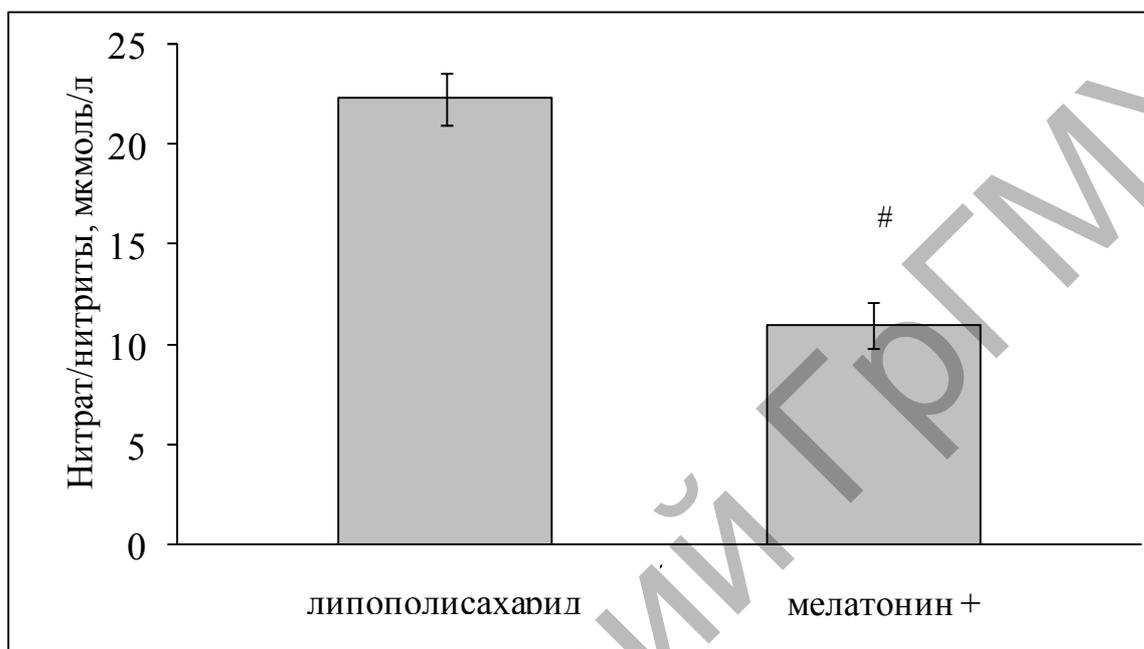


Рисунок 4.4 – Изменение суммарного содержания нитрат/нитритов в плазме крови кроликов после введения мелатонина и липополисахарида

Примечание – Изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только ЛПС ($p < 0,05$) – # (критерий Манна-Уитни).

В наших исследованиях после введения мелатонина прослеживается уменьшение содержания нитрат/нитритов, что, очевидно, связано с ингибированием продукции NO путем угнетения экспрессии iNOS и снижения активности NF- κ B, стимулированных ЛПС [Escames G. et al., 2006]. Мелатонин, нейтрализуя свободные радикалы и подавляя активность фермента iNOS, уменьшает количество пероксинитрита, который образуется при взаимодействии супероксид-аниона с NO [Reiter R.J., Tan D.X., 2003]. Эффект данного гормона реализуется через влияние на специфические рецепторы, идентифицированные на мембранах и в ядерном аппарате клеток красной крови [Арушанян Э.Б., Бейер Э.В., 2006].

Как показало проведенное исследование, мелатонин уменьшает развитие метаболического ацидоза, повышает СГК при реальных значениях рН, рСО₂ и температуры у кроликов через 12 часов после введения ЛПС.

4.3 Определение эффектов мелатонина на свободнорадикальные процессы и антиоксидантную систему после введения липополисахарида

Известно, что мелатонин выступает в качестве эффективной «ловушки» свободных радикалов, в силу чего превосходит по активности многие известные антиоксиданты – GSH, α-токоферол, аскорбиновую кислоту [Allegra M. et al., 2003], а также предупреждает чрезмерное ингибирование естественной АОС [Арушанян Э.Б., Бейер Э.В., 2006]. Рассматриваемая субстанция снижает повышенный уровень гомоцистеина в плазме крови крыс, которым был добавлен в пищевой рацион метионин [Murawska-Cialowicz E. et al., 2008].

В данном разделе исследовано действие мелатонина на активность свободнорадикальных процессов, факторы антиоксидантной защиты и уровень гомоцистеина после введения ЛПС [Зинчук В.В., Шульга Е.В., 2010]. Взятие образцов тканей у кроликов (аорта, сердце, легкие, печень и почки) осуществляли через 12 часов после инъекции ЛПС.

В таблице 4.2 представлены изменения содержания ДК и МДА после введения мелатонина и ЛПС. Отмечается снижение уровня первичных продуктов ПОЛ во всех тканях, в частности, в аорте на 32,4% (p<0,05), в легких на 16,4% (p<0,05) и в почках на 25,8% (p<0,05) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС. Также наблюдается уменьшение содержания МДА в аорте на 11,9% (p<0,05), в сердце на 6,7% (p<0,05) и в печени на 15,4% (p<0,05) по отношению к группе кроликов, которым вводили только ЛПС. Уменьшение активности свободнорадикальных процессов прослеживается и в крови (таблица 4.3). Так, уровень ДК снижается на 40,4% (p<0,05) в эритроцитах, а МДА – 46,4% (p<0,05) в плазме в сравнении с группой животных, получавших лишь ЛПС.

Таблица 4.2 – Характер изменений показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в тканях кроликов после введения мелатонина и липополисахарида

Показатель		Липополисахарид	Мелатонин+ липолисахарид	Критерий Манна- Уитни
n		8	7	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\Gamma$	Аорта	3,2±0,13	2,2±0,11 [#]	p=0,001
	Сердце	2,9±0,13	2,7 (2,0-2,8) [#]	p=0,043
	Легкие	2,8±0,17	2,3±0,11 [#]	p=0,043
	Печень	3,4 (3,1-4,4)	2,7±0,14 [#]	p=0,004
	Почки	3,8±0,19	2,8±0,09 [#]	p=0,004
Малоновый диальдегид, мкмоль/г	Аорта	4,0±0,11	3,5±0,09 [#]	p=0,015
	Сердце	2,6±0,11	2,2±0,13 [#]	p=0,043
	Легкие	4,2 (3,8-4,3)	2,2±0,18 [#]	p=0,001
	Печень	1,7±0,08	1,4±0,05 [#]	p=0,032
	Почки	4,2 (4,0-4,3)	2,3±0,09 [#]	p=0,001
α -токоферол, мкмоль/г ткани	Аорта	8,0±0,22	9,2±0,19 [#]	p=0,003
	Сердце	4,8±0,25	7,4±0,26 [#]	p=0,001
	Легкие	7,1±0,24	7,9±0,15 [#]	p=0,015
	Печень	5,6 (4,0-6,0)	6,6±0,20 [#]	p=0,001
	Почки	6,7±0,25	7,9±0,17 [#]	p=0,003
Каталаза, ммоль H_2O_2 /мин/г белка	Аорта	1,6±0,15	2,4±0,14 [#]	p=0,008
	Сердце	2,3±0,33	3,1±0,24 [#]	p=0,049
	Легкие	1,2±0,23	2,7±0,21 [#]	p=0,001
	Печень	1,9±0,25	2,8±0,11 [#]	p=0,049
	Почки	3,0±0,19	3,9±0,23 [#]	p=0,015

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни).

Таблица 4.3 – Изменение показателей прооксидантно-антиоксидантного равновесия и уровня гомоцистеина в плазме крови кроликов после введения мелатонина и липополисахарида

Показатель		Липополисахарид	Мелатонин+ липополисахарид	Критерий Манна- Уитни
n		8	7	
Диеновые конъюгаты, ΔD_{233} /мл	Плазма	0,68±0,07	0,44 (0,32-0,46) [#]	p=0,005
	Эритроциты	5,42± 0,16	4,85±0,18 [#]	p=0,049
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	Плазма	1,81±0,06	0,97±0,07 [#]	p=0,001
	Эритроциты	23,97 (22,69-24,23)	21,03±0,30 [#]	p=0,001
α -токоферол, мкмоль/л	Плазма	10,5±0,29	19,0±0,17 [#]	p=0,001
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ /мин/г Нб	Эритроциты	30,9±0,81	26,8±0,69 [#]	p=0,004
Гомоцистеин, мкмоль/л	Плазма	10,97±0,89	6,48±0,49 [#]	p=0,003

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни).

В данных условиях наблюдается увеличение уровня антиоксидантных факторов защиты в исследуемых тканях. В таблице 4.2 отражено повышение концентрации α -токоферола на 14,9% (p<0,05) в аорте, на 53,0% (p<0,05) в сердце, на 11,1% (p<0,05) в легких и на 18,2% (p<0,05) в почках по отношению к группе кроликов, которым вводили только ЛПС. Представлено также, что в условиях введения мелатонина и ЛПС повышается активность каталазы в аорте на 47,5% (p<0,05), в сердце на 34,8% (p<0,05), в легких на 119,0% (p<0,05), в печени на 42,9% (p<0,05) и в почках на 31,1% (p<0,05) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС. Отмечается, что после введения и мелатонина, и ЛПС концентрация α -токоферола увеличивается в плазме на 81,9% (p<0,05), в то время как активность каталазы в

эритроцитах снижается на 13,5% ($p < 0,05$) по отношению к группе, в которой использовали только ЛПС (таблица 4.3).

После введения мелатонина и ЛПС также отмечается снижение уровня гомоцистеина в плазме крови на 40,9% ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС (таблица 4.3).

По результатам проведенного исследования выявлено, что мелатонин снижает прирост свободнорадикальных процессов, нарушения антиоксидантной защиты, а также уменьшает уровень гомоцистеина в плазме крови кроликов через 12 часов после введения ЛПС. Мелатонин является нейтрализатором свободных радикалов, в частности, высокотоксичного гидроксил-радикала, а также и его предшественника H_2O_2 , которые оказывают повреждающее воздействие на различные ткани организма [Victor V.M. et al., 2005]. Он эффективнее (в 60 и 70 раз), чем витамины С и Е, соответственно, при защите ДНК от окислительных повреждений, индуцированных различными агентами, способными генерировать свободные радикалы, в частности, токсина из *Microcystis aeruginosa*, что, по-видимому, также связано с его способностью проникать через биомембрану [Аль-Джассаби С., Халил А.М., 2006]. Мелатонин, как мощный антиоксидант, может уменьшать концентрацию гомоцистеина в плазме крови и предупреждать развитие окислительного стресса у крыс, получавших в больших количествах незаменимую аминокислоту метионин [Bouzouf M. et al., 2005].

После введения мелатонина возрастает уровень антиоксидантных факторов защиты в печени при незначительном изменении активности ферментов крови у интактных животных и снижении активности свободнорадикального окисления в тканях и крови при токсическом её поражении [Попов С.С. и др., 2007]. Данный гормон значительно увеличивает уровень GSH и снижает уровень NO и МДА при окислительных повреждениях печени [Colak S. et al., 2007], а также уменьшает активность свободнорадикальных процессов и ингибирует экспрессию транскрипционного NF- κ B в ткани легкого [Zhang J.Y. et al., 2008]. ЛПС стимулирует активность цитокинов и индукцию iNOS, в результате чего продуцируется большое количество NO [McCann S.M. et al., 2005]. Эффект мелатонина и его

производных может быть связан не только с их прямым действием как «ловушки» радикалов, но и с уменьшением дисрегуляции прооксидантных и провоспалительных ферментов, включая иNOC, циклооксигеназу и др. [Tan D.X. et al., 2007], а также механизмов транспорта кислорода.

Выявленное в нашем исследовании влияние мелатонина на прооксидантно-антиоксидантное состояние организма (снижение прироста свободнорадикальных процессов и повышение антиоксидантной защиты) через 12 часов после введения ЛПС отражает антиоксидантное действие данной субстанции.

ГЛАВА 5 ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

5.1 Неэритропоэтические свойства эритропоэтина

Эритропоэтин (ЭПО) представляет собой гликопротеин, состоящий из 165 аминокислот и продуцируемый главным образом в почках взрослого организма и в гепатоцитах плода [Mosini D. et al., 2007]. Эта субстанция регулирует процесс эритропоэза, пролиферацию, дифференциацию и угнетение апоптоза в чувствительных к нему клетках кроветворной ткани [Захаров Ю.М., 2007].

Продукция этого гормона обратно пропорциональна pO_2 . Известно, что основным стимулом, активирующим его продукцию клетками почек, является снижение содержания кислорода в них, что способствует формированию в этих клетках гипоксией индуцируемого фактора (ГИФ), состоящего из β субединицы и одной из двух субединиц α (ГИФ-1 α и ГИФ-2 α), ответственного за активацию транскрипции эритропоэтиновой информационной РНК, синтеза фактора роста эндотелия сосудов, индуктора ангиогенеза, увеличивающего потребление кислорода тканями [Захаров Ю.М., 2005]. Установлено, что уровень ГИФ-1 регулируется удалением через убиквинизацию и протеосомальное разрушение субединицы ГИФ-1 α при нормоксических условиях, в то время как гипоксия предотвращает данные изменения, ингибируя убиквинизацию ГИФ-1 α [D'Angio C.T, Finkelstein J.N., 2000]. Известно, что гипоксическое состояние сопровождается генерацией АФК, индукцией ГИФ и повышением экспрессии NF-kB [Liu J. et al., 2005]. Увеличение внутриклеточной продукции АФК вызывает убиквинизацию и разрушение ГИФ-1 α , ингибирование синтеза ЭПО, а также индукцию экспрессии провоспалительных цитокинов через NF-kB-зависимые механизмы [D'Angio C.T, Finkelstein J.N., 2000]. ГИФ-1 α вовлечен также в регулирование окислительного стресса, а ГИФ-2 α – клеточного метаболизма, ангиогенеза и сосудистого тонуса, т.е. процессов, формирующих

системный ответ на гипоксию [Nangaku M. et al., 2008].

При физиологических уровнях данного гормона в крови он связывается с клетками, имеющими высокоаффинные рецепторы к нему, которые способны активировать транскрипцию гена глобина (α - и β -цепей), ускорить пролиферацию и дифференциацию эритропоэтинчувствительных клеток через транскрипционные ядерные факторы (NF-kB/Rel, NF-E1, NF-E2), из которых NF-kB относится к факторам, способным опосредовать ответ генома гемopoэтических клеток на действие таких цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α и др. [Захаров Ю.М., 2000].

Наличие гемopoэтических и эндотелиальных клеток, имеющих общие клетки-предшественницы в костном мозге, объясняет возможность ЭПО стимулировать неоангиогенез через повышение экспрессии фактора роста эндотелия сосудов [Westenbrink B.D. et al., 2007], что улучшает микроциркуляцию и оксигенацию тканей.

Обнаружены эффекты ЭПО не только на эритроидные клетки костного мозга, но и на гладкие мышцы стенок артериальных и венозных сосудов, эндотелиальные клетки, нервные клетки головного и спинного мозга, ганглиозные клетки сетчатки, кардиомиоциты, ткань яичников и матки, на эпителий легких, что объясняется наличием на мембранах их клеток рецепторов к нему и способностью их как к экспрессии ЭПО-х рецепторов, так и синтезу клетками некоторых из этих тканей ЭПО [Захаров Ю.М., 2007], а также проявлению, независимо от гематоэтического действия, незритроэтических функций ЭПО [Joyeux-Faure M., 2007].

Показан защитный эффект данного соединения при ишемических и гипоксических повреждениях тканей, реализуемый через различные механизмы при одно- и многократном его применении [Patel N.S. et al., 2004]. ЭПО снижает содержание цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-6), активность каспаз-1, -4, -6 и экспрессию p53, повышает ИЛ-10 при ишемических повреждениях головного мозга, вызванных окклюзией сонных артерий [Juul S.E. et al., 2008]. Выявлено, что использование ЭПО до или во время ишемии-реперфузии улучшает сердечную функцию, восстанавливает сократимость

желудочков, уменьшает миокардиальный апоптоз [Parsa C.J. at al., 2004], усиливает неоангиогенез в постинфарктном периоде [Westenbrink B.D. at al., 2007], а также предупреждает окислительные повреждения миокарда и снижает в нем уровень цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α) [Li Y. et al., 2006]. При ишемии-реперфузии печени однократная предварительная инъекция ЭПО уменьшает уровни внутрипеченочных ферментов и экспрессию NF-kB, предупреждая её повреждение [Schmeding M. et al., 2007]. Он действует как антиоксидант, защищая ткань почек от окислительных повреждений, снижая уровень МДА и повышая активность СОД [Cetin H. et al., 2007]. Данная субстанция также уменьшает апоптоз и уровень проапоптотического фактора Вах [Johnson D.W. et al., 2006], предотвращает *in vivo* активацию каспаз-3, -8 и -9 и повышает антиапоптотический белок Bcl-XL [Sharples E.J. et al., 2004].

Малые дозы ЭПО могут не оказывать защитного действия, в то время как большие могут быть токсическими для организма. Введение ЭПО в дозах (20–100 ЕД/кг/сут в течение 28 суток) внутривенно крысам не снижает циклоспориновую нефротоксичность, однако способствуют уменьшению окислительного стресса (снижению МДА, повышению СОД) [Kasar V. at al., 2008]. В то же время, достаточно высокие дозы ЭПО через 6 часов уменьшают повреждение тканей легкого, печени, поджелудочной железы и развитие почечной дисфункции, снижают повышенную активность МПО и системную токсичность, вызванные зимозаном (блокатором Toll-like рецепторов) [Cuzzocrea S. et al., 2006]. Совместное внутривенное введение ЭПО (4000 ЕД/кг) и препарата железа (100 мг) приводит к развитию окислительного стресса (повышению МДА в плазме крови, снижению GSH и активности каталазы), в то время как предварительное (за 1 час) использование мелатонина (*per os* 0,3 мг/кг) снижает его проявления у лиц с хронической почечной недостаточностью [Herrera J. at al., 2001].

Отмечается, что предварительное введение ЭПО уменьшает повышенную фрагментацию ДНК, вызванную продукцией свободных радикалов, предотвращает развитие окислительного стресса и апоптоз, повреждения печени и почек при

геморрагическом шоке [Abdelrahman M. et al., 2004].

Получены данные, которые свидетельствуют о влиянии ЭПО на эндотелиальные клетки и уровень образования в них NO. Применение данной субстанции снижает содержание цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α) в плазме, сохраняя целостность эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла при развитии окислительного стресса [Tascilar O. et al., 2007]. ЭПО восстанавливает эндотелий-зависимую вазодилатацию, повышая экспрессию eNOS и продукцию NO [d'Uscio L.V. et al., 2007]. Однократная инъекция ЭПО при ишемических и гипоксических повреждениях уменьшает проявления дисфункции эндотелия, ингибирует индукцию iNOS и снижает концентрацию нитрат/нитритов в плазме, не изменяя количество эритроцитов и гемоглобина, а также снижает активность iNOS в перитонеальных макрофагах, активизированных эндотоксином [Squadrito F. et al., 1999].

В ряде работ показано, что синтез данного гормона в почечной ткани зависит от прооксидантно-антиоксидантного равновесия [Suliman H.V. et al., 2004]. ЭПО, проявляя антиоксидантные свойства, повышает активность гемоксигеназы-1, уменьшая тем самым окислительные повреждения ткани печени при ишемии-реперфузии [Luo Y.H. et al., 2009]. В исследованиях *in vitro* в культуре эритроцитов демонстрируется протективная роль ЭПО в защите мембраны клеток от окислительного стресса, в снижении активности процессов ПОЛ и уменьшении мембранной микровязкости, повышении активности каталазы и GSH-пероксидазы в цитозоле [Chattopadhyay A. et al., 2000].

Показан эффект ЭПО на КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантное равновесие при гипотермии/отогревании. Так, внутрибрюшинное введение ЭПО (100 ЕД/кг) на протяжении 10 дней крысам, подвергшимся воздействию низкой температуры и последующему отогреванию, улучшает механизмы транспорта кислорода кровью как за счет увеличения количества гемоглобина, так и снижения СГК [Глуткин С.В., Зинчук В.В., 2009], а также данная субстанция уменьшает уровень ДК, ОШ, но в то же время увеличивает содержание α -токоферола и активность каталазы в тканях (сердце, легкие, печень и почки) в период отогревания [Глуткин С.В., 2008]. Установлено, что

длительное применение ЭПО у недоношенных младенцев вызывает повышение содержания 2,3-дифосфоглицерата и смещение КДО вправо [Soubasi V. et al., 2000].

Данная субстанция предотвращает нарушение гомеостаза организма при системном введении эндотоксина [Yazihan N. et al., 2008]. ЭПО в зависимости от дозы оказывает различные эффекты: при низких – не проявляет защитного действия против повреждений, вызванных введением ЛПС [Abdelrahman M. et al., 2004], а при достаточно высоких дозировках способствует дополнительному повышению ФНО- α и ИЛ-6 [Hojman P. et al., 2009]. Установлено, что введение ЭПО уменьшает инициированные ЛПС *E. coli* повышение продукции цитокинов, повреждение печени, характеризующееся нарушением микроциркуляции, активацией каспаз-3 и апоптозом на протяжении 6 часов [Le Minh K. et al., 2007], а также данная субстанция уменьшает апоптоз в тимусе и селезенке, снижая продукцию АФК, вызванную эндотоксином [Koroglu T.F. et al., 2006]. Выявлено, что ЭПО оказывает нейропротективный эффект, ингибируя экспрессию iNOS и продукцию NO в культуре олигодендроцитов, вызванных введением ЛПС [Genc K. et al., 2006], а в культуре эндотелиальных клеток данная субстанция уменьшает проявления окислительного стресса и активность процессов ПОЛ, снижая уровень МДА и повышая содержание GSH [Szczepański M. et al., 2006]. Существует NO-зависимая регуляция сигнальной трансдукции (активации) гипоксически индуцибельного фактора и последующего образования ЭПО (Рисунок 5.1). Использование ЭПО также ингибирует вызванные эндотоксином апоптоз и повреждение эндотелия в течение 8 часов [Nogueras S. et al., 2008]. Введение ЛПС беременным крысам инициирует увеличение экспрессии цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6) и апоптоз в эмбриональном мозге крысят, тогда как использование ЭПО уменьшает степень этих изменений [Kumral A. et al., 2007]. Установлено, что предварительная однократная инъекция данного средства через 4 часа также уменьшает повреждение ткани легкого, вызванное введением ЛПС, снижает активность МПО, уровень МДА и цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β), что связано с ингибированием экспрессии NF- κ B [Shang Y. et al., 2009].

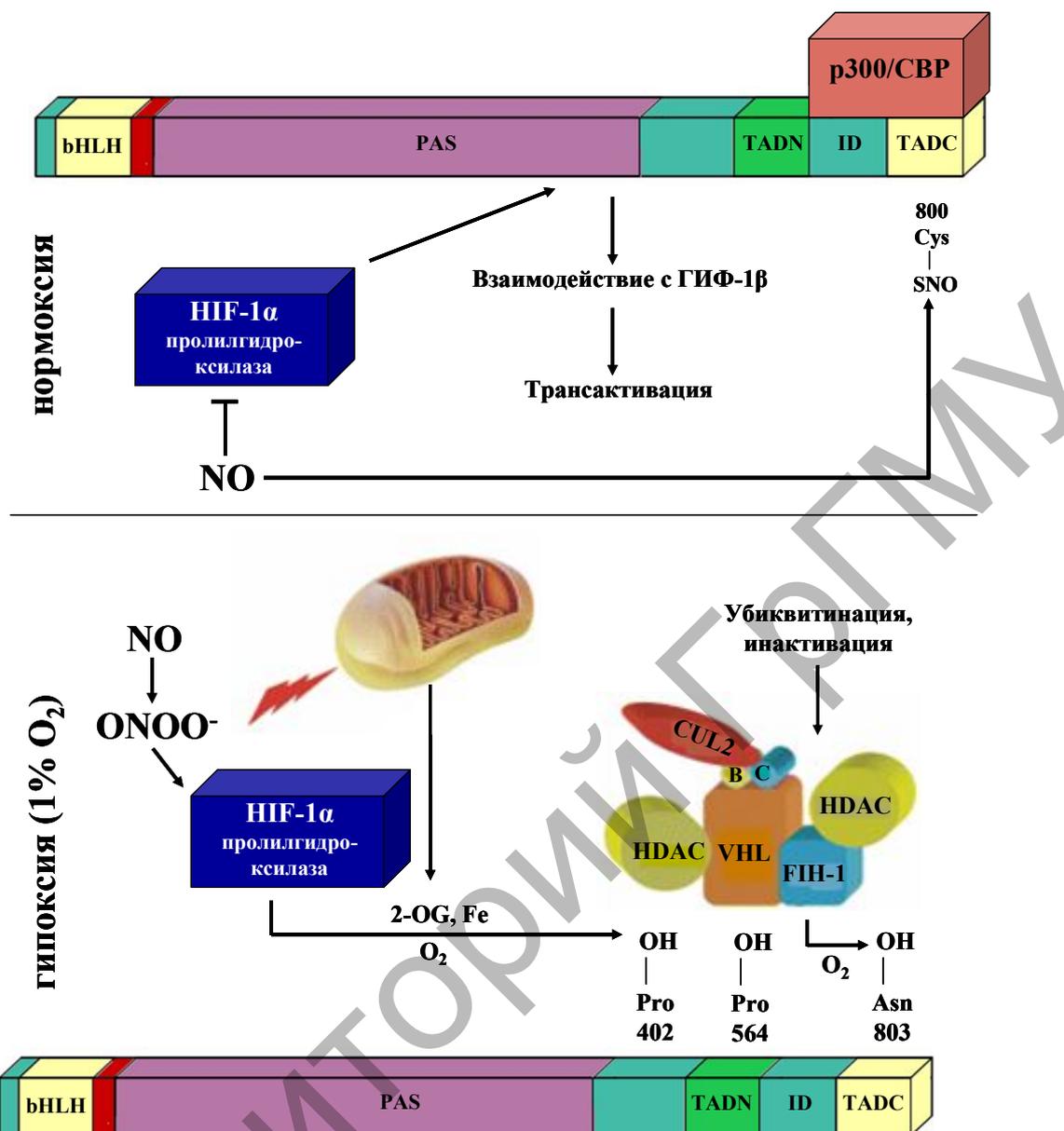


Рисунок 5.1 – NO-зависимая регуляция сигнальной трансдукции (активации) гипоксически индуцибельного фактора (HIF-1 α) [Sumbayev V.V. et. al., 2007]

Таким образом, ЭПО обладает широким спектром различных неэритропоэтических эффектов, непосредственно не связанных с увеличением количества эритроцитов в организме, которые способны оказывать защитное действие, особенно при окислительных, гипоксических нарушениях, однако влияние данной субстанции после однократного предварительного введения на КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс через 12 часов после введения ЛПС остаётся не изученным.

Известно влияние ЭПО на количество эритроцитов и гемоглобина при длительном введении. Однако в последнее время активно исследуются его неэритропоэтические эффекты, для изучения которых применяют различные дозировки и способы введения. Spreer A. et al. [2007] использовали ЭПО внутривенно в дозе 1000 ЕД/кг через 12 часов после развития экспериментального менингита и введения ЛПС *E. coli*. Инъекцию данного средства в дозе 1000 ЕД/кг осуществляли за 15 минут до окклюзии коронарных артерий [Rafiee P et al., 2005]. ЭПО в различных дозировках (от 350 до 1000 ЕД/кг) вводили внутривенно немедленно после начала реперфузии на модели ишемического повреждения спинного мозга как в острый период (1 час), так и в более поздний (48 часов) [Celik M. et al., 2002]. Grasso G. et al. [2002] использовали данную субстанцию в дозе 1000 ЕД/кг внутривенно через 5 минут после моделирования субарахноидального кровоизлияния. Учитывая вышеизложенное, можно заключить, что более приемлемо для проведения экспериментальной части нашей работы и получения неэритропоэтических эффектов было выполнять однократную инъекцию ЭПО внутривенно в дозе 1000 ЕД/кг за 30 минут до введения ЛПС. В исследовании использовали препарат рекомбинантного человеческого эритропоэтина- α «Эпофит» фирмы “Intas Pharmaceuticals LTD” (2000 ЕД/мл).

5.2 Механизмы транспорта кислорода кровью после использования эритропоэтина и липополисахарида

ЛПС увеличивает продукцию цитокинов, повышает уровень свободных радикалов, вызывает метаболические нарушения, повреждение клеток сосудистого эндотелия, снижает pO_2 в артериальной крови [Maier S. et al., 2009].

ЭПО представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 30400 Да, содержащий в своем составе 40% углеводов и 14 остатков сиаловых кислот [Fisher J.W., 2003], обладающий выраженными гемопоэтическими эффектами. Данная субстанция уменьшает окислительные повреждения при ишемии-реперфузии: ингибирует активность NF- κ B, снижает ФНО- α , ИЛ-6, а также уменьшает проницаемость микрососудов и улучшает

процессы оксигенации в легких [Wu H. et al., 2006]. В последние годы обсуждается вопрос о его неэритропоэтических функциях [Захаров Ю.М., 2007]. В данном разделе проанализирован эффект ЭПО на показатели транспорта кислорода кровью после инъекции ЛПС [Зинчук В.В. и др., 2010]. За 30 минут до введения ЛПС (500 мкг/кг) кроликам-самцам осуществляли однократную инъекцию ЭПО (1000 ЕД/кг), а через 12 часов после этого проводили забор крови для оценки КТФ.

Использование ЭПО улучшает показатели кислотно-основного состояния, что представлено в таблице 5.1. Отмечается повышение рН на 1,14% ($p < 0,05$), а также увеличение значений HCO_3^- на 19,8% ($p < 0,05$), TCO_2 на 18,8% ($p < 0,05$), АВЕ на 32,2% ($p < 0,05$), SBE на 29,2% ($p < 0,05$), SBC на 18,7% ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС. Инъекция ЭПО перед введением ЛПС увеличивает значения CvO_2 на 30,6% ($p < 0,05$), SO_2 на 21,6% ($p < 0,05$) и pO_2 на 22,4% ($p < 0,05$), однако показатель Hb достоверно не изменяется.

После введения данного средства параметр $\text{p50}_{\text{реал}}$ снижается на 7,2% ($p < 0,05$), что отражает повышение СГК и, соответственно, отклонение КДО при реальных значениях рН, pCO_2 и температуры влево (рисунок 5.2), в то время как показатель p50 при стандартных значениях рН, pCO_2 и температуры повышается на 5,6% ($p < 0,05$) в сравнении с группой кроликов, получавших только ЛПС.

Использование ЭПО и ЛПС приводит к снижению содержания нитрат/нитритов в плазме крови на 37,6% ($p < 0,05$) (таблица 5.1). Известно, что увеличение концентрации ЭПО в плазме крови повышает устойчивость ткани к гипоксии и поддерживает тонус сосудов, что оптимизирует работу механизмов транспорта кислорода, направленную на улучшение оксигенации тканей еще до увеличения кислородной емкости крови, вызванной активацией эритропоэза [Захаров Ю.М., 2007]. Очевидно, существует некий дополнительный механизм, обеспечивающий улучшение функционирования транспорта кислорода кровью, учитывая небольшой срок от введения данного вещества (12 часов), связанный с функционированием

Таблица 5.1 – Показатели кислородтранспортной функции крови и уровень нитрат/нитритов у кроликов после введения эритропоэтина и липополисахарида

Показатель	Липополисахарид	Эритропоэтин+ липополисахарид	Критерий Манна-Уитни
n	8	9	
pH, ед.	7,288±0,019	7,371±0,015 [#]	p=0,009
pCO ₂ , мм рт.ст.	28,2±1,30	30,2±0,55	p=0,102
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	13,64±0,59	16,34±0,84 [#]	p=0,027
TCO ₂ , ммоль/л	14,49±0,62	17,21±0,86 [#]	p=0,034
ABE, ммоль/л	-11,0±0,70	-7,43±1,04 [#]	p=0,016
SBE, ммоль/л	-13,18±0,79	-9,32±1,10 [#]	p=0,012
SBC, ммоль/л	15,70±0,59	18,63±0,78 [#]	p=0,009
CvO ₂ , мл O ₂ /л	6,64±0,65	8,67±0,42 [#]	p=0,027
SO ₂ , %	59,76±2,38	72,68±1,97 [#]	p=0,004
MetHb, %	1,08±0,23	1,20 (1,10-1,40)	p=0,773
pO ₂ , мм рт. ст.	38,5±1,45	47,1±1,01 [#]	p<0,001
p50 _{реал} , мм рт. ст.	39,2±0,93	36,4±0,64 [#]	p=0,024
p50 _{станд} , мм рт. ст.	29,5±0,45	31,1±0,25 [#]	p=0,005
Нитрат/нитриты, мкмоль/л	22,28±1,32	13,90±0,59 [#]	p<0,001

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни).

L-аргинин-NO системы, исходя из динамики изменения уровня нитрат/нитритов в плазме крови.

Таким образом, введение ЭПО перед ЛПС улучшает показатели КТФ крови, уменьшая проявление гипоксии и способствуя оптимизации кислородного обеспечения тканей.

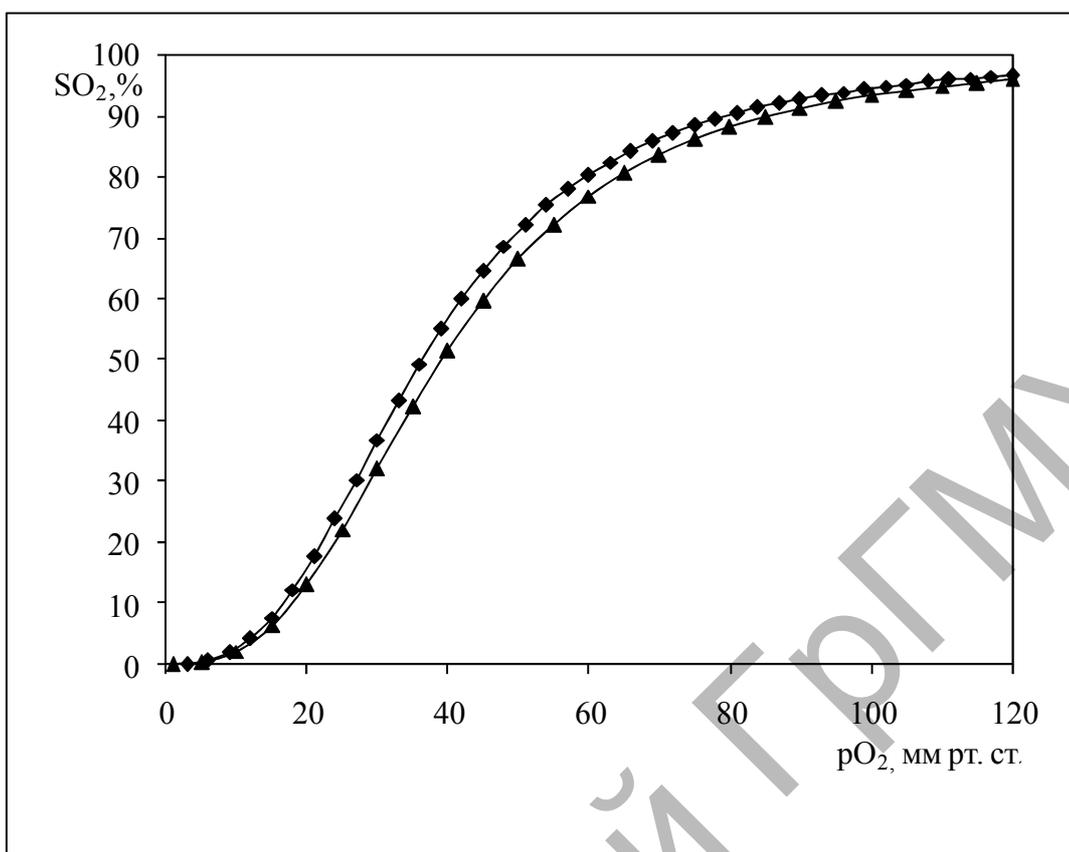


Рисунок 5.2 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, pCO₂ и температуры у кроликов в условиях действия липополисахарида (▲) и эритропоэтина + липополисахарида (◆)

5.3 Эффект эритропоэтина на содержание продуктов перекисного окисления липидов и факторов антиоксидантной системы в условиях введения липополисахарида

После системного использования ЛПС введение ЭПО уменьшает его прямые цитостатические эффекты, проявляет антиоксидантное действие, повышая активность СОД в тканях [Mitra A. et al., 2007]. В этом разделе представлены результаты влияния ЭПО на содержание продуктов ПОЛ, факторы АОС в тканях (легкие, сердце, печень, почки и аорта) и крови, а также на уровень гомоцистеина в плазме кроликов через 12 часов после введения ЭПО и ЛПС [Зинчук В.В. и др., 2010].

Введение ЛПС повышает активность свободнорадикальных процессов. В таблице 5.2 показано, что использование ЭПО приводит к уменьшению содержания продуктов ПОЛ в

исследуемых тканях. В частности, отмечается снижение уровня ДК на 16,6% ($p < 0,05$) в аорте, на 15,1% ($p < 0,05$) в сердце, на 20,4% ($p < 0,05$) в легких, а также МДА на 17,7% ($p < 0,05$) в сердце по отношению к группе животных, получавших лишь ЛПС. Введение ЭПО снижает также активность свободнорадикальных процессов в крови, что представлено в таблице 5.3. Так, уровень ДК уменьшается в плазме на 41,3% ($p < 0,05$) и эритроцитах на 9,1% ($p < 0,05$), а МДА – в плазме на 26,1% ($p < 0,05$) в сравнении с группой кроликов, которым вводили только ЛПС.

Одновременно наблюдается повышение уровня факторов антиоксидантной защиты в аорте, сердце, легких, печени и почках. Так, в таблице 5.2 представлено, что после введения ЭПО и ЛПС концентрация α -токоферола увеличивается в аорте на 14,5% ($p < 0,05$), в сердце на 54,4% ($p < 0,05$), в легких на 12,0% ($p < 0,05$) и в почках на 15,2% ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС. Активность каталазы после введения ЭПО и ЛПС повышается во всех тканях (рисунок 5.3). Отмечается повышение значений данного показателя в аорте с $1,6 \pm 0,15$ до $2,7 \pm 0,11$ ммоль H_2O_2 /мин/г белка ($p < 0,05$), в сердце с $2,3 \pm 0,33$ до $3,1 \pm 0,13$ ммоль H_2O_2 /мин/г белка ($p < 0,05$), в легких с $1,2 \pm 0,23$ до $2,7 \pm 0,15$ ммоль H_2O_2 /мин/г белка ($p < 0,05$), в печени с $1,9 \pm 0,25$ до $2,7 \pm 0,13$ ммоль H_2O_2 /мин/г белка ($p < 0,05$) и в почках с $3,0 \pm 0,19$ до $3,8 \pm 0,18$ ммоль H_2O_2 /мин/г белка ($p < 0,05$) в сравнении с группой кроликов, которым вводили только ЛПС. Наблюдается также увеличение содержания α -токоферола в плазме на 86,5% ($p < 0,05$), тогда как в эритроцитах – уменьшение активности каталазы (таблица 5.3).

После введения ЭПО и ЛПС выявлено снижение уровня гомоцистеина в плазме крови с $10,97 \pm 0,89$ до $6,59 \pm 0,64$ мкмоль/л ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших лишь ЛПС.

Результаты нашей работы показывают, что ЭПО снижает уровень гомоцистеина, подавляет избыточную активность свободнорадикальных процессов и повышает степень антиоксидантной защиты. Известно, что увеличение уровня гомоцистеина вызывает повышение продукции АФК, уровня нитрат/нитритов и в целом развитие окислительного стресса [Fischer P.A. et al., 2003]. Предполагается, что ЭПО может непосред-

Таблица 5.2 – Показатели перекисного окисления липидов и уровень α -токоферола в тканях кроликов после введения эритропоэтина и липополисахарида

Показатель		Липополисахарид	Эритропоэтин + липополисахарид	Критерий Манна- Уитни
n		8	9	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\Gamma$	Аорта	3,2 \pm 0,13	2,7 \pm 0,15 [#]	p=0,018
	Сердце	2,9 \pm 0,13	2,5 \pm 0,08 [#]	p=0,014
	Легкие	2,8 \pm 0,17	2,2 \pm 0,20 [#]	p=0,043
	Печень	3,4 (3,1-4,4)	2,6 \pm 0,16 [#]	p=0,001
	Почки	3,8 \pm 0,19	3,2 (2,6-3,3) [#]	p=0,007
Малоновый диальдегид, мкмоль/г	Аорта	4,0 \pm 0,11	2,5 (2,5-2,6) [#]	p<0,001
	Сердце	2,6 \pm 0,11	2,1 \pm 0,09 [#]	p=0,009
	Легкие	4,2 (3,8-4,3)	2,6 \pm 0,07 [#]	p<0,001
	Печень	1,7 \pm 0,08	1,5 (1,2-1,5) [#]	p=0,034
	Почки	4,2 (4,0-4,3)	3,1 \pm 0,16 [#]	p<0,001
α -токоферол, мкмоль/г ткани	Аорта	8,0 \pm 0,22	9,2 \pm 0,11 [#]	p<0,001
	Сердце	4,8 \pm 0,25	7,5 \pm 0,20 [#]	p<0,001
	Легкие	7,1 \pm 0,24	7,9 \pm 0,20 [#]	p=0,034
	Печень	5,6 (4,0-6,0)	8,4 (7,4-8,8) [#]	p<0,001
	Почки	6,7 \pm 0,25	7,7 \pm 0,28 [#]	p=0,021

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – # (критерий Манна-Уитни).

редственно взаимодействовать со свободными радикалами, нейтрализовать их действие, выступая в качестве «ловушки» [Guneli E. at al., 2007], а также он может активировать внутриклеточные антиоксидантные механизмы, такие как гемоксигеназа-1, GSH-пероксидазы [Саенко Ю.В. и др., 2005].

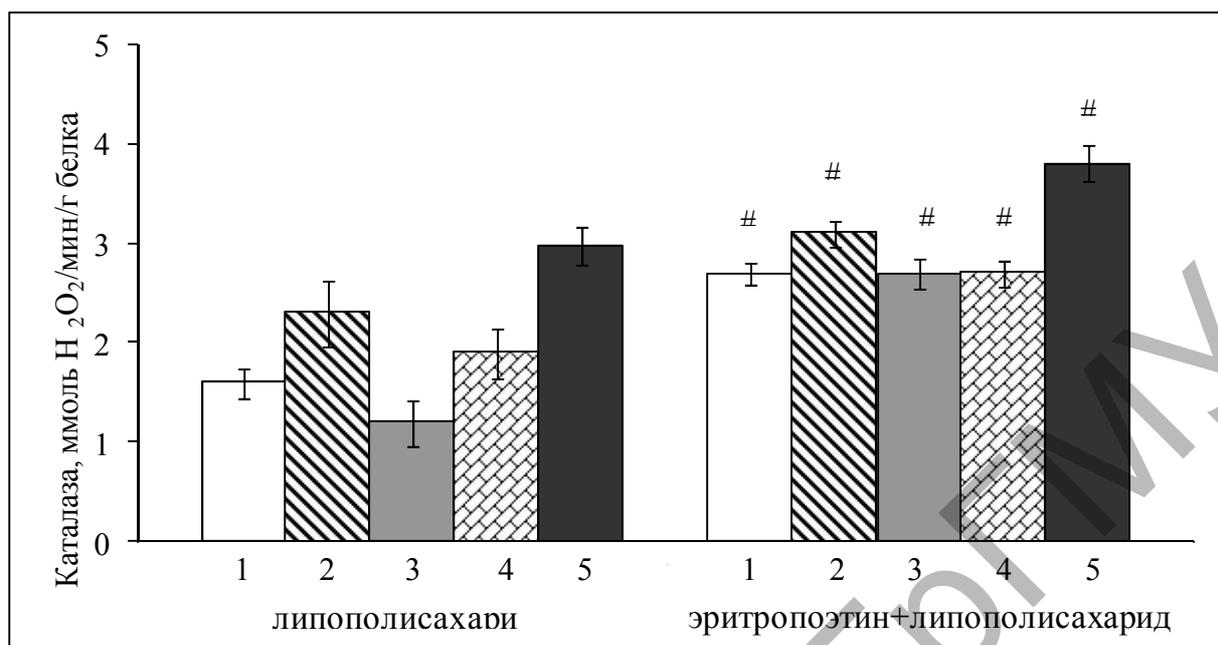


Рисунок 5.3 – Изменение активности каталазы в тканях кроликов после введения эритропоэтина и липополисахарида
 1 – аорта, 2 – сердце, 3 – легкие, 4 – печень, 5 – почки

Примечание – Изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид ($p < 0,05$) – # (критерий Манна-Уитни).

Данный фактор уменьшает проявления окислительного стресса в результате поддержания уровня восстановленного GSH и индукции активности ферментов НАД(Ф)Н (хининоксиредуктазы 1 и GSH-редуктазы) [Katavetin P. et al., 2007], а также повышения содержания α -токоферола и снижения МДА [Mydlík M. et al., 2004]. ЭПО, оказывая защитное действие при ишемии-реперфузии, уменьшает окислительный стресс и апоптоз клеток, снижает уровень МДА и активность МПО, повышает активность каталазы [Guneli E. et al., 2007]. Данный эффект этой субстанции реализуется за счет гликополипептидов, входящих в состав молекулы ЭПО, которые являются активными «скавенджерами» гидроксильных радикалов, а также усиления экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-2, что указывает на его способность проявлять прямое антиоксидантное действие [Digicaylioglu M., Lipton S.A., 2001].

Таблица 5.3 – Изменение показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в крови кроликов после введения эритропоэтина и липополисахарида

Показатель		Липополисахарид	Эритропоэтин + липополисахарид	Критерий Манна-Уитни
n		8	9	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\text{мл}$	Плазма	0,68±0,07	0,40±0,05 [#]	p=0,014
	Эритроциты	5,42± 0,16	4,92±0,13 [#]	p=0,038
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	Плазма	1,81±0,06	1,34±0,04 [#]	p<0,001
	Эритроциты	23,97 (22,69-24,23)	21,28±0,15 [#]	p<0,001
α -токоферол, мкмоль/л	Плазма	10,5±0,29	19,5±0,24 [#]	p<0,001
Каталаза, ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{г Нв}$	Эритроциты	30,9±0,81	25,5 (25,0-26,2) [#]	p=0,002

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни).

ЛПС индуцирует экспрессию иNOC, повышая продукцию NO, который при взаимодействии с супероксид-анионом образует мощный окислитель пероксинитрит [Wideman R.F. et al., 2004]. Известно, что ЭПО проявляет противовоспалительное, антиапоптозное действие, оказывает цитопротекторный эффект, уменьшая проявления окислительного стресса, вызванного введением ЛПС [di Villa Bianca R.D. et al., 2009]. Очевидно, в наших исследованиях, судя по выявленному снижению содержания нитрат/нитритов, ЭПО подавляет избыточную продукцию NO, ингибируя экспрессию иNOC. В то же время он может повышать экспрессию эNOC и генерацию NO [Santhanam A.V. et al., 2006]. Коррекция L-аргинин-NO системы уменьшает избыточную продукцию NO, что подавляет формирование пероксинитрита и его негативное действие, а также может изменять SGK при действии ЛПС через влияние на различные

механизмы транспорта кислорода, регуляцию сосудистого тонуса, влияя на процессы газообмена.

Данное средство способствует также увеличению концентрации α -токоферола в плазме крови и исследуемых тканях (наиболее выражено в печени), тогда как активность каталазы повышается в данных тканях (наиболее значительно в легких) и снижается в эритроцитах. Выявленное уменьшение окислительных повреждений, индуцированных ЛПС, может быть обусловлено ингибированием активности NF- κ B, снижением провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-6) и увеличением продукции ИЛ-10 [Liu X. et al., 2006], а также уменьшением апоптоза в легких, печени, тонком кишечнике, тимусе и селезенке, ингибированием активности каспаз-3, генерации NO, образования пероксинитрита и гипоксии ткани [Aoshiba K. et al., 2009]. Кроме того, повышение СГК, вызванное применением ЭПО, за счет перестройки внутриэритроцитарной системы регуляции кислородсвязывающих свойств крови может быть дополнительным механизмом формирования прооксидантно-антиоксидантного равновесия. Таким образом, однократное использование ЭПО в дозе 1000 ЕД/кг перед введением ЛПС улучшает показатели транспорта кислорода кровью, повышает СГК при реальных значениях рН, рСО₂ и температуры, а также уменьшает активность свободнорадикальных процессов, уровень гомоцистеина в плазме.

ГЛАВА 6 ЭФФЕКТ 1-МЕТИЛНИКОТИНАМИДА НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

6.1 Основные эффекты 1-метилникотинамида

1-Метилникотинамид (МНА) является одним из главных метаболитов никотинамида, синтезируемого главным образом в печени под действием фермента никотинамид-N-метилтрансферазы (рисунок 6.1). Данное соединение длительное время не рассматривалось как физиологически активное, но в последние годы интерес к нему существенно вырос. Инициированием этого послужила работа Gebicki J. et al. [2003], в которой были показаны противовоспалительные свойства МНА при лечении дерматозов и ожогов кожи, реализуемые через его взаимодействия с гликозаминогликанами на поверхности эндотелия кровеносных сосудов, уменьшающие адгезию провоспалительных клеток и препятствующие проникновению их в ткани.

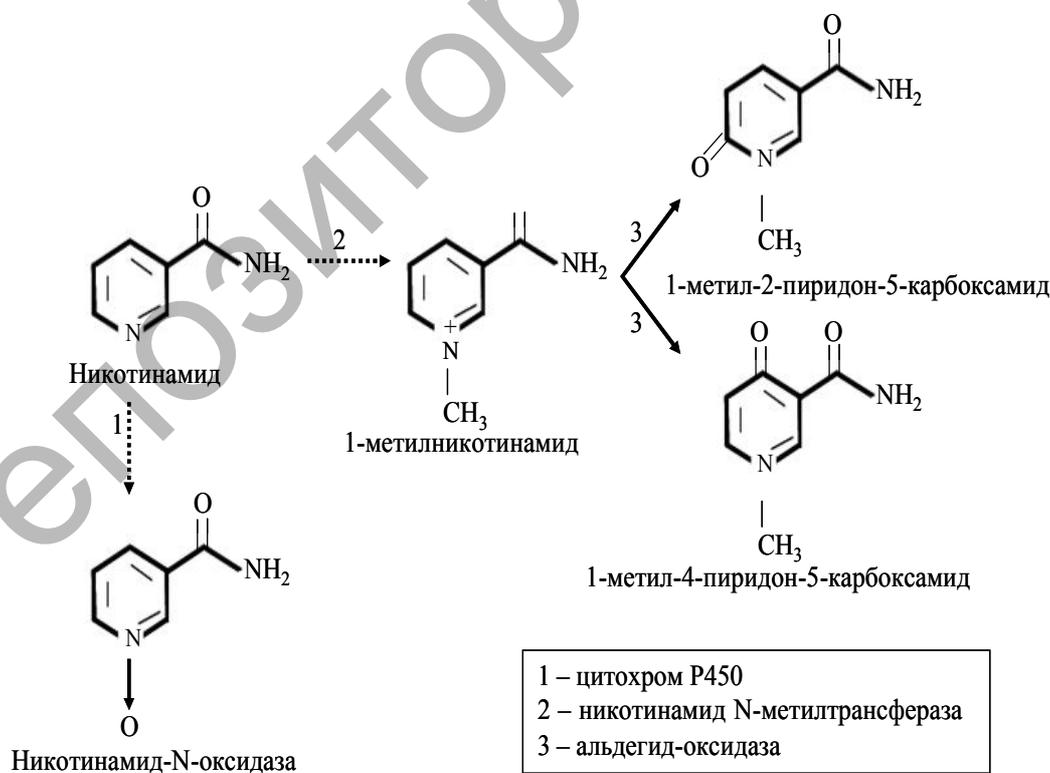


Рисунок 6.1 – Основной путь метаболизма 1-МНА [Chlopicki S. et al., 2007]

МНА является аналогом предшественника нуклеотидных кофакторов ряда оксидоредуктаз, способным замещать молекулы никотинамида в реакциях формирования НАД⁺ и НАДФ *in vivo*, что ведет к избирательному подавлению окислительного фосфорилирования в митохондриях [Кузнецов Д.А. и др., 2006]. Модификация молекулы МНА путем замены одного из атомов водорода гидроксиметильной группой приводит к образованию соединения, обладающего также антибактериальными свойствами [Adamiec M. et al., 2006]. В исследованиях *in vitro* показано, что МНА стимулирует рост клеток и уменьшает спонтанную дифференцировку в эритролейкемической культуре, а также уменьшает уровень гемоглобина [Kuukendall J.R. et al., 2007].

Wozniacka A. et al. [2005] изучали его эффект, ведущий к уменьшению адгезии провоспалительных клеток на поверхности эндотелия, в лечении хронических дерматозов. Описано также противовоспалительное действие МНА при контактном дерматите, связанное с эндотелий/простациклин I₂-зависимым механизмом [Bryniarski K. et al., 2008]. Кроме того, в исследованиях *in vivo* показано, что данное соединение проявляет антитромбическую активность через циклооксигеназу-2/простациклин I₂-зависимый механизм в артериальных сосудах, тогда как в экспериментах *in vitro* данное соединение не оказывает влияния на агрегацию тромбоцитов и вазодилатацию сосудов [Chloricki S. et al., 2007].

Применение никотиновой кислоты в дозе 2 г *per os* у здоровых добровольцев мужского пола вызывает через 4 суток образование в моче МНА и N-метил-2-пиридон-5-карбоксамид с периодом полураспада 12,8 и 12,6 часов, соответственно [Menon R.M. et al., 2007]. Отмечается повышение содержания МНА и его метаболитов в моче испытуемых, которые были подвергнуты холодовому воздействию (нахождение в комнате при температуре 2–6 °С) [Okamoto H. et al., 2003]. Увеличение уровня МНА, частично связанное с уменьшением преобразования данной молекулы в его метаболиты, обеспечивает защиту от токсического действия никотинамида, который накапливается в печени при развитии цирроза [Pumro R. et al., 2001]. Применение диеты, богатой оротовой кислотой, вызывает замедление роста

крыс, увеличение размеров печени, уменьшение в ней концентрации НАД⁺ и НАДФ одновременно со снижением МНА и его метаболитов [Fukuwatari T. et al., 2002]. Известно, что избыток или недостаток никотинамида у крыс сопровождается нарушением прооксидантно-антиоксидантного баланса, проявляющимся повышением содержания МДА или увеличением антиоксидантов, таких как α -токоферол и GSH, при этом повышение уровня МНА в моче отмечается в группе с избытком никотинамида [Melo S.S. et al., 2000]. В то же время при дефиците никотиновой кислоты (пеллагре) уровни МНА и его метаболитов по отношению к креатинину снижаются, а в период лечения – повышаются [Creeke P.I. et al., 2007].

Выявлено, что МНА вызывает дозозависимое уменьшение тромбоза в артериальных сосудах, ингибирование агрегации тромбоцитов и увеличение фибринолиза одновременно с повышением в плазме уровня метаболита простаглицина – 6-кето-ПГ F_{1 α} [Mogielnicki A. et al., 2008]. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* показано, что МНА в дозе 2 г/кг уменьшает содержание НАД⁺ в мышечной ткани и печени, а также соотношение НАД⁺/НАДФ в эритроцитах, увеличивает уровень H₂O₂, продукцию АФК и развитие окислительного стресса [Zhou S.S. et al., 2009].

Использование никотинамида вызывает снижение повышенного уровня гомоцистеина, предотвращает ухудшение эндотелий-зависимой вазодилатации в аорте, генерацию пероксинитрита и развитие окислительного стресса [Mujumdar V.S. et al., 2001]. Никотинамид снижает также перистальтику подвздошной кишки и ингибирует вызванное фенилэфрином сужение сосудов, в то время как при использовании МНА таких эффектов не наблюдается [Ruddock M.W., Hirst D.G., 2007]. В то же время показано, что МНА оказывает мощный гастропротективный эффект при стрессовом воздействии, уменьшая окислительные повреждения и улучшая микроциркуляцию ткани [Brzozowski T. et al., 2008], проявляет и нейропротективное действие при гипергомоцистеинемии [Slomka M. et al., 2008], ишемических и гипоксических повреждениях головного мозга, регулируя активность матриксных металлопротеаз [Dragun P. et al., 2008]. Показана связь между

активностью никотинамид-N-метилтрансферазы в жировой ткани и повышением уровня гомоцистеина, который снижается после использования МНА [Riederer M. et al., 2009].

МНА улучшает микроциркуляцию через NO-зависимый механизм [Pietrzak L. et al., 2009]. Уровень никотинамид-N-метилтрансферазы и эндогенная концентрация МНА увеличиваются по мере ухудшения эндотелиальной функции, сопровождающейся повышением активности GSH-пероксидазы [Mateuszuk L. et al., 2009], что оказывает защитное действие на сосуды, обеспечивая регуляторную роль в уменьшении тромбообразования и воспалительного процесса в сердечно-сосудистой системе [Chlopicki S. et al., 2007]. Использование МНА в течение 4 недель приводит к увеличению его уровней и метаболитов, снижению продукции АФК и восстановлению функции эндотелия, характеризующейся улучшением NO-зависимой вазодилатации [Bartuś M. et al., 2008]. Применение данного соединения на протяжении 8 недель также уменьшает развитие окислительного стресса и предотвращает ухудшение NO-зависимой вазодилатации сосудов при сахарном диабете [Watała C. et al., 2009].

В исследованиях *in vitro* на культуре перитонеальных макрофагов показано, что никотинамид ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-6), NO, простагландин E₂, и снижает генерацию АФК, индуцированных ЛПС, в то время как МНА уменьшает активность только свободнорадикальных процессов, а его влияние на синтез других медиаторов незначительно [Biedroń R. et al., 2008]. Однако следует отметить, что действие данного соединения реализуется через его непрямые антиоксидантные механизмы [Sikora A. et al., 2008].

Возможно влияние МНА на показатели КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние, в частности, при ишемии-реперфузии печени. Так, в крови крыс, получавших МНА, наблюдается улучшение кислородсвязывающих свойств крови, повышение СГК в реперфузионном периоде, а также снижение активности свободнорадикальных процессов и повышение АОС [Ходосовский М.Н., Зинчук В.В., 2008; Ходосовский М.Н., Зинчук В.В., 2009]. Однако эффект коррекции

МНА на проявления окислительных повреждений, вызванных введением ЛПС, а также характер изменений механизмов транспорта кислорода при этом не исследованы.

Таким образом, проведенный анализ литературы свидетельствует о развитии ряда изменений со стороны различных функциональных систем организма и составляющих их компонентов, и, в частности, обеспечивающих транспорт кислорода и его полноценное использование в тканевом дыхании, индуцированных введением ЛПС. Однако известные регуляторные механизмы и способы коррекции не могут в достаточной степени уменьшить возникающие повреждения, что определяет необходимость поиска новых альтернативных средств и, в частности, предопределяет интерес к NO, мелатонину, ЭПО и МНА.

6.2 Изучение влияния 1-метилникотинамида на кислородтранспортную функцию крови после инъекции липополисахарида

Как известно, ЛПС является индуктором окислительного стресса [Schulz E. et al., 2008]. Он вызывает развитие микроциркуляторной гипоксии, вазодилатацию, нарушение клеточного метаболизма в тканях кроликов, увеличение уровня нитрат/нитритов в плазме крови, активацию NF- κ B, повышение экспрессии iNOS [Zhen J. et al., 2008].

МНА – первый метаболит никотинамида, который образуется в печени, а затем метаболизируется в N1-метил-2-пиридон-5-карбоксамид и N1-метил-4-пиридон-3-карбоксамид. Он обладает широким спектром физиологических эффектов. Его применение уменьшает проявления окислительного стресса, снижая активность свободнорадикальных процессов, полностью предотвращает ухудшение эндотелий NO-зависимой вазодилатации в аорте [Watała C. et al., 2009]. Длительное использование МНА в дозе 100 мг/кг предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции у крыс при сахарном диабете [Bartuś M. et al., 2008]. Однако многие аспекты действия данной субстанции не исследованы. МНА, первый метаболит никотинамида (витамина B₃), образуется под действием никотинамид-N-метилтрансферазы. Соль 1-метилникотинамида

хлорида получена алкилированием никотинамида с метил хлоридом в растворе метанола, как было описано ранее Chłopicki S. et al. [2007]. В наших исследованиях использовался МНА, который синтезирован проф. Дж. Генбицким из Института прикладной радиационной химии при Техническом университете г. Лодзи (Польша). МНА, используемый в экспериментах, имел высокую степень очистки (>99.8%), никотинамид был идентифицирован как главная примесь (<0.2 %). Изучение эффектов данной субстанции проводили на крысах путем внутривенного введения в дозах от 3 до 30 мг/кг за 5 минут до инициирования тромбоза в артериальных сосудах, а также МНА (3–300 мг/кг) применяли внутривенно за 30 минут до начала эксперимента при изучении его тромболитических свойств [Chłopicki S. et al., 2007]. За 10 минут до ишемии-реперфузии печени у крыс выполняли внутрибрюшинную инъекцию данного средства в дозе 100 мг/кг [Ходосовский М.Н., Зинчук В.В., 2009]. Учитывая технику проведения эксперимента, выраженность предполагаемых эффектов, наиболее приемлемо в нашей работе было осуществлять внутривенную инъекцию МНА в дозе 50 мг/кг, растворенную в изотоническом растворе NaCl, за 5 минут до введения ЛПС.

В разделе представлены результаты влияния МНА на КТФ крови после введения ЛПС [Шульга Е.В., Зинчук В.В., 2009]. Предварительно, за 5 минут до инъекции ЛПС (500 мкг/кг), кроликам-самцам осуществляли внутривенное введение МНА в дозе 50 мкг/кг, а через 12 часов из правого предсердия проводили забор смешанной венозной крови для оценки КТФ.

В таблице 6.1 показано, что использование МНА уменьшает нарушения кислотно-основного состояния, вызванные введением ЛПС. При этом наблюдается повышение рН на 0,76% ($p < 0,05$), $p\text{CO}_2$ на 14,4% ($p < 0,05$), HCO_3 на 29,7% ($p < 0,05$), TCO_2 на 29,1% ($p < 0,05$), АВЕ на 39,2% ($p < 0,05$), SBE на 35,8%

Таблица 6.1 – Изменение показателей кислородтранспортной функции крови у кроликов после введения 1-метилникотинамида и липополисахарида ($p < 0,05$), SBC на 21,3% ($p < 0,05$).

Показатель	Липополисахарид	1-Метилникотинамид +липополисахарид	Критерий Манна- Уитни
n	8	8	
pH, ед.	7,288±0,019	7,343±0,016 [#]	p=0,046
pCO ₂ , мм рт.ст.	28,2±1,30	32,2±0,83 [#]	p=0,031
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	13,64±0,59	17,69±1,22 [#]	p=0,018
TCO ₂ , ммоль/л	14,49±0,62	18,70±1,25 [#]	p=0,018
ABE, ммоль/л	-11,0±0,70	-6,68±0,71 [#]	p=0,003
SBE, ммоль/л	-13,18±0,79	-8,46±1,59 [#]	p=0,036
SBC, ммоль/л	15,70±0,59	19,04±0,83 [#]	p=0,014
CvO ₂ , мл O ₂ /л	6,64±0,65	9,40 (8,30-10,05) [#]	p=0,021
SO ₂ , %	59,76±2,38	68,43±2,76 [#]	p=0,036
MetHb, %	1,08±0,23	1,29±0,08	p=0,753
pO ₂ , мм рт. ст.	38,5±1,45	43,9±1,04 [#]	p=0,016
p50 _{реал.} , мм рт. ст.	39,2±0,93	36,1±0,53 [#]	p=0,021
p50 _{станд.} , мм рт. ст.	29,5±0,45	30,5±0,49	p=0,141

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид ($p < 0,05$) – [#] (критерий Манна-Уитни).

Применение МНА перед инъекцией ЛПС улучшает показатели КТФ крови в сравнении с группой животных,

которым вводили только ЛПС. Так, МНА способствует увеличению SO_2 на 14,5% ($p < 0,05$), pO_2 на 14,0% ($p < 0,05$).

Введение МНА перед инъекцией ЛПС приводит к снижению $p50_{\text{реал}}$ на 7,9% ($p < 0,05$) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС, повышению СГК и, соответственно, отклонению КДО при реальных значениях pH , pCO_2 и температуры влево (рисунок 6.2). Величина $p50$ при стандартных значениях pH , pCO_2 и температуры достоверно не изменяется. Использование МНА перед ЛПС снижает уровень нитрат/нитритов на 45,4% ($p < 0,05$) в сравнении с группой кроликов, получавших лишь ЛПС (рисунок 6.3). Результаты исследования показывают, что МНА после введения ЛПС улучшает показатели кислотно-основного состояния, повышает СГК и в целом КТФ крови.

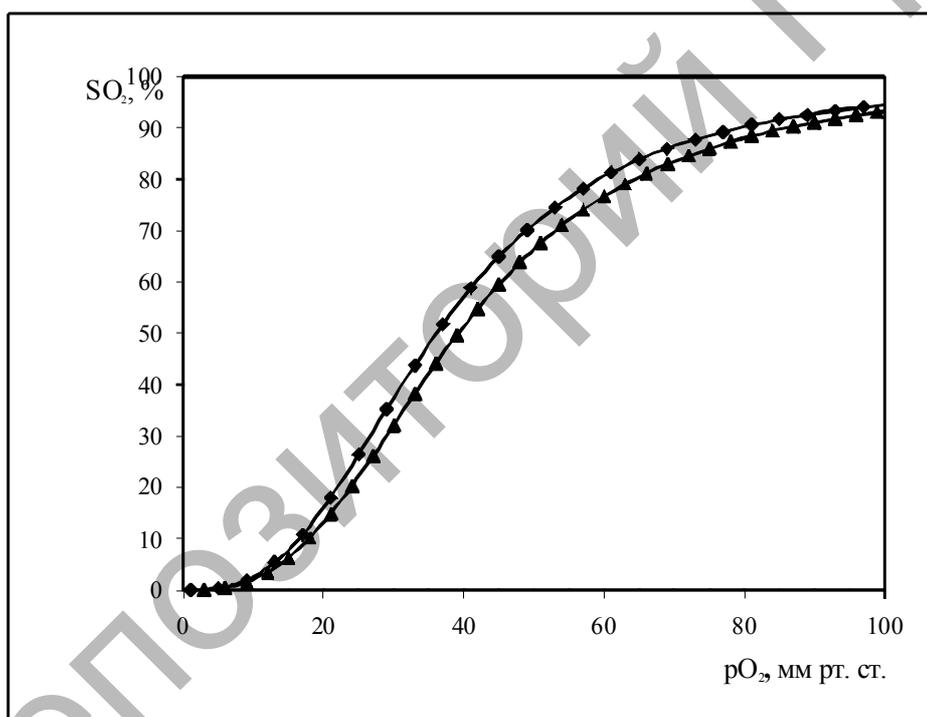


Рисунок 6.2 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH , pCO_2 и температуры у кроликов в условиях действия липополисахарида (▲) и 1-метилникотинамида + липополисахарида (♦)

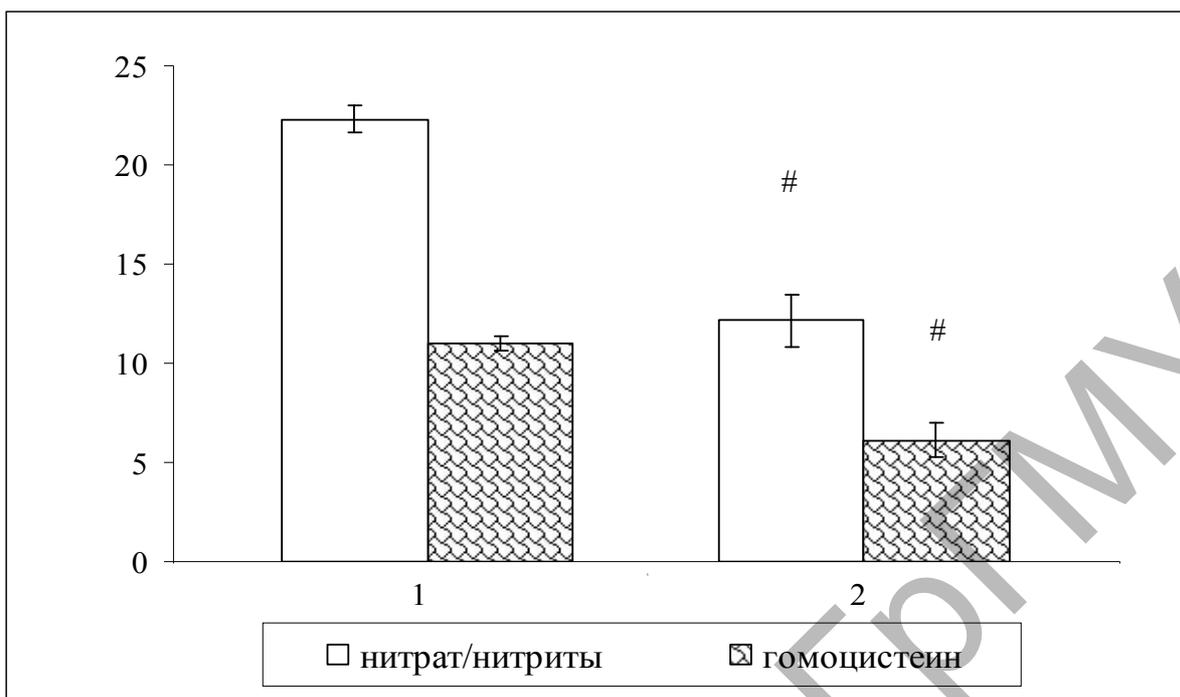


Рисунок 6.3 – Эффект 1-метилникотинамида на концентрацию нитрат/нитритов и гомоцистеина в плазме крови кроликов при введении липополисахарида

По оси ординат – концентрации нитрат/нитритов и гомоцистеина, мкмоль/л; по оси абсцисс – экспериментальные группы:

1 – липополисахарид, 2 – 1-метилникотинамид + липополисахарид.

Примечание – Изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид ($p < 0,05$) – # (критерий Манна-Уитни).

6.3 Оценка действия 1-метилникотинамида на активность процессов перекисного окисления липидов и показатели антиоксидантного состояния после введения липополисахарида

Известно, что ЛПС вызывает увеличение уровня МДА, уменьшение содержания витаминов А и Е и активности СОД, GSH-пероксидазы [Caylak E. et al., 2008], в то время как МНА может снижать образование свободных радикалов в экспериментах *in vitro* при активации перитонеальных макрофагов ЛПС [Biedroń R. et al., 2008]. В данном разделе проведена оценка действия МНА на активность процессов ПОЛ, показатели антиоксидантного состояния в тканях (аорта, сердце,

легкие, печень и почки) и крови, а также на уровень гомоцистеина в плазме кроликов через 12 часов после введения ЛПС [Шульга Е.В., Зинчук В.В., 2009].

При активации свободнорадикальных процессов, вызванной ЛПС, наблюдается повышение уровня продуктов ПОЛ и уменьшение антиоксидантных факторов защиты. В таблице 6.2 показано, что после введения МНА содержание ДК и концентрация МДА уменьшается в аорте, сердце, легких, печени и почках. При этом уровень первичных продуктов ПОЛ снижается в легких на 18,1% ($p < 0,05$) и в почках на 18,8% ($p < 0,05$), а содержание МДА – в сердце на 35,9% ($p < 0,05$) и в печени на 16,2% ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС. В крови также отмечается уменьшение активности процессов ПОЛ после применения МНА и ЛПС (таблица 6.3) по отношению к группе кроликов, которым вводили лишь ЛПС. При этом концентрация ДК снижается на 33,2% ($p < 0,05$) в плазме и на 8,9% ($p < 0,05$) в эритроцитах.

В таблице 6.2 показано повышение уровня факторов антиоксидантной защиты во всех тканях после введения МНА перед инъекцией ЛПС, что проявляется в увеличении концентрации α -токоферола в аорте на 23,1% ($p < 0,05$) и в сердце на 57,2% ($p < 0,05$), а также в повышении активности каталазы на 45,6% ($p < 0,05$) в сердце, на 104,5% ($p < 0,05$) в легких, на 49,9% ($p < 0,05$) в печени и на 43,1% ($p < 0,05$) в почках по отношению к группе животных, получавших только ЛПС. Отмечается увеличение содержания α -токоферола в плазме на 20,9% ($p < 0,05$) и снижение активности каталазы в эритроцитах на 22,9% ($p < 0,05$) по отношению к группе кроликов, которым вводили только ЛПС (таблица 6.3). При исследовании концентрации гомоцистеина в плазме крови установлено, что предварительное введение МНА снижает его уровень на 44,3% ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС (рисунок 6.3).

Таблица 6.2 – Характер изменений показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях кроликов после введения 1-метилникотинамида и липополисахарида

Показатель		Липополисахарид	1-Метилникотинамид +липополисахарид	Критерий Манна- Уитни
n		8	8	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\Gamma$	Аорта	3,2±0,13	2,3 (2,2-2,3) [#]	p<0,001
	Сердце	2,9±0,13	2,2 (2,2-2,8) [#]	p=0,021
	Легкие	2,8±0,17	2,3±0,09 [#]	p=0,031
	Печень	3,4 (3,1-4,4)	2,8±0,05 [#]	p=0,001
	Почки	3,8±0,19	3,0±0,12 [#]	p=0,012
Малоновый диальдегид, мкмоль/г	Аорта	4,0±0,11	2,6 (2,2-2,9) [#]	p<0,001
	Сердце	2,6±0,11	2,2±0,07 [#]	p=0,021
	Легкие	4,2 (3,8-4,3)	2,9±0,20 [#]	p<0,001
	Печень	1,7±0,08	1,4±0,08 [#]	p=0,041
	Почки	4,2 (4,0-4,3)	2,4±0,12 [#]	p<0,001
α -токоферол, мкмоль/г ткани	Аорта	8,0±0,22	9,9±0,12 [#]	p=0,001
	Сердце	4,8±0,25	7,6±0,23 [#]	p=0,001
	Легкие	7,1±0,24	8,0 (7,8-8,2) [#]	p=0,011
	Печень	5,6 (4,0-6,0)	8,0±0,18 [#]	p=0,001
	Почки	6,7±0,25	7,9 (7,6-8,0) [#]	p=0,015
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ /мин/г белка	Аорта	1,6±0,15	3,1 (2,8-3,6) [#]	p<0,001
	Сердце	2,3±0,33	3,4±0,11 [#]	p=0,012
	Легкие	1,2±0,23	2,5±0,17 [#]	p=0,002
	Печень	1,9±0,25	2,9±0,19 [#]	p=0,036
	Почки	3,0±0,19	4,3±0,15 [#]	p<0,001

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни)

Таблица 6.3 – Изменение показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в крови кроликов после введения 1-метилникотинамида и липополисахарида

Показатель		Липополисахарид	1-Метилникотинамид +липополисахарид	Критерий Манна- Уитни
n		8	8	
Диеновые конъюгаты, $\Delta D_{233}/\text{мл}$	Плазма	0,68±0,07	0,45±0,02 [#]	p<0,001
	Эритро- циты	5,42± 0,16	4,94±0,18 [#]	p=0,021
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	Плазма	1,81±0,06	0,80 (0,77-1,12) [#]	p<0,001
	Эритро- циты	23,97 (22,69-24,23)	16,60±0,26 [#]	p<0,001
α -токоферол, мкмоль/л	Плазма	10,5±0,29	12,6±0,19 [#]	p=0,001
Каталаза, ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{г Нб}$	Эритро- циты	30,9±0,81	23,9±0,47 [#]	p<0,001

Примечание – Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$ при нормальном и Me (25–75%) при непараметрическом распределении; изменения статистически значимы по отношению к группе животных, получавших только липополисахарид (p<0,05) – [#] (критерий Манна-Уитни).

Полученные данные демонстрируют, что МНА через 12 часов после введения ЛПС уменьшает активность свободнорадикальных процессов, повышает уровень факторов антиоксидантной защиты, а также снижает концентрацию гомоцистеина в плазме крови. Увеличение уровня аминокислоты гомоцистеин, наблюдаемое в нашей работе после введения ЛПС, способствует повышению генерации свободных радикалов, вызывающих окисление белков и липидов мембран клеток [Ramakrishnan S. et al., 2006]. Известно, что внесенный в пищевой рацион беременных крыс метионин вызывает гипергомоцистеинемию и приводит к формированию окислительного стресса в мозге их потомства, характеризующегося уменьшением массы тела, дефицитом СОД, повышенной склонностью нейронов к гибели [Махро А.В. и др., 2008]. МНА улучшает микроциркуляцию, увеличивает

экспрессию циклооксигеназы-2, повышает уровень антиоксидантных факторов защиты (СОД) и снижает активность свободнорадикальных процессов при стрессе [Brzozowski T. et al., 2008], однако данная субстанция не является «ловушкой» свободных радикалов, её эффекты не связаны непосредственно с прямыми антиоксидантными свойствами [Gebicki J. et al., 2003]. Предполагается, что действие МНА реализуются через NO-зависимый механизм [Bartuś M. et al., 2008]. Так, данное соединение проявляет защитный эффект против нейротоксичности гомоцистеина, что связано с ингибированием экспрессии иNOC и провоспалительных цитокинов [Slomka M. et al., 2008].

Как правило, ЛПС индуцирует экспрессию иNOC, увеличивая продукцию NO [Guzik T.J. et al., 2003]. В нашей работе введение МНА приводит к снижению уровня нитрат/нитритов. Возможно, уменьшение продукции NO через ингибирование экспрессии иNOC оказывает модулирующее влияние на кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное равновесие.

МНА, введенный перед инъекцией ЛПС, уменьшает окислительные повреждения, что проявляется снижением уровня гомоцистеина, содержания ДК и МДА в тканях (аорте, сердце, легких, печени и почках) и крови, а также повышением уровня антиоксидантных факторов защиты (наиболее значительно в сердце концентрации α -токоферола и в легких активности каталазы). Однако эффекты данного фактора не связаны с его прямыми антиоксидантными свойствами [Gebicki J. et al., 2003]. Его влияние реализуется через эндотелий-зависимые механизмы (циклооксигеназу-2 и простагландин) [Chlopicki S. et al., 2007; Bryniarski K. et al., 2008], а также путем воздействия на продукцию NO [Bartuś M. et al., 2008], что может быть важным для кислородсвязывающих свойств крови, активности процессов ПОЛ, факторов антиоксидантной защиты.

Одни и те же молекулы участвуют как в повреждении клеток и тканей, так и в их защите от внешней агрессии, а также в процессах внутри- и межклеточной регуляции, в частности, NO, синтезирующийся эндотелиоцитами в наномолярных концентрациях, служит для физиологической регуляции тонуса

сосудов, в то время как синтез этой же молекулы в цитотоксических микромолярных концентрациях активированными макрофагами приводит к отмене данной регуляции и к патологическому неконтролируемому расширению сосудов в очаге воспаления [Зенков Н.К. и др., 2001]. Развитие окислительного стресса обусловлено нарушением сбалансированности антиоксидантной и прооксидантной систем, однако многие вопросы регуляторной функции АКФ, их взаимодействия с белками, липидами, углеводами и нуклеиновыми кислотами, а также их физиологическая роль остаются спорными [Рязанцева Н.В. и др., 2009]. Уменьшение дисбаланса L-аргинин-NO системы, вызванное введением ЛПС в дозе 500 мкг/кг, через 12 часов, с помощью используемых нами средств (АГ, мелатонина, ЭПО и МНА) оказывает влияние на СГК и оптимизирует процессы оксигенации в сосудах малого круга кровообращения и деоксигенации в капиллярах большого круга.

Таким образом, в ходе проведенного нами исследования выявлено после однократной инъекции ЛПС в дозе 500 мкг/кг развитие метаболического ацидоза, ухудшение показателей КТФ крови, а также увеличение уровня нитрат/нитритов и гомоцистеина, содержание ДК и МДА, снижение факторов АОС через 12 часов, а далее – восстановление исследуемых показателей до значений контрольной группы через пять суток.

Полученные нами результаты свидетельствуют об участии АГ, мелатонина, ЭПО и МНА в регуляции кислородсвязывающих свойств крови и прооксидантно-антиоксидантного баланса тканей через 12 часов после введения ЛПС (рисунок 6.4).

Способность гемоглобина, изменяя СГК, регулировать количество кислорода, поступающего в ткани, рассматривается как один из факторов, участвующий в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999]. Рост свободнорадикальных процессов и снижение АОС приводит к нарушению межклеточного взаимодействия, обменных процессов, изменению проницаемости клеточных мембран [Болдырев А.А., 2001]. В данных условиях эффективность использования кислорода тканями снижается, в то время как усиление оксигенации тканей

в результате снижения SGK и увеличение локального кровотока приводит к избытку кислорода в тканях, генерации АФК и активации свободнорадикальных процессов в клетке. Существует необходимость приведения в соответствие доставки кислорода с возможностями полноценной его утилизации тканями, что является важным звеном механизма регуляции прооксидантно-антиоксидантного состояния организма [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999]. Использование искусственного кровезаменителя, основанного на полимеризированном гемоглобине с более низким р50 (5–6 мм рт. ст.), способствует оптимизации поступления кислорода к тканям [Winslow R.M., 2005].

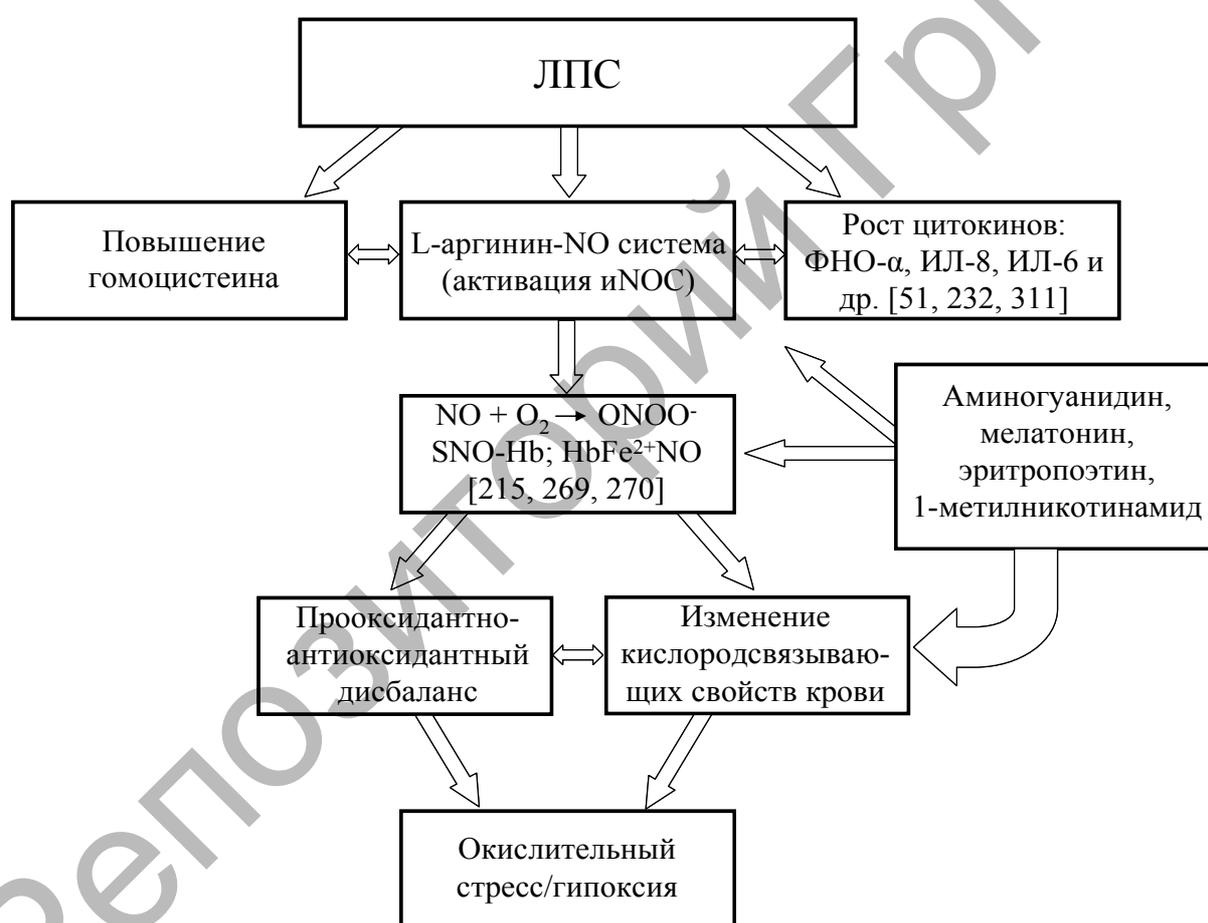


Рисунок 6.4 – Участие аминокуанидина, мелатонина, эритропоэтина, 1-метилникотинамида в регуляции кислородсвязывающих свойств крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса тканей в условиях действия липополисахарида

Повышение СГК может играть регуляторную роль, обеспечивая доставку O_2 и возможность его утилизации в соответствии с потребностями ткани в зоне ишемии, обуславливая снижение образования продуктов ПОЛ, что характерно для реперфузионного синдрома [Гацура С.В., Гацура В.В., 2005]. Гемоглобин, изменяя свое сродство к кислороду, может выполнять буферную функцию, корригируя поток кислорода в ткани в соответствии с их потребностью в нем, и тем самым, предупреждая избыточное его поступление и дальнейшее перераспределение с оксидазного пути на оксигеназный [Зинчук В.В., 2003]. СГК не только является важным механизмом формирования адекватного потока кислорода в ткани и обеспечения их потребности в нем, но и механизмом, определяющим эффективность функционирования антиоксидантной системы, и, в конечном итоге, всей организации поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999].

Приведение в соответствие доставки кислорода в клетки с потребностью в нем наблюдается в наших исследованиях при использовании АГ, мелатонина, ЭПО и МНА. Механизм протекции связан с регулированием свободнорадикальных процессов путем оптимизации потока кислорода к клеткам. Целенаправленное воздействие на КТФ крови АГ, мелатонина, ЭПО и МНА способствует повышению СГК, уменьшению дисбаланса прооксидантно-антиоксидантного состояния организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В организме ПОЛ имеет большое значение для обновления липидов мембран клеток и посредством этого поддержания структурного гомеостаза, исходя из чего разные по своим свойствам антиоксидантные факторы защиты необходимы для поддержания активности процессов ПОЛ на стационарном уровне в условиях значительных изменений образования радикалов, а недостаток поступления облигантных антиоксидантов приводит к развитию свободнорадикальных патологий [Зенков Н.К. и др., 2001]. Окислительный стресс является универсальным механизмом повреждения клетки при выраженных воздействиях разной природы и характеризуется ростом внутриклеточной генерации АФК как результат нарушения сбалансированности антиоксидантных и прооксидантных механизмов [Болдырев А.А., 2001]. ЛПС является субстанцией, диапазон вызываемых влияний которой характеризуется широтой разнообразных эффектов [Рябиченко Е.В. и др., 2005]. При его действии происходит уменьшение альвеолярно-артериального градиента оксигенации в легких [Sasaki S. et al., 2001], появление цитокинов в кровотоке (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8), а также повышение продукции свободных радикалов, увеличивая фрагментацию ДНК, активность каспаз-9 и каспаз-3, развитие апоптоза и митохондриальную транслокацию антиапоптозных белков Bcl-2 и Bcl-XL [Mishra D.P. et al., 2007]. Известно, что причиной развития окислительного стресса, индуцированного ЛПС, является усиление генерации АФК и нарушение баланса между свободнорадикальными процессами и факторами АОС [Kanter M. et al., 2005; Victor V.M. et al., 2005].

Установлено, что механизмы генерации АФК при многих патологических процессах приводят к окислительной модификации ряда регуляторных молекул и носят типовой характер, хотя причины, вызывающие активацию свободнорадикальных процессов, могут быть различными [Рязанцева Н.В. и др., 2009]. Отмечается большое разнообразие эффектов ЛПС на функциональное состояние организма [Зинчук В.В., 2005; Maier S. et al., 2009].

В нашем исследовании получены результаты, демонстрирующие эффект ЛПС на кислородсвязывающие свойства крови, процессы ПОЛ и АОС на протяжении первых пяти суток. Установлено, что через 12 часов после его введения наблюдаются наиболее существенные нарушения со стороны показателей кислотно-основного состояния и КТФ крови, обуславливающие ухудшение доставки кислорода к различным органам. Но уже через сутки отмечается тенденция улучшения данных показателей, а через 5 суток – восстановление до величин контрольной группы. Данные изменения важны для формирования адаптационных реакций организма на это воздействие с учетом того, что гемоглобин, изменяя свое сродство к кислороду, регулирует доставку O_2 к тканям в соответствии с их потребностями и его использованием для генерации АФК [В.В. Зинчук, 2005].

Известно, что инъекция ЛПС инициирует развитие окислительных повреждений на клеточном уровне, нарушение функционирования различных органов в результате повышения уровня МДА, концентрации перекиси водорода при снижении содержания GSH, соотношения восстановленного/окисленного GSH [Goraca A. et al., 2009], а также ведет к уменьшению активности ферментативного компонента АОС (СОД, каталаза) [Victor V.M. et al., 2005]. В наших опытах оценена активность процессов ПОЛ и антиоксидантной защиты в тканях и крови через 12 часов, одни и пять суток после введения ЛПС. Отмечается увеличение уровня ДК, ОШ и снижение концентрации α -токоферола в крови и тканях (аорта, сердце, легкие, печень и почки) через 12 часов после введения ЛПС, что отражает дисбаланс прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону повышения продукции свободных радикалов. Следует отметить, что в развитии выявленных окислительных нарушений, обусловленных действием ЛПС, участвуют механизмы транспорта кислорода. В частности, при уменьшении СГК наблюдается усиление оксигенации тканей, приводящее к избытку кислорода и генерации АФК в клетке, так как в результате активации стрессреализующих систем повышается доставка кислорода в ткани, намного превышающая их потребность в нем [Дремза И.К. и др., 2005].

Представляется возможным осуществлять коррекцию окислительных нарушений, индуцированных ЛПС, путём использования данных физиологических факторов. Установленные закономерности демонстрируют, что АГ, мелатонин, ЭПО, МНА оказывают регуляторное действие на КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс при действии ЛПС. Их применение способствует приведению в соответствие доставки кислорода с потребностями тканей в нем и поддержанию прооксидантно-антиоксидантного равновесия. Целенаправленное использование таких физиологических факторов, как АГ, мелатонин, ЭПО, МНА обуславливает уменьшение повреждающего действия ЛПС в организме через эффект на кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс.

В настоящее время считается доказанным, что в патогенезе эндотоксического шока лежит активация окислительных процессов, сопровождающаяся угнетением антиоксидантной защиты [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002; Annane D., Aegerter P., 2003]. Возникающие в процессе действия эндотоксина биохимические и структурные изменения клеток приводят к тяжёлым метаболическим нарушениям в организме: снижаются белково-синтетические процессы, изменяется активность ингибиторов протеиназ, нарушаются многие физиологические процессы, взаимосвязь важнейших биохимических реакций [Annane D., Bellissant E., 2005]. В организме накапливаются токсические продукты, что приводит к дальнейшему угнетению механизмов общей резистентности и углублению окислительного стресса. Действие эндотоксина приводит к значимым нарушениям в функционировании окислительной и антиокислительной систем организма: на фоне тканевой гипоксии резко активируются процессы пероксидации при одновременном подавлении активности АОС [Зинчук В.В., 2005]. Действие ЛПС ведёт к накоплению в организме свободных радикалов кислорода, перекисных соединений, к угнетению механизмов антиоксидантной защиты, повышает вероятность нарушения репаративных процессов, вызывает развитие функциональной полиорганной недостаточности [Cadenas S., Cadenas A.M., 2002].

Таким образом, из анализа результатов исследований, следует, что выявленные закономерности характера изменений кислородсвязывающих свойств крови, ПОЛ и АОС при действии ЛПС указывают на сложный механизм участия системы транспорта кислорода, L-аргинин-NO системы в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма. Оценка их роли не может быть строго однозначной, к этой проблеме следует подходить дифференцированно. Важным является приведение кислородсвязывающих свойств крови в соответствие с потребностями тканей в кислороде при окислительном стрессе, что составляет один из ведущих физиологических механизмов функционирования антиоксидантной защиты организма. Результаты выполненных исследований обосновывают регуляторную роль кислородсвязывающих свойств крови в механизмах поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, а также об участии L-аргинин-NO системы в регуляции КТФ крови, поддержании данного равновесия в организме. Целенаправленное воздействие на КТФ крови и активность L-аргинин-NO системы с помощью фармакологических средств может быть использовано в качестве эффективного пути коррекции процессов ПОЛ, состояния АОС.

Список использованных источников

1. Авдеева М.Г., Шубич М.Г. Патогенетические механизмы инициации синдрома системного воспалительного ответа (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – № 6. – С. 3-10.
2. Азизова О.А., Пирязев А.П., Никитина Н.А. Повреждение эритроцитов под действием окисленных липопротеинов низкой плотности // Патологическая физиология органов и систем. Типовые физиологические процессы: Тез. докл. II Рос. конгресса по патофизиологии. – М., 2000. – С. 180-181.
3. Аль-Джассаби С., Халил А.М. Индуцированное микроцистином образование 8-гидрокси-2'-деоксирибозина в ДНК и снижение уровня его содержания у мышей в присутствии мелатонина, витамина С и витамина Е // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 10. – С. 1377–1382.
4. Анисимов В.Н. Эпифиз, биоритмы и старение организма // Успехи физиологических наук. – 2008. – Т. 39, № 4. – С. 40–65.
5. Аниховская И.А. и др. Кишечный эндотоксин как универсальный фактор адаптации и патогенеза общего адаптационного синдрома // Физиология человека. – 2006. – Т. 32, № 2. – С. 87–91.
6. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В. Динамика оксигенации нативного и УФ-модифицированного гемоглобина человека в присутствии оксида азота // Физиология человека. – 2004. – Т. 30, № 2. – С. 110-116.
7. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. и др. Влияние мелатонина на некоторые гематологические показатели у здоровых людей // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69, № 5. – С. 36–38.
8. Барабой В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина // Украинский биохимический журнал. – 2000. – № 3. – С. 5–11.
9. Бардахчян Э.А., Харланова Н.Г., Ломов Ю.М. Особенности изменений сосудистого эндотелия – основной мишени действия липополисахарида при эндотоксиновом шоке // Цитологическая генетика. – 1997. – Т. 31, № 6. – С. 11–15.
10. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). - М.: Медицина, 1989. – 368 с.
11. Болдырев А.А. Парадоксы окислительного метаболизма мозга // Биохимия. - 1995. – Т. 60, № 9. – С. 1536-1542.
12. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 4. – С. 21–28.
13. Бонарцев А.П. и др. Влияние хронического введения амингуанидина на реактивность легочных сосудов у крыс с монокроталиновой моделью легочной гипертензии // Российский

- физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90, № 7. – С. 908–915.
14. Бондаренко Л.А., Бабенко Н.А. Влияние длительного круглосуточного освещения на спектр фосфолипидов в сыворотке крови кроликов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2006. – Т. 92, № 3. – С. 318–323.
 15. Борисюк М.В. Системный анализ механизмов регуляции сродства крови к кислороду. I. Внутриэритроцитарная регуляция сродства гемоглобина к кислороду // Усп. физиол. наук. – 1983. – Т. 14, №1. – С. 89–101.
 16. Борисюк М.В. Особенности регуляции кислородсвязующих свойств крови в процессе ее циркуляции // Усп. физиол. наук. – 1984. – Т. 15, № 2. – С. 3–26.
 17. Борисюк М.В. Система транспорта кислорода // Сборник науч. трудов под ред. М.В. Борисюка – Гродно, 1989. – С. 3–5.
 18. Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Каталаза и супероксиддисмутаза: распространение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 9. – С. 1170–1186.
 19. Будагова К.Р. и др. Флавоноид дигидрокверцетин в отличие от кверцетина не ингибирует экспрессию белка теплового шока в условиях клеточного стресса // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 9. – С. 1287–1294.
 20. Ванин А.Ф. Оксид азота: регуляция клеточного метаболизма без участия системы клеточных рецепторов // Биофизика. – 2001. – Т. 46, № 4. – С. 631–641.
 21. Васильева Е.М., Баканов М.И., Марков Х.М. Влияние системы L-аргинин-NO на активность АТФаз и ПОЛ эритроцитов // Бюллетень exper. биологии и медицины. – 1999. – Т.128, № 9. – С. 321–323.
 22. Викторов А.В., Юркив В.А. Связывание липополисахарида и комплексов липополисахарида с сывороточными липопротеинами низкой плотности с макрофагами печени // Биомедицинская химия. – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 36–43.
 23. Виноградов Н.А. Антимикробные свойства окиси азота и регуляция её биосинтеза в макроорганизме // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 2. – С. 24–29.
 24. Висмонт Ф.И. Эндотоксинемия в физиологии и патологии терморегуляции // Проблемы термофизиологии в биологии и медицине: к 100-летию юбилею присуждения Нобелевской премии академику И.П. Павлову. – Минск: ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – С. 61–63.
 25. Висмонт Ф.И., Зинчук В.В. Об участии монооксида азота в процессах поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия и температуры тела у крыс при перегревании // Докл. НАН Беларуси. – 1999. – №1. – С. 84–87.

26. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы // Вестн. Рос. АМН. – 1998. – № 7. – С. 43–51.
27. Галаган М.Е., Киладзе С.В., Ванин А.Ф. Реакция динитрозильных комплексов негемового железа с диэтилдитиокарбаматом в крови анестезированных крыс: её специфическое проявление на физико-химическом и физиологическом уровнях // Биофизика. – 1997. – Т. 42., № 3. – С. 687–693.
28. Галенко-Ярошевский П.А., Гацура В.В. Экспериментальные аспекты оптимизации фармакотерапии острой ишемии миокарда. – М.: Медицина, 2000. – 344 с.
29. Гацура С.В., Гацура В.В. Проблемы регуляции кислородтранспортной функции крови в кардиологии. – М.: Компания Спутник+, 2005. – 144 с.
30. Гацура С.В., Зинчук В.В. Влияние эналаприла малеата и лозартана на размеры экспериментального инфаркта миокарда, сродство гемоглобина к кислороду и некоторые показатели перекисного окисления липидов // Экспер. и клинич. фармакол. – 2004. – Т.67, № 1. – С. 19–21.
31. Глебов А.Н., Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при окислительном стрессе // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. – 2002. – № 2. – С. 71–73.
32. Глебов А.Н., Зинчук В.В. Значение L-аргинин-NO системы в формировании кислородтранспортной функции крови // Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. – 2005. – № 1. – С. 3-8.
33. Глебов А.Н., Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при окислительном стрессе в условиях коррекции L-аргигин-NO-системы // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 4. – С. 368-370.
34. Глуткин С.В. Эффект эпокринна на прооксидантно-антиоксидантное равновесие при гипотермии и отогревании // Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. – 2008. – № 4. – С. 33–37.
35. Глуткин С.В., Зинчук В.В. Кислородсвязующие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное равновесие при холодном воздействии и последующем отогревании в условиях коррекции // Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. – 2009. – № 2. – С. 24–27.
36. Гомазков О.А. Молекулярные и физиологические аспекты эндотелиальной дисфункции. Роль эндогенных химических регуляторов // Усп. физиол. наук. – 2000. – Т. 31, № 4. – С. 48-62.
37. Григлевски Р.Е. Участие свободных радикалов в преобразованиях эндотелиального простаглицина и окиси азота // Новости фармации и медицины. – 1997. – № 1-2. – С. 2–8.

38. Гурин А.В. Функциональная роль оксида азота в центральной нервной системе // Усп. физиол. наук. – 1997. – Т. 28, № 1. – С. 53–61.
39. Гурин В.Н. Механизмы лихорадки. – Мн.: Навука і тэхніка, 1993. – 165 с.
40. Гурин В.Н., Гурин А.В. Терморегуляция и биологически активные вещества крови. – Мн.: Бизнесофтсет, 2004. – 216 с.
41. Донскова Ю.С. и др. Состояние антиоксидантной и иммунной систем у онкологических больных на этапах хирургического лечения с интраоперационной радиотерапией // Анестезиол. и реаниматол. – 2004. – № 3. – С. 67–70.
42. Дремза И.К., Мальцев А.Н., Арцукевич А.Н. Динамика изменений кислородтранспортной функции крови и свободнорадикальных процессов в микосомах печени при стрессе // Новости медико-биологических наук. – 2005. – № 2. – С. 77–84.
43. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.
44. Заводник И.Б., Лапшина Е.А. Процессы окисления гемоглобина человека // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 1. – С. 42–48.
45. Зайцев В.Г., Закревский В.И. Методические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Вестн. Волгоградской мед. акад. – 1998. – № 4. – С. 49–53.
46. Залесский В.И., Великая Н.В. Антиапоптотические, проапоптотические и антитоксические реакции молекул флавоноидов – растительных фенолов // Проблемы харчування. – 2003. – №1. – С. 38–43.
47. Захаров Ю.М. Молекулярные и клеточно-клеточные механизмы регуляции эритропоэза // Вестник российской академии наук. – 2000. – № 2. – С. 4–9.
48. Захаров Ю.М. Чувствительность клеток к кислороду и продукция эритропоэтина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2005. – Т. 91, № 9. – С. 993–1004.
49. Захаров Ю.М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 6. – С. 592–607.
50. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. – М.: Наука/Интерпериодика, 2001. – 343 с.
51. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Усп. соврем. биол. – 1993. – Т. 113, № 3. – С. 286–296.

52. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиологических наук. – 2003. – Т. 34, № 2. – С. 33–45.
53. Зинчук В.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови в формировании прооксидантно-антиоксидантного состояния организма при гипертермических состояниях различного генеза. Монография. – Гродно: ГГМУ, 2005. – 168 с.
54. Зинчук В.В. Дисфункция эндотелия и кислородсвязывающие свойства гемоглобина // Кардиология. – 2009. – Т. 49, № 7-8. – С. 81–89.
55. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Влияние ингибирования NO-синтазы на кислородтранспортную функцию крови при лихорадке у кроликов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1997. – Т. 83, № 4. – С. 111–116.
56. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма // Успехи физиологических наук. – 1999. – Т. 30, № 3. – С. 38–48.
57. Зинчук В.В., Глуткин С.В. Влияние мелатонина на прооксидантно-антиоксидантное равновесие в условиях холодового воздействия с последующим отогреванием крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2008. – Т. 94, № 12. – С. 1435–1442.
58. Зинчук В.В., Шульга Е.В. Эффект мелатонина на кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние после введения липополисахарида // Экспер. и клинич. фармакология. – 2010. – Т. 73, № 4. – С. 18–22.
59. Зинчук В.В., Шульга Е.В., Гуляй И.Э. Влияние эритропоетина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние у кроликов при введении липополисахарида // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 1. – С. 43–49.
60. Зоров Д.Б. и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 265–272.
61. Иванов К.П. Биологическое окисление и его обеспечение кислородом. – СПб: Наука, 1993. – 272 с.
62. Илюхина В.А. и др. Влияние световых режимов, гормонов, эпифиза и возраста на антиоксидантную систему крыс // Мед. акад. журнал. – 2005. – Т. 3, № 7. – С. 18–20.
63. Иржак Л.И. Гемоглобины и их свойства. – М.: Наука, 1975. – 240 с.
64. Каган В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов // Биофизика: Итоги науки и техники. – М.: ВИНТИ, АН СССР, 1986. – 197 с.

65. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Усп. соврем. биол. – 1993. – Т. 113, № 4. – С. 456–470.
66. Киричек Л.Т., Зубова Е.О. Молекулярные основы окислительного стресса и возможности его фармакологической регуляции // Международный медицинский журнал. – 2004. – № 1. – С. 144–148.
67. Киричук В.Ф. и др. Оксид азота и микроциркуляторное звено системы гемостаза // Успехи физиологических наук. – 2008. – Т. 39, № 4. – С. 83–91.
68. Коваленко Е.А., Черняков И.Н. Кислород тканей при экстремальных факторах полета // Проблемы космической биол. – М., 1972. – Т. 21. – 264 с.
69. Ковальчук Л.В., Хараева З.Ф. Роль оксида азота в иммунопатогенезе стафилококковых инфекций // Иммунология. – 2003. – Т. 24, № 3. – С. 186–188.
70. Комаров Ф.И. и др. Мелатонин в норме и патологии. – М.: ИД Медпрактика, 2004. – 308 с.
71. Корнейчик В.Н., Зинчук В.В., Борисюк М.В. Зависимость перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в эритроцитах от сродства гемоглобина к кислороду // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1999. - № 4. – С. 70–74.
72. Кузнецов Д.А. и др. Влияние изотопного магниева пула на восстановление митохондриального синтеза АТФ, подавленного 1-метилникотинамидом // Биомед. химия. – 2006. – Т. 52, № 2. – С. 146–152.
73. Кузнецова Т.А. Применение фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* для коррекции нарушений иммунитета и гомеостаза на модели эндотоксемии // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 1. – С. 71–74.
74. Кульчицкий С.В. и др. Бульбарные механизмы регуляции болевой чувствительности в условиях эндотоксемии // Арх. клинич. экспер. медицины. – 2000. – Т. 9, № 1. – С. 22–24.
75. Лапша В.И. и др. Изменение афферентной импульсации в блуждающих нервах и реактивной температуры у крыс после введения эндотоксина *Escherichia coli* // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 10. – С. 1362–1369.
76. Литвицкий П.Ф., Грачев С.В. Повреждение клетки. – М, 1997. – 52 с.
77. Лиходед В.Г., Юшук Н.Д., Яковлев М.Ю. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии // Архив патологии. – 1996. – № 2. – С. 8–13.

78. Лобанок Л.М., Лукша Л.С. Функциональная роль эндотелия сосудов. Патологические и клинические аспекты // Мед. новости. – 1999. – № 4. – С. 19–27.
79. Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 5. – С. 592–609.
80. Малышев И.Ю., Малышева Е.В. Белки теплового шока и защита сердца // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 1998. – Т. 126, № 12. – С. 604–611.
81. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 992–1006.
82. Малышев И.Ю. и др. Стресс-ответ и апоптоз в про- и противовоспалительном фенотипе макрофагов // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, № 8. – С. 162–165.
83. Малышева Е.В. и др. Роль экстраклеточного и внутриклеточного оксида азота в регуляции клеточных ответов макрофагов // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 4. – С. 386–388.
84. Манухина Е.Б. и др. Увеличение продукции оксида азота в органах крысы при тепловом шоке // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 1996. – Т. 121, № 5. – С. 520–523.
85. Маркель А.Л., Елинова В.И., Храмова В.В. Роль оксидативного стресса в патогенезе артериальной гипертензии у крыс линии нисаг // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 5. – С. 594–599.
86. Марков Х.М. Оксид азота и сердечно-сосудистая система // Усп. физиол. наук. – 2001. – Т. 32, № 3. – С. 49–65.
87. Махро А.В. и др. Пренатальная гипергомоцистеинемия как модель окислительного стресса мозга // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 7. – С. 37–39.
88. Медведева Н.А. и др. Снижение оксида азота (NO)-цГМФ-зависимой расширительной реакции сосудов малого круга кровообращения при дисфункции эндотелия // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2005. – Т. 91, № 2. – С. 132–140.
89. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации.- М.: Нiproxia medical Ltd., 1993. – 332с.
90. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 4. – С. 485–503.
91. Меньщикова Е.Б. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 553 с.
92. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами. - М.: Наука, 1982. – 256 с.

93. Миль Е.М. и др. Изменение спектров ЭПР нитрозильных комплексов гемопротеинов крови при низкоинтенсивном тотальном облучении мышей // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т. 40, № 3. – С. 305-309.
94. Морозова И.Л., Солтанов В.В. Реакция афферентных волокон ободочной кишки на введение в ее просвет липополисахарида *Escherichia coli* на фоне экспериментального колита // Новости медико-биологических наук. – 2005. – № 2. – С. 12–16.
95. Новоселова Е.Г. и др. Продукция белков теплового шока, цитокинов и оксида азота при токсическом стрессе // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 4. – С. 471–480.
96. Орлова Е.А., Комаревцева И.А. Роль NO-синтазы в стимуляции опиатных рецепторов и устойчивости почек к оксидативному стрессу // Украинский биохимический журнал. – 2004. – Т. 76, № 1. – С. 97–102.
97. Петренко Ю.М., Шашурин Д.А., Титов В.Ю. Новые источники оксида азота, их возможная физиологическая роль и значение // Экспер. и клинич. фармакол. – 2001. – Т. 64, № 2. – С. 72-80.
98. Попов С.С. и др. Мелатонин как фактор коррекции процессов свободнорадикального окисления при токсическом поражении печени крыс // Экспер. и клинич. фармакология. – 2007. – Т. 70, № 1. – С.48–51.
99. Проскуряков С.Я. и др. Влияние ингибитора NO-синтазы 2-АДТ на эндотоксининдуцированные изменения гемодинамики и дыхания крыс // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, № 10. – С. 446-449.
100. Проскуряков С.Я. и др. Структура и активность ингибиторов NO-синтаз, специфичных к L-аргининсвязующему центру // Биохимия. – 2005. – Т. 1, № 1. – С. 14-32.
101. Путинцева О.В., Артюхов В.Г., Вашанов Г.А. Структурно-функциональные характеристики молекул гемоглобина при длительном хранении консервированной крови доноров // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86, № 4. – С. 432-439.
102. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих – М.: Наука, 1997. – 156 с.
103. Рожкова Е.А. и др. Карнозин и антиоксиданты природного происхождения как средства профилактики острого посленагрузочного окислительного стресса // Экспер. и клинич. фармакология. – 2007. – Т. 70, № 5. – С. 44–46.
104. Ройтман Е.В. и др. Изменение реологических свойств крови и осмотической резистентности эритроцитов при активации свободнорадикальных процессов // Клинич. лаб. диагн. – 2001. – № 3. – С. 42–43.

105. Руднов В.А. Сепсис: современный взгляд на проблему // Клинич. антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 4–10.
106. Рябиченко Е.В., Бондаренко В.М., Веткова Л.Г. Цитокиностимулирующая активность липополисахарида грамотрицательных бактерий и его роль в противоопухолевом иммунитете // Журнал микробиологии. – 2005. – № 6. – С. 76–81.
107. Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г., Бондаренко В.М. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов // Журнал микробиологии. – 2004. – № 3. – С. 98–105.
108. Рязанцева Н.В. и др. Митогенактивированные протеинкиназы JNK и p38-редокс-зависимые молекулярные мишени нарушения апоптоза при окислительном стрессе // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40, № 2. – С. 3–11.
109. Саенко Ю.В. и др. Влияние эритропоэтина на развитие доксорубин-индуцированного оксидативного стресса в почках крыс // Экспер. и клинич. фармакология. – 2005. – Т. 68, № 6. – С. 52–54.
110. Саникидзе Т.В. и др. Роль свободных радикалов азота и кислорода в патогенезе ЛПС-индуцированной эндотоксемии // Бюллетень exper. биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 2. – С. 172–176.
111. Сидоренко С.В. Роль микробного фактора в этиологии и патогенезе сепсиса // Инфекция и антимикробная терапия. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 76–83.
112. Скулачев В.П. Нефосфорилирующее дыхание как механизм, предотвращающий образование активных форм кислорода // Молекулярная биол. – 1995. – Т. 29, № 6. – С. 1199–1209.
113. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро или зло? // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии. – 1999. – № 1. – С. 12–18.
114. Скулачев В.П. H_2O_2 – сенсоры легких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите организма // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 10. – С. 1425–1429.
115. Солтанов В.В. Нервные механизмы модулирующих влияний липополисахарида *e. coli* на висцеральные функции // XI Съезд Белорусского общества физиологов (Минск, 21–22 сентября 2006 г.): Тез. докл. – Мн., 2006. – С. 142.
116. Сорокин А.В. Пирогенны. – М.: Ленинградское отделение, 1965. – 176 с.
117. Стародубцева М.Н., Игнатенко В.А., Черенкевич С.Н. Повреждения эритроцитов, инициированные взаимодействием нитрит-ионов с гемоглобином // Биофизика. – 1999. – Т. 44, № 6. – С. 1068–1072.

118. Стародубцева М.Н., Черенкевич С.Н. Механизмы реакций гемоглобина с пероксинитритом в водно-солевом растворе // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. – 2003. – № 2. – С. 86-90.
119. Степовая Е.А., Новицкий Е.В., Рязанцева Н.В. и др. Типовые изменения эритроцитов при хроническом воспалении // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 1. – С. 66-70.
120. Судаков К.В. Основные принципы общей теории функциональных систем // под ред. К.В. Судакова. – М.: Медицина, 1987. – С. 26–48.
121. Торкунов П.А., Шабанов П.Д. Применение ингибиторов NO-синтазы, производных L-аргинина для предотвращения экспериментального токсического отека легких // Экспер. и клинич. фармакология. – 2009. – Т. 72, № 2. – С. 44–46.
122. Трифонов А.И. и др. Адаптация к теплу активирует синтез HSP70, ограничивает гиперпродукцию оксида азота и защищает организм от острой гипотензии при тепловом шоке // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 1999. – Т. 128, № 11. – С. 507–510.
123. Тропникова Г.К. и др. Влияние экзогенного мелатонина на содержание серотонина в мозге крыс и функциональную активность митохондрий печени // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2007. – № 4. – С. 55–60.
124. Федосова Н.Ф. и др. Механизмы диквертинопосредованной регуляции функции нейтрофилов у больных сахарным диабетом 2 типа // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 2. – С.164–167.
125. Фридович И.Т. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода // Свободные радикалы в биологии: Пер. с англ.- Москва, 1979. – Т. 1. – С. 272–314.
126. Ходосовский М.Н., Зинчук В.В. Регуляция прооксидантно-антиоксидантного состояния печени в остром постишемическом периоде // Проблемы регуляции висцеральных функций: сб. науч ст.: в 2 кн./ редкол.: В.С. Улащик [и др.]. – Минск: РИВШ, 2008. – Кн. 1. – С. 247–250.
127. Ходосовский М.Н., Зинчук В.В. Изменение параметров кислородтранспортной функции крови при ишемии-реперфузии печени у крыс в условиях введения 1-метилникотинамида // Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. – 2009. – № 2. – С. 52–54.
128. Шварц Я.Ш., Душкин М.И. Аккумуляция комплексов эндотоксин-липопротеины низкой плотности макрофагами и артериальной стенкой в моделях *in vitro* // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 2009. –Т. 147, № 2. – С. 148–151.
129. Шульга Е.В. Кислородтранспортная функция крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние организма в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. – 2009. – № 2. – С. 49–51.

130. Шульга Е.В., Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови и свободнорадикальные процессы у кроликов после введения липополисахарида // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2009. – № 4. – С. 38–43.
131. Шульга Е.В., Зинчук В.В. Эффект 1-метилникотинамида на кислородтранспортную функцию крови и свободнорадикальные процессы при введении липополисахарида // *Новости медико-биологических наук.* – 2009. – № 3. – С. 17–22.
132. Яковлев М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека // *Физиология человека.* – 2003. – Т. 29, № 4. – С. 98–109.
133. Abd El-Gawad H.M., Khalifa A.E. Quercetin, coenzyme Q₁₀, and L-canavanine as protective agents against lipid peroxidation and nitric oxide generation in endotoxin-induced shock in rat brain // *Pharmacol. Res.* – 2001. – Vol. 43. – P. 257–263.
134. Abd-Elghaffar S.Kh., El-Sokkary G.H., Sharkawy A.A. Aluminum-induced neurotoxicity and oxidative damage in rabbits: protective effect of melatonin // *NeuroEndocrinol. Lett.* – 2005. – Vol. 26, № 5. – P. 609–616.
135. Abdelrahman M. et al. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia // *Shock.* – 2004. – Vol. 22, № 1. – P. 63–69.
136. Adamiec M. et al. Search for drugs of the combined anti-inflammatory and anti-bacterial properties: 1-methyl-N'-(hydroxymethyl)nicotinamide // *Pharmacol. Rep.* – 2006. – Vol. 58, № 2. – P. 246–249.
137. Akbulut H. et al. Ibuprofen reduces plasma nitrite/nitrate levels in a rabbit model of endotoxin-induced shock // *Neuro Endocrinol. Lett.* – 2005. – Vol. 26, № 4. – P. 407–412.
138. Alayash A.I. Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants? // *Nature Biotechnology.* – 1999. – Vol. 17. – P. 545–549.
139. Alayash A.I. Hemoglobin-based blood substitutes and the hazards of blood radicals // *Free Rad. Res.* – 2000. – Vol. 33. – P. 341–348.
140. Albakri Q.A., Stuehr D.J. Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, № 10. – P. 5414–5421.
141. Alexander C., Rietschel E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity // *J. Endotoxin Res.* – 2001. – Vol. 7. – P. 167–202.
142. Allegra M. et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species // *J. Pineal. Res.* – 2003. – Vol. 34. – P. 1–10.
143. Allison T.B., Pieper G.M., Clayton F.C., Eliot R.S. Reduced high-energy phosphate levels in rat hearts. II. Effects of sodium cyanate // *Am. J. Physiol.* – 1976. – Vol. 230, № 6. – P. 1751–1754.

144. Anderson M.T., Staal F.J., Gitler C., Herzenberg L.A. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91. – P. 11527-11531.
145. Annane D., Aegerter P., Jars-Guincestre M.C., Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2003. – № 1687. – P. 165-172.
146. Annane D., Bellissant E., Cavaillon J.-M. Septic shock // *Lancet.* – 2005. – № 365. – P. 63-78.
147. Aoki K. et al. Effect of aminoguanidine on lipopolysaccharide-induced changes in rat liver transporters and transcription factors // *Biol. Pharm. Bull.* – 2008. – Vol. 31, № 3. – P. 412–420.
148. Aoshiba K. et al. Therapeutic effects of erythropoietin in murine models of endotoxin shock // *Crit. Care Med.* – 2009. – Vol. 37, № 3. – P. 889–898.
149. Aruoma O.I., Cuppett S.L. *Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro.* – Concepts. New York, AOCS Press, 1997. – 256 p.
150. Aydin M.V. et al. Effect of melatonin on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage // *Neurol. Res.* – 2005. – Vol. 27, № 1. – P. 77–82.
151. Bachetti T. et al. Species-specific modulation of the nitric oxide pathway after acute experimentally induced endotoxemia // *Crit. Care Med.* – 2003. – Vol. 31, № 5. – P. 1509–1514.
152. Balla J. et al. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90, № 20. – P. 9285-9289.
153. Barja G. Oxygen radicals, a failure or a success of revolution? // *Free Rad. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 18. – P. 63-70.
154. Bartuś M. et al. 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats // *Pharmacol. Rep.* – 2008. – Vol. 60, № 1. – P. 127–138.
155. Basilio N. et al. Synergistic and antagonistic interactions between haemozoin and bacterial endotoxin on human and mouse macrophages // *Parassitologia.* – 2003. – Vol. 45, № 3-4. – P. 135-140.
156. Bateman R.M. et al. Inhibiting nitric oxide overproduction during hypotensive sepsis increases local oxygen consumption in rat skeletal muscle // *Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 36, № 1. – P. 225–231.
157. Battista S. et al. Nitric oxide level profile in human liver transplantation // *Dig. Dis. Sci.* – 2002. – № 3. – P. 528–534.
158. Baud O. et al. Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 20, № 1. – P. 29–40.

159. Bawolak M.T. et al. Cardiovascular expression of inflammatory signaling molecules, the kinin B1 receptor and COX2, in the rabbit: effects of LPS, anti-inflammatory and anti-hypertensive drugs // *Regul. Pept.* – 2008. – Vol. 146, № 1–3. – P. 157–168.
160. Baydas G. et al. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2006. – Vol. 71, № 1. – P. 91–95.
161. Ben-Shaul V. et al. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge // *Toxicol. Lett.* – 2001. – Vol. 123. – P. 1–10.
162. Berges A. et al. Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning // *Acta Cardiol.* – 2003. – Vol. 58, № 2. – P. 119–132.
163. Bertuglia S. Intermittent hypoxia modulates nitric oxide-dependent vasodilation and capillary perfusion during ischemia-reperfusion-induced damage // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 294, № 4. – P. 1914–1922.
164. Bertuglia S., Reiter R.J. Melatonin reduces ventricular arrhythmias and preserves capillary perfusion during ischemia-reperfusion events in cardiomyopathic hamsters // *J. Pineal. Res.* – 2007. – Vol. 42, № 1. – P. 55–63.
165. Bhattacharyya J., Biswas S., Datta A.G. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants // *Curr. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 11, № 3. – P. 359–368.
166. Biedron R. et al. 1-Methylnicotinamide and nicotinamide: two related anti-inflammatory agents that differentially affect the functions of activated macrophages // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. – 2008. – Vol. 56, № 2. – P. 127–134.
167. Bishop A., Cashman N.R. Induced adaptive resistance to oxidative stress in the CNS: a discussion on possible mechanisms and their therapeutic potential // *Curr. Drug. Metab.* – 2003. – Vol. 4, № 2. – P. 171–184.
168. Blackwell N.S. et al. Activation of NF- κ B in rat lungs by treatment with endotoxin: modulation by treatment with N-acetylcysteine // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157. – P. 1630–1637.
169. Blanchard B., Pompon D., Ducrocq C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite // *J. Pineal. Res.* – 2000. – Vol. 29, № 3. – P. 184–192.
170. Blessing W.W. 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation reduces cutaneous vasoconstriction and fever associated with the acute inflammatory response in rabbits // *Neuroscience*. – 2004. – Vol. 123, № 1. – P. 1–4.
171. Bonaventura C., Ferruzzi G., Tesh S., Stevens R.D. Effects of S-nitrosation on oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobin // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 35. – P. 24742–24748.

172. Borelli E. et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk // *Crit. Care Med.* – 1996. – Vol. 24. – P. 392–397.
173. Bouzouf M. et al. Melatonin prevents hyperhomocysteinemia and neural lipid peroxidation induced by methionine intake // *Curr. Neurovasc. Res.* 2005. – Vol. 2, № 2. – P. 175–178.
174. Bowen O.T. et al. Plasma nitric oxide concentrations in broilers after intravenous injections of lipopolysaccharide or microparticles // *Poult. Sci.* – 2007. – Vol. 86, № 12. – P. 2550–2554.
175. Brandes R.P. et al. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia // *Hypertension.* – 1999. – Vol. 33, № 5. – P. 1243–1249.
176. Braulio V.B. et al. Time course of nitric oxide production after endotoxin challenge in mice // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2004. – Vol. 287, № 5. – P. 912–918.
177. Brawn K., Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense // *Acta Physiol. Scand.* – 1980. – Vol. 492. – P. 9–18.
178. Brendt P. et al. Lipopolysaccharide evokes resistance to erythropoiesis induced by the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in rats // *Anesth. Analg.* – 2009. – Vol. 109, № 3. – P. 705–711.
179. Broncel M., Koziróg-Kołacińska M., Chojnowska-Jeziarska J. Melatonin in the treatment of atherosclerosis // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2007. – Vol. 23, № 134. – P. 124–127.
180. Brune B., Zhou J., von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis // *Kidney Int.* – 2003. – Vol. 84. – P. 22–24.
181. Bryniarski K. et al. Anti-inflammatory effect of 1-methylnicotinamide in contact hypersensitivity to oxazolone in mice; involvement of prostacyclin // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 578, № 2–3. – P. 332–338.
182. Brzozowski T. et al. Therapeutic potential of 1-methylnicotinamide against acute gastric lesions induced by stress: role of endogenous prostacyclin and sensory nerves // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – Vol. 326, № 1. – P. 105–116.
183. Cadenas S., Cadenas A.M. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity // *Toxicology.* – 2002. – Vol. 180, № 1. – P. 45–63.
184. Cadenas S., Rojas C., Barja G. Endotoxin increases oxidative injury to proteins in guinea pig liver: protection by dietary vitamin C // *Pharmacol. Toxicol.* – 1998. – Vol. 82. – P. 11–18.
185. Cannon R.O. et al. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108, № 2. – P. 279–287.

186. Carluccio M.A. et al. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, № 4. – P. 2344–2354.
187. Carrillo-Vico A. et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/antiinflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects // *J. Pineal. Res.* – 2005. – Vol. 39, № 4. – P. 400–408.
188. Carter T.D., Bettache N., Ogden D. Potency and kinetics of nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation determined with flash photolysis of ruthenium nitrosyl chlorides // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 122. – P. 971-973.
189. Cassone Faldetta M. et al. L-arginine infusion decreases plasma total homocysteine concentrations through increased nitric oxide production and decreased oxidative status in Type II diabetic patients // *Diabetologia.* – 2002. – Vol. 45, № 8. – P. 1120–1127.
190. Catalá A. The ability of melatonin to counteract lipid peroxidation in biological membranes // *Curr. Mol. Med.* – 2007. – Vol. 7, № 7. – P. 638–649.
191. Caylak E., Aytakin M., Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2008. – Vol. 60, № 4–5. – P. 289–294.
192. Celik M. et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 4. – P. 2258–2263.
193. Ceran S. et al. Effects of selective iNOS inhibition in sepsis: evaluation of lung tissue damage and blood gases // *Int. Surg.* – 2008. – Vol. 93, № 1. – P. 19–24.
194. Cetin H. et al. Novel evidence suggesting an anti-oxidant property for erythropoietin on vancomycin-induced nephrotoxicity in a rat model // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2007. – Vol. 34, № 11. – P. 1181–1185.
195. Chang L. et al. Liver-X-receptor activator prevents homocysteine-induced production of IgG antibodies from murine B lymphocytes via the ROS-NF-kappaB pathway // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 357, № 3. – P. 772–778.
196. Chatterjee S. et al. Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and L-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock // *J. Surg. Res.* – 2007. – Vol. 140, № 1. – P. 99–108.
197. Chattopadhyay A. et al. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical // *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 59, № 4. – P. 419–425.

198. Chen L.Y., Mehta J.L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 32. – P. 57–61.
199. Chlopicki S. et al. 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 152, № 2. – P. 230–239.
200. Chu S.C. et al. Regulation of gelatinases expression by cytokines, endotoxin, and pharmacological agents in the human osteoarthritic knee // *Connect. Tissue. Res.* – 2004. – Vol. 45, № 3. – P. 142–150.
201. Cobb J.P. et al. N-omega-amino-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin // *J. Exp. Med.* – 1992. – Vol. 176. – P. 1175–1182.
202. Colak C. et al. Investigating the protective effect of melatonin on liver injury related to myocardial ischemia-reperfusion // *Med. Sci. Monit.* – 2007. – Vol. 13, № 11. – P. 251–254.
203. Connelly L. et al. Biphasic regulation of NF-kB activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166. – P. 3873-3881.
204. Coskun O. et al. Protection of endotoxin-induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or/and EGb 761 treatment // *J. Appl. Toxicol.* – 2005. – Vol. 25, № 1. – P. 8–12.
205. Crawford J.H. et al. Transduction of NO-bioactivity by the Red blood cell in Sepsis: Novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. // *Blood.* – 2004. – Vol. 104, № 5. – P. 1375- 1382.
206. Creeke P.I. et al. Whole blood NAD and NADP concentrations are not depressed in subjects with clinical pellagra // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137, № 9. – P. 2013–2017.
207. Cuzzocrea S. et al. Erythropoietin reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice // *Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 34, № 4. – P. 1168–1177.
208. Dana A., Baxter G.F., Yellon D.M. Delayed or second window preconditioning induced by adenosine A1 receptor activation is independent of early generation of nitric oxide or late induction of inducible nitric oxide synthase // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 38, № 2. – P. 278–287.
209. D'Angio C.T., Finkelstein J.N. Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – Vol. 71, № 1–2. – P. 371–380.
210. Dauphinee S.M., Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells // *Laboratory Investigation.* – 2006. – Vol. 86. – P. 9–22.

211. Davies K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life // *Biochem. Soc. Symp.* – 1995. – Vol. 61. – P. 1–31.
212. De Filippis D. et al. Melatonin reverses lipopolysaccharide-induced gastro-intestinal motility disturbances through the inhibition of oxidative stress // *J. Pineal. Res.* – 2008. – Vol. 44, № 1. – P. 45–51.
213. Deem S. et al. Effects of S-nitrosation of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction and nitric oxide flux // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 163, № 5. – P. 1164–1170.
214. Deliconstantinos G. et al. Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients // *Anticancer. Res.* – 1995. – Vol. 15. – P. 1435–1446.
215. Dhalla N.S., Elmoselhi A.B., Hata T., Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury // *Cardiovascular Research.* – 2000. – Vol. 47. – P. 446–456.
216. di Villa Bianca R.D. et al. Recombinant human erythropoietin prevnts lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in the rat // *Shock.* – 2009. – Vol. 31, № 5. – P. 529–534.
217. Didion S.P. et al. Overexpression of CuZn-SOD prevents lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction // *Stroke.* – 2004. – Vol. 35, № 8. – P. 1963–1967.
218. Digicaylioglu M., Lipton S.A. Erythropoietin – mediated neuroprotection involves crosstalk between Jak2 and NF- κ B signaling cascades // *Nature.* – 2001. – Vol. 412. – P. 641–647.
219. Dixit C., Rastogi L., Dikshit M. Effect of nitric oxide modulators on pylorus-ligation-induced ulcers in the rat // *Pharmacol. Res.* – 1999. – Vol. 39, № 1. – P. 33–39.
220. Dragun P. et al. Matrix metalloproteinases activity during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. The effect of 1-methylnicotinamide (MNA) // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 59, № 3. – P. 441–455.
221. d'Uscio L.V. et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin // *Hypertension.* – 2007. – Vol. 49, № 5. – P. 1142–1148.
222. Eaton W., Henry E.R., Hofrichter J., Mozzarelli A. Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood? // *Nat. Struct. Biol.* – 1999. – Vol. 6. – P. 353–358.
223. Elmas M. et al. Influence of Escherichia coli endotoxin-induced endotoxaemia on the pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous administration in rabbits // *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* – 2006. – Vol. 53, № 8. – P. 410–414.
224. El-Yassin I. et al. An automated mixing apparatus for determining haemoglobin-oxygen dissociation // *J. Physiol.* – 1978. – Vol. 282. – P. 3–4.

225. Er H. et al. Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy with protein kinase C inhibitor (chelerythrine chloride) and melatonin // *Ophthalmologica*. – 2006. – Vol. 220, № 1. – P. 17–22.
226. Escames G. et al. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment // *Exp. Gerontol*. – 2006. – Vol. 41, № 11. – P. 1165–1173.
227. Esprey M.G. et al. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 899. – P. 209–221.
228. Eum H.A., Park S.W., Lee S.M. Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis // *Nitric Oxide*. – 2007. – Vol. 17, № 3–4. – P. 126–133.
229. Evans T., Carpenter A., Kinderman H., Cohen J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome // *Circ. Shock*. – 1993. – Vol. 41. – P. 77–81.
230. Fischer P.A. et al. Hyperhomocysteinemia induces renal hemodynamic dysfunction: is nitric oxide involved? // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14, № 3. – P. 653–660.
231. Fisher J.W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2003. – Vol. 228, № 1. – P. 11–14.
232. Fisher L.G. et al. Selective iNOS inhibition attenuates acetylcholine- and bradykinin-induced vasoconstriction in lipopolysaccharide-exposed rat lungs // *Anesthesiology*. – 1999. – Vol. 91, № 6. – P. 1724–1732.
233. Fleming I., Busse R. The physiology of nitric oxide: control and consequences // *Curr. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 3. – P. 189–205.
234. Flohe L. et al. Redox regulation of NF-kappa B activation // *Free Rad. Biol.* – 1997. – Vol. 22. – P. 1115–1126.
235. Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* – 2008. – Vol. 5, № 6. – P. 338–349.
236. Fukuwatari T. et al. Effects of fatty liver induced by niacin-free diet with orotic acid on the metabolism of tryptophan to niacin in rats // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2002. – Vol. 66, № 6. – P. 1196–1204.
237. Gebicki J. et al. 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin // *Pol. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 55, № 1. – P. 109–112.
238. Genc K. et al. Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes // *Physiol. Res.* – 2006. – Vol. 55, № 1. – P. 33–38.
239. Giebler R. et al. Combined antithrombin III and C1-esterase inhibitor treatment decreases intravascular fibrin deposition and attenuates cardiorespiratory impairment in rabbits exposed to *Escherichia coli* endotoxin // *Crit. Care Med.* – 1999. – Vol. 27, № 3. – P. 597–604.

240. Gladwin M.T. et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease // *Br. J. Haematol.* – 2002. – Vol. 6, № 2. – P. 436–444.
241. Gladwin M.T. et al. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, № 18. – P. 9943–9948.
242. Gladwin M.T., Crawford J.H., Patel R.P. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 36, № 6. – P. 707–717.
243. Gladwin M.T., Lancaster J.R., Freeman B.A., Schechter A.N. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 5. – P. 496–500.
244. Glebov A.N., Zinchuk V.V. Blood oxygen-carrying function during the oxidative stress induced by lipopolysaccharide with a modification of the L-arginine-NO pathway // *Annales Academiae Medicae Bialostocensis.* – 2005. – Vol. 50. – P. 247–251.
245. Go Y.M. et al. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flowdependent activation of c-JunNH₂-terminal kinase // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 277. – P. 1647–1653.
246. Godecke A., Molojavyi A., Heger J. et al. Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 24. – P. 21761–21766.
247. Goode H.F. et al. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction // *Crit. Care Med.* – 1995. – Vol. 23. – P. 646–651.
248. Goraca A.H., Piechota A., Huk-Kolega H. Effect of alpha-lipoic acid on LPS-induced oxidative stress in the heart // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 60, № 1. – P. 61–68.
249. Gow A.J. et al. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96, № 16. – P. 9027–9032.
250. Grasso G. et al. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 8. – P. 5627–5631.
251. Guillard J.C. et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? // *Pathol. Biol. (Paris).* – 2003. – Vol. 51, № 2. – P. 101–110.
252. Guler G. et al. The protective effects of N-acetyl-L-cysteine and epigallocatechin-3-gallate on electric field-induced hepatic oxidative stress. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2008. – Vol. 84, № 8. – P. 669–680.
253. Gundersen Y. et al. The nitric oxide donor sodium nitroprusside protects against hepatic microcirculatory dysfunction in early endotoxaemia. // *Intens. Care Med.* – 1998. – Vol. 24. – P. 1257–1263.

254. Guneli E. et al. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/reperfusion injury in rats // *Mol. Med.* – 2007. – Vol. 13, № 9–10. – P. 509–517.
255. Gutierrez-Ruiz M.C., Quiroz S.C., Souza V. et al. Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde, and LPS // *Toxicology.* – 1999. – Vol. 134, № 2-3. – P. 197-207.
256. Guzik T.J., Korbout R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 54, № 4. – P. 469–487.
257. Halliwell B., Gutteridge J.M.S. Free radicals in biology and medicine, thirded // Oxford university press, New York. – 1999. – P. 1–936.
258. Han Y.J. et al. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages // *Nitric oxide.* – 2001. – Vol. 5. – P. 504–513.
259. Hayes J.D., McLellan L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress // *Free Radic. Res.* – 1999. – Vol. 31, № 4. – P. 273–300.
260. Head C.A. et al. Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo // *J. Clin. Invest.* – 1997. -Vol. 100, № 5. – P.1193–1198.
261. Heller A.R. et al. N-Acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients // *Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 29. – P. 272–276.
262. Hensley K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28, № 10. – P. 1456–1462.
263. Heo S.K. et al. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production // *Immunol. Lett.* – 2008. – Vol. 120, № 1–2. – P. 57–64.
264. Herrera J. et al. Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration // *Am. J. Kidney. Dis.* – 2001. – Vol. 37, № 4. – P. 750–757.
265. Hlutkin S.V., Zinchuk V.V. Effect of melatonin on the blood oxygen transport during hypothermia and rewarming in rats // *Adv. Med. Sci.* – 2008. – Vol. 53, № 2. – P. 234–239.
266. Hobbs A.J. et al. Haemoglobin: NO transporter, NO inactivator or NO of the above? // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2002. - Vol. 23, № 9. – P. 406–411.
267. Hojman P. et al. Erythropoietin augments the cytokine response to acute endotoxin-induced inflammation in humans // *Cytokine.* – 2009. – Vol. 45, № 3. – P. 154–157.

268. Hosokawa N. et al. Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids // *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – Vol. 12, № 8. – P. 3490-3498.
269. Hrinczenko B.W. et al. Effect of nitric oxide and nitric oxide donors on red blood cell oxygen transport // *Br. J. Haematol.* – 2000. – Vol. 110. – P. 412-419.
270. Hsia C.C.W. Mechanisms of disease: Respiratory function of hemoglobin // *New England Journal of Medicine.* – 1998. – Vol. 338, № 4. – P. 239–247.
271. Hsu D.Z., Liu M.Y. Effects of sesame oil on oxidative stress after the onset of sepsis in rats // *Shock.* – 2004. – Vol. 22, № 6. – P. 582–585.
272. Huang F. et al. Beneficial effect of transfusion with low-affinity red blood cells in endotoxemia // *Transfusion.* – 2005. – Vol. 45, № 11. – P. 1785–1790.
273. Huang K.T. et al. Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98, № 20. – P. 11771-11776.
274. Huang X.L. et al. The role of hydrogen sulfide in acute lung injury during endotoxic shock and its relationship with nitric oxide and carbon monoxide // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2008. – Vol. 88, № 32. – P. 2240–2245.
275. Hussein M.R. et al. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2007. – Vol. 88, № 1. – P. 19–29.
276. Ichinose F. Impact of nitric oxide synthase 3 on myocardial dysfunction in sepsis // *Masui.* – 2008. – Vol. 57, № 3. – P. 294–301.
277. Iqbal M. et al. Time course of nitric oxide, peroxynitrite, and antioxidants in the endotoxemic heart // *Crit. Care Med.* – 2002. – Vol. 30, № 6. – P. 1291–1296.
278. Ismailoglu U.B. et al. Effects of aminoguanidine and N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester on vascular hyporeactivity induced by endotoxaemia // *Eur. J. Surg.* – 2001. – Vol. 167, № 11. – P. 803–809.
279. Jaeschke H. et al. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidative stress // *Hepatology.* – 1999. – Vol. 29. – P. 443–450.
280. Jakubowski A. et al. S-nitroso human serum albumin given after LPS challenge reduces acute lung injury and prolongs survival in a rat model of endotoxemia // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 379, № 3. – P. 281–290.
281. James P.E. et al. Tissue hypoxia during bacterial sepsis is attenuated by PR-39, an antibacterial peptide // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2003. – Vol. 530. – P. 645–652.

282. Jiang H.N. et al. Effects of N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester and aminoguanidine on lipopolysaccharide-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs // *Chin. Med. J. (Engl)*. – 2008. – Vol. 121, № 17. – P. 1693–1697.
283. Jin L. et al. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 58, № 2. – P. 191–206.
284. Johannes T., Mik E.G., Ince C. Nonresuscitated endotoxemia induces microcirculatory hypoxic areas in the renal cortex in the rat // *Shock*. – 2009. – Vol. 31, № 1. – P. 97–103.
285. Johe P.D., Østerud B. The in vivo effect of melatonin on cellular activation processes in human blood during strenuous physical exercise // *J. Pineal. Res.* – 2005. – Vol. 39, № 3. – P. 324–330.
286. Johnson D.W. et al. Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 69, № 10. – P. 1806–1813.
287. Jourdeuil D., Gray L., Grisham M.B. S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000b. – Vol. 273, № 1. – P. 22–26.
288. Jourdeuil D., Hallen K., Feelisch M., Grisham M.B. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000a. – Vol. 28, № 3. – P. 409–417.
289. Jourdeuil D. et al. Enhanced S-nitroso-albumin formation from inhaled NO during ischemia/reperfusion // *Circ. Res.* – 2004. – Vol. 94, № 4. – P. 559–565.
290. Joyeux-Faure M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol. 323, № 3. – P. 759–762.
291. Jozefowicz E. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha by fenofibrate prevents myocardial dysfunction during endotoxemia in rats // *Crit. Care Med.* – 2007. – Vol. 35, № 3. – P. 856–863.
292. Jubelin B.C., Gierman J.L. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide // *Am. J. Hypertens.* – 1996. – Vol. 9. – P. 1214–1219.
293. Juul S.E. et al. Recombinant erythropoietin is neuroprotective in a novel mouse oxidative injury model // *Dev. Neurosci.* – 2008. – Vol. 30, № 4. – P. 231–242.
294. Kadoi Y., Goto F. Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats // *Anesth. Analg.* – 2004. – Vol. 99, № 1. – P. 212–220.
295. Kang E.S. et al. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins // *J. Lab. Clin. Med.* – 2000. – Vol. 135, № 6. – P. 444–451.

296. Kang E.S. et al. Reversible sequestration of nitric oxide by hemoglobin during hemodialysis in end-stage renal disease // *Am. J. Med. Sci.* – 2001. – Vol. 321, № 2. – P.113–123.
297. Kanter M. et al. Protective effects of vitamin C, alone or in combination with vitamin A, on endotoxin-induced oxidative renal tissue damage in rats // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 206, № 2. – P. 155–162.
298. Kapturczak M.H. et al. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse // *Am. J. Pathol.* – 2004. – 165, № 3. – P. 1045-1053.
299. Kasap B. et al. Protective effect of Epo on oxidative renal injury in rats with cyclosporine nephrotoxicity // *Pediatr. Nephrol.* – 2008. – Vol. 23, № 11. – P. 1991–1999.
300. Katavetin P. et al. Antioxidative effects of erythropoietin // *Kidney Int. Suppl.* – 2007. – Vol. 107. – P. 10–15.
301. Kawano T. et al. iNOS-derived NO and nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2007. – Vol. 27, № 8. – P. 1453–1462.
302. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1999. – № 1411. – P. 273–289.
303. Kelm V., Rath J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-arginine-NO pathway // *Basic. Res. Cardiol.* – 2001. – Vol. 96. – P. 107–127.
304. Kerman M. et al. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? // *Exp. Brain Res.* – 2005. – Vol. 163, № 3. – P. 406–410.
305. Kilbourn R.G. et al. N^o-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87. – P. 3629–3632.
306. Kim S.W., Lee J.K. NO-induced downregulation of HSP10 and HSP60 expression in the postischemic brain // *J. Neurosci Res.* – 2007. – Vol. 85, № 6. – P. 1252–1259.
307. Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Gladwin M.T. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26, № 4. – P. 697–705.
308. Klatt P., Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267. – P. 4928–4944.
309. Klotz L.O., Kroncke K.D., Buchczyk D.P., Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress // *J. Nutr.* – 2003. – Vol. 133. – P. 1448–1451.

310. Knotzer H. et al. Arginine vasopressin does not alter mucosal tissue oxygen tension and oxygen supply in an acute endotoxemic pig model // *Intensive Care Med.* – 2006. – Vol. 32, № 1. – P. 170–174.
311. Ko K. et al. Changes in S-adenosylmethionine and GSH homeostasis during endotoxemia in mice // *Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 88, № 10. – P. 1121–1129.
312. Korantzopoulos P., Galaris D., Papaioannides D., Siogas K. The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention // *Med. Sci. Monit.* – 2003. – Vol. 9, № 6. – P. 120–125.
313. Korbut R., Gryglewski R.J. The effect of prostacyclin and nitric oxide on deformability of red blood cells in septic shock in rats // *J. Physiol. Pharmacol.* – 1996. – Vol. 47, № 4. – P. 591–599.
314. Koroglu T.F. et al. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced splenic and thymic apoptosis in rats // *Physiol. Res.* – 2006. – Vol. 55, № 3. – P. 309–316.
315. Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 218, № 3. – P. 749–752.
316. Kourembanas S., Marsden P.A., McQuillan L.P., Faller D.V. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium // *J. Clin. Invest.* – 1991. – Vol. 88, № 3. – P. 1054–1057.
317. Kozlov A.V. et al. Experimental evidence suggesting that nitric oxide diffuses from tissue into blood but not from blood into tissue // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1536, № 2-3. – P. 177–184.
318. Krolkowski J.G. et al. Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo // *Can. J. Anaesth.* – 2006. – Vol. 53, № 2. – P. 174–182.
319. Kumral A. et al. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain // *Neonatology.* – 2007. – Vol. 92, № 4. – P. 269–278.
320. Kuykendall J.R., Cox R., Kinder D. 1-Methylnicotinamide stimulates cell growth and inhibits hemoglobin synthesis in differentiating murine erythroleukemia cells // *Toxicol. In Vitro.* – 2007. – Vol. 21, № 8. – P. 1656–1662.
321. Ladino J., Bancalari E., Suguihara C. Ventilatory response to hypoxia during endotoxemia in young rats: role of nitric oxide // *Pediatr. Res.* – 2007. – Vol. 62, № 2. – P. 134–138.
322. Lauer T. et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98, № 22. – P. 12814–12819.
323. Le Minh K. et al. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 170, № 6. – P. 1954–1963.

324. Le Cras T.D., McMurtry I.F. Nitric oxide production in the hypoxic lung // *Am. J. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, № 4. – P. L575–L582.
325. Lee Y.D. et al. Melatonin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in sleep-deprived mice // *J. Pineal. Res.* – 2009. – Vol. 46, № 1. – P. 53–57.
326. Lehtolainen T., Rontved C., Pyorala S. Serum amyloid A and TNF- α in serum and milk during experimental endotoxin mastitis // *Vet. Res.* – 2004. – Vol. 35, № 6. – P. 651-659.
327. Lentz S.R. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 3, № 8. – P. 1646–1654.
328. Li Y. et al. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 71, № 4. – P. 684–694.
329. Liaw S.J. et al. Beneficial role of melatonin on microcirculation in endotoxin-induced gastropathy in rats: possible implication in nitrogen oxide reduction // *J. Formos. Med. Assoc.* – 2002. – Vol. 101, № 2. – P. 129–135.
330. Lissi E. et al. Effects of antioxidants and haemoglobin status on the t-butyl hydroperoxide-induced oxygen uptake by red blood cells // *Cell. Biochem. Funct.* – 1986. – Vol. 4, № 1. – P. 61–68.
331. Liu J. et al. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin // *Stroke.* – 2005. – Vol. 36, № 6. – P. 1264–1269.
332. Liu S. et al. Lipopolysaccharide treatment in vivo induced widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 196. – P. 1208–1213.
333. Liu X. et al. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 30. – P. 18709–18713.
334. Liu X. et al. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 78, № 19. – P. 2255–2264.
335. Liu Y.C. et al. Differential protection against oxidative stress and nitric oxide overproduction in cardiovascular and pulmonary systems by propofol during endotoxemia // *J. Biomed. Sci.* – 2009. – Vol. 15. – P. 16–18.
336. Lomnitski L. et al. The prophylactic effects of natural water-soluble antioxidant from spinach and apocynin in a rabbit model of lipopolysaccharide-induced endotoxemia // *Toxicol. Pathol.* – 2000. – Vol. 28, № 4. – P. 588–600.
337. Lopez Farre A., Casado S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction // *Hypertension.* – 2001. – Vol. 38. – P. 1400–1405.

338. Luo Y.H. et al. Pretreatment with erythropoietin reduces hepatic ischemia-reperfusion injury // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* – 2009. – Vol. 8, № 3. – P. 294–299.
339. Lutz C. et al. Aerosolized surfactant improves pulmonary function in endotoxin-induced lung injury // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 158, № 3. – P. 840–845.
340. Maier S. et al. Epoprostenol improves mucosal tissue oxygen tension in an acute endotoxaemic pig model // *Shock.* – 2009. – Vol. 31, № 1. – P. 104–110.
341. Malinski T., Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor // *Nature.* – 1992. – Vol. 358. – P. 676–677.
342. Mamone G., Sannolo N., Malorni A., Ferranti P. In vitro formation of S-nitrosohemoglobin in red cells by inducible nitric oxide synthase // *FEBS. Lett.* – 1999. – Vol. 462, № 3. – P. 241–245.
343. Marca M.C. et al. Changes in plasma hormone levels following lipopolysaccharide injection in rabbits // *Vet. J.* – 2009. – Vol. 180, № 2. – P. 213–220.
344. Marumo T., Schini-Kerth V.B., Fisslthaler B., Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF- κ B and expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle cells // *Circulation.* – 1997. – Vol. 96. – P. 2361–2367.
345. Matalon S. et al. Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, № 6. – P. 1184–1189.
346. Mateuszuk L. et al. Activation of nicotinamide N-methyltransferase and increased formation of 1-methylnicotinamide (MNA) in atherosclerosis // *Pharmacol. Rep.* – 2009. – Vol. 61, № 1. – P. 76–85.
347. Matsuda N. et al. Hemodynamic significance of histamine synthesis and histamine H1- and H2-receptor gene expression during endotoxemia // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 366, № 6. – P. 513–521.
348. Matsuzaki H. et al. Bikunin inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha induction in macrophages. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2004. – Vol. 11, № 6. – P. 1140–1147.
349. Matthews J.R. et al. Inhibition of NF- κ B DNA binding by nitric oxide // *Nucleic. Acid. Res.* – 1996. – Vol. 24. – P. 2236–2242.
350. May J.M., Qu Z.C., Xia L., Cobb C.E. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes // *Am. J. Physiol. Cell.* – 2000. – Vol. 279. – P. C1946–C1954.
351. Mayo J.C. et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and

- N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages // *J. Neuroimmunol.* – 2005. – Vol. 165, № 1–2. – P. 139–149.
352. McCann S.M. et al. The nitric oxide theory of aging revisited // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 1057. – P. 64–84.
353. McMahon T.J. et al. Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S-nitrosohemoglobin // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 22. – P. 16738–16745.
354. Mei Q. et al. Change of nitric oxide in experimental colitis and its inhibition by melatonin in vivo and in vitro // *Postgrad. Med. J.* – 2005. – Vol. 81, № 960. – P. 667–672.
355. Melo S.S. et al. Lipid peroxidation in nicotinamide-deficient and nicotinamide-supplemented rats // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* – 2000. – Vol. 70, № 6. – P. 321–323.
356. Melov S. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions // *The international journal of biochemistry and cell biology.* – 2002. – № 34. – P. 1395–1400.
357. Menon R.M. et al. Plasma and urine pharmacokinetics of niacin and its metabolites from an extended-release niacin formulation // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* – 2007. – Vol. 45, № 8. – P. 448–454.
358. Mesquita R. et al. Nitric oxide effects on human erythrocytes structural and functional properties an in vitro study // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2002. – Vol. 27, № 2. – P. 137–147.
359. Meyer M., Schreck R., Baeuerle P.A. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12. – P. 2005–2015.
360. Mik E.G., Johannes T., Ince C. Monitoring of renal venous pO₂ and kidney oxygen consumption in rats by a near-infrared phosphorescence lifetime technique // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2008. – Vol. 294, № 3. – P. 676–681.
361. Miller Y.I., Altamentova S.M., Shaklai N. Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: antioxidant role of haptoglobin // *Biochemistry.* – 1997. – Vol. 36, № 40. – P. 12189–12198.
362. Minetti M., Scorza G., Pietraforte D. Peroxynitrite induces long-lived tyrosyl radical(s) in oxyhemoglobin of red blood cells through a reaction involving CO₂ and a ferryl species // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 2078–2087.
363. Mirochnitchenko O. et al. Endotoxemia in transgenic mice overexpressing human glutathione peroxidases // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87. – P. 289–295.

364. Mishra D.P., Dhali A. Endotoxin induces luteal cell apoptosis through the mitochondrial pathway // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2007. – Vol. 83, № 1-2. – P. 75–88.
365. Mitra A. et al. Erythropoietin ameliorates renal dysfunction during endotoxaemia // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2007. – Vol. 22, № 8. – P. 2349–2353.
366. Mo J. et al. A new hypothesis about the relationship between free radical reactions and hemorheological properties in vivo // *Med. Hypotheses.* – 1993. – Vol. 41, № 6. – P. 516–520.
367. Mocini D. et al. Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in cardiovascular disease // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14, № 21. – P. 2278–2287.
368. Mogielnicki A. et al. N-methylnicotinamide failed to induce endothelial prostacyclin release in perfused rat hindquarters // *Pharmacol. Rep.* – 2008. – Vol. 60, № 6. – P. 1025–1029.
369. Moncada S., Higgs E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway // *New Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 329, № 27. – P. 2002–2012.
370. Moore K.J. et al. Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165, № 8. – P. 4272–4280.
371. Mujumdar V.S., Aru G.M., Tyagi S.C. Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function // *J. Cell. Biochem.* – 2001. – Vol. 82, № 3. – P. 491–500.
372. Murawska-Cialowicz E. et al. Melatonin decreases homocysteine level in blood of rats // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 59, № 4. – P. 717–729.
373. Mydlík M. et al. Vitamin E-coated dialyzer and antioxidant defense parameters: three-month study // *Semin. Nephrol.* – 2004. – Vol. 24, № 5. – P. 525–531.
374. Nangaku M. et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor in renal disease // *Nephron. Exp. Nephrol.* – 2008. – Vol. 110, № 1. – P. 1–7.
375. Nava E., Ralmer R.M., Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? // *Lancet.* – 1991. – Vol. 338. – P. 8782–8783.
376. Nogueras S. et al. Coupling of endothelial injury and repair: an analysis using an in vivo experimental model // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 294, № 2. – P. 708–713.
377. Obritsch M.D. et al. The role of vasopressin in vasodilatory septic shock // *Pharmacotherapy.* – 2004. – Vol. 24, № 8. – P. 1050–1063.
378. Ogetman Z. et al. The effect of aminoguanidine on blood and tissue lipid peroxidation in jaundiced rats with endotoxemia induced with LPS // *J. Invest. Surg.* – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 19–30.

379. Okamoto H. et al. Diurnal variations in human urinary excretion of nicotinamide catabolites: effects of stress on the metabolism of nicotinamide // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003. – Vol. 77, № 2. – P. 406–410.
380. Othman A.I., al Sharawy S., el-Missiry M.A. Role of melatonin in ameliorating lead induced haematotoxicity // *Pharmacol. Res.* – 2004. – Vol. 50, № 3. – P. 301–307.
381. Ozdemir D. et al. The effect of melatonin on endotoxemia-induced intestinal apoptosis and oxidative stress in infant rats // *Intensive Care Med.* – 2007. – Vol. 33, № 3. – P 511–516.
382. Padron J. et al. Enhancement of S-nitrosylation in glycosylated hemoglobin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol. 271, № 1. – P. 217-221.
383. Pagel P.S. et al. The mechanism of helium-induced preconditioning: a direct role for nitric oxide in rabbits // *Anesth. Analg.* – 2008. – Vol. 107, № 3. – P. 762–768.
384. Pandi-Perumal S.R. et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways // *Prog. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 85, № 3. – P. 335–353.
385. Paniker N.V., Srivastala S.K., Beutler E. Effect of glutathione reductase deficiency on the stimulation of hexose monophosphate shunt under oxidative stress // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1970. – Vol. 215. – P. 456–460.
386. Park G.Y. et al. Functional and genetic assessment of IFN-gamma receptor in patients with clinical tuberculosis // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2004. – Vol. 8, № 10. – P. 1221–1227.
387. Parodi O. et al. Plasma cysteine and glutathione are independent markers of postmethionine load endothelial dysfunction // *Clin. Biochem.* – 2007. – Vol. 40, № 3-4. – P. 188–193.
388. Parsa C.J. et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 20. – P. 20655–20662.
389. Patel N.S. et al. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo // *Kidney Int.* – 2004. – Vol. 66, № 3. – P. 983–989.
390. Patel R.P. Biochemical aspects of the reaction of hemoglobin and NO: Implications for Hb-based blood substitutes // *Free Radic. Biol. Med.* - 2000. – Vol. 28, № 10. – P. 1518–1525.
391. Patel R.P. et al. Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin effects on oxygen binding and transnitrosation // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 22. – P. 15487–15492.
392. Payabvash S. et al. Nitric oxide modulates glutathione synthesis during endotoxemia // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 41, № 12. – P. 1817–1828.

393. Pedoto A. et al. Hypotension during septic shock does not correlate with exhaled nitric oxide in anesthetized rat // *Shock*. – 2002. – Vol. 17, № 5. – P. 427–432.
394. Perera P.Y. et al. CD 14-dependent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 158. – P. 4422–4429.
395. Peristeris P. et al. N-Acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production // *Cell Immunol.* – 1992. – Vol. 140. – P. 390–399.
396. Perng W.C. et al. Effect of hyperbaric oxygen on endotoxin-induced lung injury in rats // *Shock*. – 2004. – Vol. 21, № 4. – P. 370-375.
397. Perutz M.F. Blood. Taking the pressure off // *Nature*. – 1996. – Vol. 380, № 6571. – P. 205-206.
398. Petros A., Bennett D., Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock // *Lancet*. – 1991. – Vol. 338. – P. 1557–1558.
399. Pietrzak L., Mogielnicki A., Buczko W. Nicotinamide and its metabolite N-methylnicotinamide increase skin vascular permeability in rats // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2009. – Vol. 34, № 3. – P. 380–384.
400. Privalle C., Talarico T., Keng T., DeAngelo J. Pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene: a nitric oxide scavenger with antioxidant activity for the treatment of nitric oxide induced shock // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 15. – P. 1507–1517.
401. Pronko T.P., Zinchuk V.V. Effect of nebivolol on blood oxygen transport indices and endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension // *Clin. Physiol. Funct. Imaging*. – 2009. – Vol. 29, №3. – P. 170–176.
402. Pu Q. et al. Beneficial effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitor (AZ-1) on endothelium in *Escherichia coli* endotoxin-induced shock // *Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 29, № 6. – P. 1181–1188.
403. Pumpo R. et al. The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production // *Am. J. Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 96, № 4. – P. 1183–1187.
404. Quezado Z.M.N. et al. Effects of L-NMMA and fluid loading on TnF-induced cardiovascular dysfunction in dogs // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 157. – P. 1397–1405.
405. Rafiee P. et al. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways // *Basic. Res. Cardiol.* – 2005. – Vol. 100, № 3. – P. 187–197.
406. Ramakrishnan S. et al. Biochemistry of homocysteine in health and diseases // *Indian. J. Biochem. Biophys.* – 2006. – Vol. 43, № 5. – P. 275–283.

407. Recinos P.F. et al. Controlled release of lipopolysaccharide in the subarachnoid space of rabbits induces chronic vasospasm in the absence of blood // *Surg. Neurol.* – 2006. – Vol. 66, № 5. – P. 463–469.
408. Reiter R.J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress // *J. Biomed. Sci.* – 2000. – Vol. 7, № 6. – P. 444–458.
409. Reiter R.J., Tan D.X. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – Vol. 58, № 1. – P. 10–19.
410. Rhee S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger // *Exp. Mol. Med.* – 1999. – Vol. 31. – P. 53–59.
411. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. – London, Elsevier, 1991. – 291 p.
412. Ridnour L.A. et al. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations // *Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 385, № 1. – P. 1–10.
413. Riederer M. et al. Adipose tissue as a source of nicotinamide N-methyltransferase and homocysteine // *Atherosclerosis.* – 2009. – Vol. 204, № 2. – P. 412–417.
414. Rivera C.M. et al. Time-course of the polycythemic response in normoxic and hypoxic mice with high blood oxygen affinity induced by cyanate administration // *Journal of Comparative Physiology.* – 1995. – Vol. 164, № 8. – P. 659–662.
415. Rojas C. et al. Endotoxin depletes ascorbate in the guinea pig heart. Protective effects of vitamins C and E against oxidative stress // *Life Sci.* – 1996. – Vol. 59. – P. 649–657.
416. Romanovsky A.A., Simons C.T., Kulchitsky V.A. "Biphasic" fevers often consist of more than two phases // *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P. 323–331.
417. Romanovsky A.A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions // *Front. Biosci.* – 2005. – Vol. 10. – P. 2193–2216.
418. Rudaya A.Y. et al. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 5. – P. 1244–1252.
419. Ruddock M.W., Hirst D.G. Metabolites of the radiosensitizer nicotinamide are unlikely to contribute to the degree of emesis observed with the parent drug // *Oncol. Res.* – 2007. – Vol. 16, № 12. – P. 569–574.
420. Ryan K.A. et al. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF- κ B and interleukin-8 expression // *Infection. Immunity.* – 2004. – Vol. 72, № 4. – P. 2123–2130.

421. Sahna E. et al. Melatonin protects myocardium from ischemia-reperfusion injury in hypertensive rats: role of myeloperoxidase activity // *Clin. Exp. Hypertens.* – 2008. – Vol. 30, № 7. – P. 673–681.
422. Sakaguchi S. Metabolic aspects of endotoxin as a model of septic shock-approached from oxidative stress // *Yakugaku Zasshi.* – 2004. – Vol. 124, № 2. – P. 69–87.
423. Sakaguchi S., Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2006. – Vol. 47, № 2. – P. 167–177.
424. Sakinis A., Jungersten L., Wennmalm A. An 18 oxygen inhalation method for determination of total body formation of nitric oxide in humans // *Clin. Physiol.* – 1999. – Vol. 19, № 6. – P. 504–509.
425. Saldeen T., Li D., Mehta J.L. Differential effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1999. – Vol. 34. – P. 1208–1215.
426. Samaja M. Blood gas transport at high altitude // *Respiration.* – 1997. – Vol. 64. – P. 422–428.
427. Samaja M., Crespi T., Guazzi M., Vandegriff K.D. Oxygen transport in blood at high altitude: role of the hemoglobin-oxygen affinity and impact of the phenomena related to hemoglobin allosterism and red cell function // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2003. – № 90. – P. 351–359.
428. Santhanam A.V. et al. In vivo stimulatory effect of erythropoietin on endothelial nitric oxide synthase in cerebral arteries // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 291, № 2. – P. 781–786.
429. Sasaki S. et al. Perfusion with lipopolysaccharide negative blood eliminates lipopolysaccharide induced lung injury // *ASAIO J.* – 2001. – Vol. 47, № 1. – P. 45–49.
430. Scabo C., Southan G.J., Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 12472–12476.
431. Schechter A.N., Gladwin M.T. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide // *New Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349, № 4. – P. 402–405.
432. Schettler V. et al. Review: the oxidant/antioxidant balance during regular low density lipoprotein apheresis // *Ther. Apher.* – 1999. – № 3. – P. 219–226.
433. Schmeding M. et al. Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver // *Eur. Surg. Res.* – 2007. – Vol. 39, № 3. – P. 189–197.
434. Schmidt W. et al. Influence of C1-esterase inhibitor on tissue oxygenation of jejunal mucosa during endotoxemia // *Int. J. Surg. Investig.* – 1999. – Vol. 1, № 4. – P. 277–283.

435. Schreck R. et al. Dithiocarbamates act as potent inhibitors of nuclear factor- κ B activation in intact cells // *J. Exp. Med.* – 1992b. – Vol. 175. – P. 1181–1194.
436. Schulz E. et al. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2008. – Vol. 10, № 6. – P. 1115–1126.
437. Schulze-Osthoff K. et al. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12. – P. 3095–3104.
438. Séguin C. et al. Priming effect of homocysteine on inducible vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells // *Biomed. Pharmacother.* – 2008. – Vol. 62, № 6. – P. 395–400.
439. Semmler A. et al. Methionine metabolism in an animal model of sepsis // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2008. – Vol. 46, № 10. – P. 1398–1402.
440. Sewerynek E., Melchiorri D., Chen L., Reiter R.J. Melatonin reduced both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro // *Free Radic. Biol. Med.* – 1995. – Vol. 19. – P. 903–909.
441. Shang Y. et al. Reduction of pulmonary inflammatory response by erythropoietin in a rat model of endotoxaemia // *Chin. Med. J. (Engl.)*. – 2009. – Vol. 122, № 7. – P. 834–838.
442. Sharples E.J. et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2004. – Vol. 15, № 8. – P. 2115–2124.
443. Shen K.P. et al. Eugenosedin-A amelioration of lipopolysaccharide-induced up-regulation of p38 MAPK, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 59, № 6. – P. 879–889.
444. Sheu J.R. et al. The antiplatelet activity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide is mediated through a nitric oxide/cyclic GMP pathway // *Eur. J. Haematol.* – 1999. – Vol. 62, № 5. – P. 317–326.
445. Sikora A. et al. Radical scavenging properties of nicotinamide and its metabolites // *Radiation Physics. and Chemistry.* – 2008. – Vol. 77. – P. 259–266.
446. Silva C.L. et al. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 151, № 2. – P. 195–205.
447. Singh J.P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a new therapeutic target for the modulation of nitric oxide and angiogenesis // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* – 2007. – Vol. 8, № 9. – P. 736–741.
448. Slomka M., Zieminska E., Lazarewicz J. Nicotinamide and 1-methylnicotinamide reduce homocysteine neurotoxicity in primary cultures of rat cerebellar granule cells // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)*. – 2008. – Vol. 68, № 1. – P. 1–9.

449. Soszynski D., Chelminiak M. Intracerebroventricular injection of neuronal and inducible nitric oxide synthase inhibitors attenuates fever due to LPS in rats // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 58, № 3. – P. 551–561.
450. Soubasi V. et al. Use of erythropoietin and its effects on blood lactate and 2,3-diphosphoglycerate in premature neonates // *Biol. Neonate.* – 2000. – Vol. 78, № 4. – P. 281–287.
451. Spreer A. et al. No neuroprotective effect of erythropoietin under clinical treatment conditions in a rabbit model of *Escherichia coli* meningitis // *Pediatr. Res.* – 2007. – Vol. 62, № 6. – P. 680–683.
452. Sprong R.C. et al. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 157. – P. 1283–1293.
453. Spronk P.E., Zandstra D.F., Ince C. Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation // *Crit. Care.* – 2004. – Vol. 8, № 6. – P. 462–468.
454. Squadrito F. et al. Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 127, № 2. – P. 482–488.
455. Squadrito G.L., Pry W.A. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide // *Chem. Biol. Interact.* – 1995. – Vol. 96. – P. 203–206.
456. Srisook K., Cha Y.N. Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharide // *Biochem. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 68, № 9. – P. 1709–1720.
457. Staal F.G., Roederer M., Herzenberg L.A. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor-kB and transcription of human immunodeficiency virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87. – P. 9943–9947.
458. Stamler J.S. S-Nitrosothiols in the blood. Roles, amounts, and methods of analysis // *Circ. Res.* – 2004. – № 94. – P. 414–417.
459. Stepuro I., Chaikovskaya N., Piletskaya T., Solodunov A. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin // *Pol. J. Pharmacol.* – 1994. – Vol. 46. – P. 601–607.
460. Suliman H.B., Ali M., Piantadosi C.A. Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia // *Blood.* – 2004. – Vol. 104, № 1. – P. 43–50.
461. Suliman H.B. et al. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – Vol. 64, № 2. – P. 279–288.
462. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity // *Toxicol. Lett.* – 2003. – Vol. 140–141. – P. 105–112.
463. Szczepański M. et al. Erythropoietin prevents oxidative stress and lipid peroxidation process in human umbilical vein endothelial cells induced by

- tumor necrosis factor alpha // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2006. – Vol. 21, № 126. – P. 534–539.
464. Takahashi Y. et al. Nitrosyl hemoglobin in blood of normoxic and hypoxic sheep during nitric oxide inhalation // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 43. – P. 349–357.
465. Takano H. et al. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits // *Circulation.* – 1998. – Vol. 98, № 5. – P. 441–449.
466. Tamura E.K. et al. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells / *J. Pineal. Res.* – 2009. – Vol. 46, № 3. – P. 268–274.
467. Tan D.X. et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? // *J. Pineal. Res.* – 2007. – Vol. 42, № 1. – P. 28–42.
468. Tang H.X., Fan X.M. Effect of dexamethasone, aminoguanidin, amrinone on oxygen utilization in endotoxin shock rabbits // *Zhonghua Er. Ke Za Zhi.* – 2003. – Vol. 41, № 4. – P. 282–285.
469. Tannenbaum S. Nitrate and nitrite: origin in humans // *Science.* – 1994. – № 205. – P. 1333–1335.
470. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite // *Circ. Res.* – 2001. – Vol. 89, № 3. – P. 224–236.
471. Tascilar O. et al. Protective effects of erythropoietin against acute lung injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis // *World. J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13, № 46. – P. 6172–6182.
472. Taylor Robinson A.W. The sequestration hypothesis: an explanation for the sensitivity of malaria parasites to nitric oxide-mediated immune effector function in vivo // *Medical. Hypotheses.* – 2000. – Vol. 54, № 4. – P. 638–641.
473. Tsai C.C. et al. The antipyretic effects of baicalin in lipopolysaccharide-evoked fever in rabbits // *Neuropharmacology.* – 2006. – Vol. 51, № 4. – P. 709–717.
474. Tsao C.M. et al. Effects of midazolam on organ dysfunction in rats with endotoxemia induced by lipopolysaccharide // *Acta Anaesthesiol. Taiwan.* – 2009. – Vol. 47, № 1. – P. 10–16.
475. Tunctan B. et al. Nitric oxide reverses endotoxin-induced inflammatory hyperalgesia via inhibition of prostacyclin production in mice // *Pharmacol. Res.* – 2006. – Vol. 53, № 2. – P. 177–192.
476. Tyagi N. et al. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 6. – P. 2649–2656.
477. Tzanela M., Orfanos S., McCormick J.R. Endotoxin augments hemodynamic and metabolic effects of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) in rabbits. // *In Vivo.* – 2007. – Vol. 21, № 1. – P. 81–87.

478. Valenca S.S. et al. Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide // *Environ. Res.* – 2008. – Vol. 108, № 2. – P. 199–204.
479. Vallance P. et al. Direct measurement of nitric oxide in human beings // *Lancet.* – 1995. – № 345. – P. 153–154.
480. Vargiu C. et al. Oxygen regulation of rat hepatocyte iNOS gene expression // *J. of Hepatology.* – 2000. – Vol. 32, № 4. – P. 567–573.
481. Vaughn M.W., Huang K.T., Kuo L., Liao J.C. Erythrocyte consumption of nitric oxide: competition experiment and model analysis // *Nitric Oxide.* – 2001. – Vol. 5, № 1. – P. 18–31.
482. Victor V.M., Guayerbas N., Puerto M., De la Fuente M. Changes in the ascorbic acid levels of peritoneal lymphocytes and macrophages of mice with endotoxin-induced oxidative stress // *Free Radic. Res.* – 2001. – Vol. 35, № 6. – P. 907–916.
483. Victor V.M. et al. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – Vol. 11, № 24. – P. 3141–3158.
484. Viridis A. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of iNOS and oxidative stress // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – Vol. 312, № 3. – P. 945–953.
485. Vitvitsky V. et al. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis // *Redox Rep.* – 2003. – Vol. 8, № 1. – P. 57–63.
486. Vodovotz Y. et al. Regulation of transforming growth factor beta1 by nitric oxide // *Cancer. Res.* – 1999. – Vol. 59, № 9. – P. 2142–2149.
487. Wadsworth T., McDonald T.I., Koop D.R. Effects of Ginkgo biloba extract (Egb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 62. – P. 963–974.
488. Wang C. et al. Gender-specificity of delayed preconditioning by isoflurane in rabbits: potential role of endothelial nitric oxide synthase // *Anesth. Analg.* – 2006. – Vol. 103, № 2. – P. 274–280.
489. Wang H. et al. Melatonin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice // *Toxicology.* – 2007. – Vol. 237, № 1–3. – P. 49–57.
490. Wang L., Fan X.M., Tang H.X. Effects of aminoguanidine in different dosages on renal function in endotoxin induced rabbits shock model // *Zhonghua Er. Ke. Za. Zhi.* – 2004. – Vol. 42, № 3. – P. 206–209.
491. Wang W. et al. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – Vol. 284. – P. 532–537.
492. Wang X. et al. Lipopolysaccharide suppresses albumin expression by activating NF-kappa B in rat hepatocytes // *J. Surg. Res.* – 2004. – Vol. 122, № 2. – P. 274–279.

493. Wang X., Quinn P.J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification // *Prog. Lipid. Res.* – 2010. – Vol. 49, № 2. – P. 97–107.
494. Watała C. et al. Anti-diabetic effects of 1-methylnicotinamide (MNA) in streptozocin-induced diabetes in rats // *Pharmacol. Rep.* – 2009. – Vol. 61, № 1. – P. 86–98.
495. Wei X.Q. et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase // *Nature.* – 1995. – Vol. 375. – P. 408–411.
496. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function // *Curr. Drug. Metab.* – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 27–36.
497. Welch G.N. et al. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2 // *Proc. Assoc. Am. Physicians.* – 1998. – Vol. 110, № 1. – P. 22–31.
498. Wennmalm A. et al. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans // *Circ. Res.* – 1993. – Vol. 73. – P. 1121–1127.
499. Westenbrink B.D. et al. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization // *Eur. Heart J.* – 2007. – Vol. 28, № 16. – P. 2018–2027.
500. Whorton A.R., Simonds D.B., Piantadosi C.A. Regulation of nitric oxide synthesis by oxygen in vascular endothelial cells // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 16. – P. 1161–1166.
501. Wideman R.F., Chapman M.E., Wang W., Erf G.F. Immune modulation of the pulmonary hypertensive response to bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in broilers // *Poult. Sci.* – 2004. – Vol. 83, № 4. – P. 624–637.
502. Wiel E. et al. Effect of L-arginine on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxin shock // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol. 89, № 5. – P. 1811–1818.
503. Wiel E. et al. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxic shock // *Intensive Care Med.* – 2004. – Vol. 30, № 8. – P. 1652–1659.
504. Wildhirt S.M. et al. Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Vol. 43, № 3. – P. 698–711.
505. Wingler K. et al. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 31, № 11. – P. 1456–1464.
506. Winiarska K. et al. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits // *J. Pineal. Res.* – 2006. – Vol. 40, № 2. – P. 168–176.

507. Winslow R.M. Targeted O₂ delivery by low-p50 hemoglobin: a new basis for hemoglobin-based oxygen carriers // *Artif. Cells. Blood. Substit. Immobil. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 33, № 1. – P. 1–12.
508. Wozniacka A. et al. Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea: a pilot study // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2005. – Vol. 30, № 6. – P. 632–635.
509. Wu H. et al. Pretreatment with recombinant human erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2006. – Vol. 29, № 6. – P. 902–907.
510. Xu D.X. et al. Effects of low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on LPS-induced intra-uterine fetal death and preterm labor // *Toxicology.* – 2007. – Vol. 234, № 3. – P. 167–175.
511. Xu D.X. et al. Maternally administered melatonin differentially regulates lipopolysaccharide-induced proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in maternal serum, amniotic fluid, fetal liver, and fetal brain // *J. Pineal. Res.* – 2007. – Vol. 43, № 1. – P. 74–79.
512. Yaylak F. et al. Liver tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and lipid peroxidation in experimental hepatic ischemia reperfusion injury stimulated with lipopolysaccharide: the role of aminoguanidine // *J. Surg. Res.* – 2008. – Vol. 148, № 2. – P. 214–223.
513. Yazihan N. et al. Erythropoietin reduces lipopolysaccharide-induced cell Damage and midkine secretion in U937 human histiocytic lymphoma cells // *Adv. Ther.* – 2008. – Vol. 25, № 5. – P. 502–514.
514. Yeh L.H., Alayash A.I. Redox side reactions of haemoglobin and cell signalling mechanisms // *J. Intern. Med.* – 2003. - Vol. 253, № 5. – P. 518–526.
515. Yerer M.B. et al. Lipid peroxidation and deformability of red blood cells in experimental sepsis in rats: The protective effects of melatonin // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2004. – Vol. 30, № 2. – P. 77–82.
516. Yonetani T., Tsuneshige A., Zhou Y., Chen X. Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of alpha-Nitrosyl hemoglobin. A novel oxygen carrier having no-assisted allosteric functions // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 20323–20333.
517. Zhang C., Walker L.M., Hinson J.A., Mayeux P.R. Oxidant stress in rat liver after lipopolysaccharide administration: effect of inducible nitric-oxide synthase inhibition // *Pharmacol. Exp. Ther.* – 2000. – Vol. 293, № 3. – P. 968–972.
518. Zhang H. et al. Protective effects of N – acetyl-L-cysteine in endotoxemia // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 266. – P. 1746–1754.
519. Zhang J.Y. et al. Inhibitory effect of melatonin on the expression of nuclear factor-KappaB during acute lung injury in rats // *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* – 2008. – Vol. 20, № 10. – P. 604–606.

520. Zhang Q. et al. Effects of homocysteine on murine splenic B lymphocyte proliferation and its signal transduction mechanism // *Cardiovasc. Res.* – 2001. – Vol. 52, № 2. – P. 328–336.
521. Zhang Y. et al. Human erythrocyte membrane band 3 protein influences hemoglobin cooperativity // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 41. – P. 39565–39571.
522. Zhen J. et al. Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species // *Am. J. Hypertens.* – 2008. – Vol. 21, № 1. – P. 28–34.
523. Zhong L.Y. et al. Protective effects of melatonin against the damages of neuroendocrine-immune induced by lipopolysaccharide in diabetic rats // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2009. – Vol. 117, № 9. – P. 463–469.
524. Zhou S.S. et al. Nicotinamide overload may play a role in the development of type 2 diabetes // *World. J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 15, № 45. – P. 5674–5684.
525. Zinchuk V.V. High hemoglobin affinity to oxygen and its relationships with lipid peroxidation during fever // *J. Physiol. Biochem.* – 1999. – Vol. 55, № 4. – P. 301–308.
526. Zinchuk V.V., Borisiuk M.V. Fe²⁺-Initiated chemiluminescence in rats with high hemoglobin-oxygen affinity during fever // *J. Physiol. and Pharmac.* – 1997. – Vol. 48, № 1. – P. 113–119.
527. Zinchuk V., Borisiuk V. The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats // *Respiration Physiology.* – 1998. – Vol. 113, № 1. – P. 39–45.
528. Zinchuk V.V., Dorokhina L.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway // *Nitric Oxide.* – 2002. – Vol. 6, № 1. – P. 29–34.
529. Zinchuk V.V., Khodosovsky M.N., Maslakov D.A. Influence of different oxygen modes on the blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant status during hepatic ischemia/reperfusion // *Physiol. Res.* – 2003. – Vol. 52, № 5. – P. 533–544.

Научное издание

Глебов Андрей Николаевич
Шульга Екатерина Владимировна
Зинчук Виктор Владимирович

**РОЛЬ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ КРОВИ
В РАЗВИТИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ИНДУЦИРОВАННОГО
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ**

Монография

Ответственный за выпуск В.В. Зинчук

Компьютерная верстка С.В. Петрушина
Корректор Л. С. Засельская

Подписано в печать 29.06.2011.

Формат 60x84/16. Бумага офсетная.

Гарнитура Таймс. Ризография.

Усл. печ. л. 12,55. Уч.-изд. л. 9,64. Тираж 100 экз. Заказ 106.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет».
ЛИ № 02330/0548511 от 16.06.2009. Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.