

ФИЗИОЛОГИЯ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ СИСТЕМ

ЭФФЕКТ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ
НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ
И РЕДОКС-СТАТУС ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

© В. В. Зинчук, М. Э. Фираго, И. Э. Гуляй

Гродненский государственный медицинский университет,
Гродно, Беларусь
E-mail: zinchuk@grsmu.by

Изучен эффект газотрансмиттеров на кислородсвязывающие свойства крови и редокс-статус при введении липополисахарида (в дозе 5 мг/кг) в течение 3 суток. В экспериментальных группах осуществлялось внутрибрюшинное введение донора сероводорода (NaHS в дозе 5 мг/кг), ингибитора цистатионин-γ-лиазы (D,L-пропаргилглицин в дозе 50 мг/кг) и L-аргинина (в дозе 100 мг/кг). Инъекция донора сероводорода или L-аргинина в данной модели уменьшает нарушение редокс-состояния. Газотрансмиттеры (донор сероводорода и L-аргинин) оказывают влияние на кислородсвязывающие свойства крови, в частности повышают сродство гемоглобина к кислороду, увеличивают парциальное напряжение кислорода и степень оксигенации крови. При применении ингибитора цистатионин-γ-лиазы этого не наблюдается. Модификация кислородсвязывающих свойств крови, осуществляемая при участии NO и H₂S, имеет значение для кислородного обеспечения организма и механизмов формирования редокс-системы при введении липополисахарида.

Ключевые слова: липополисахарид, редокс-статус, кровь, газотрансмиттеры, монооксид азота, сероводород.

Рос. физiol. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 103. № 8. С. 000—000. 2017

V. V. Zinchuk, M. E. Firago, I. E. Hulyai. GASEOUS TRANSMITTERS EFFECT ON OXYGEN-BINDING PROPERTIES OF BLOOD AND REDOX STATUS INDUCED BY ADMINISTRATION OF LIPOPOLYSACCHARIDE. Department of Normal Physiology, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus, e-mail: zinchuk@grsmu.by.

Gaseous transmitters effect on oxygen-binding properties of blood and redox status induced by administration of lipopolysaccharide (5 mg/kg) for three days was studied. In experimental groups were made intraperitoneal administrations of hydrogen sulfide donor (NaHS 5 mg/kg), cystathione γ-lyase inhibitor (D,L-propargylglycine 50 mg/kg) and L-arginine (100 mg/kg). Hydrogen sulfide donor or L-arginine injections decreased redox status in this model. Gaseous transmitters (donor hydrogen sulfide and L-arginine) affect the oxygen-binding properties of blood, in particular, increase hemoglobin affinity for oxygen, increase the partial oxygen tension and the degree of oxygenation blood. During cystathione γ-lyase inhibitor administration, this effect was not observed. Modification of oxygen-binding properties of blood, carried out with the participation of NO and H₂S, is important for the oxygen supply of the body and the mechanisms for the formation of the redox system when administered lipopolysaccharide.

Key words: lipopolysaccharide, redox status, blood, gaseous transmitters, nitrogen monoxide, hydrogen sulfide.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 103. N 8. P. 00—00. 2017

Развитие многих патологических состояний сопровождается нарушением редокс-зависимых процессов клеточной регуляции [15]. Важная роль в образовании активных форм кислорода (АФК) отводится митохондриям, в которых их продукция является побочным процессом базового метаболизма [1]. В митохондриях, и в целом в организме, имеются мощные антиоксидантные механизмы, препятствующие избыточному образованию АФК [9]. Однако их ресурсы не всегда являются достаточными для поддержания редокс-статуса. В частности, при гипероксии чрезмерная активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) способствует нарушению согласованности работы важнейших антиоксидантных ферментов, при которой на фоне активации супероксиддисмутазы наблюдается снижение активности каталазы и содержания восстановленного глутатиона, что приводит к повышенной продукции АФК и нарушению редокс-состояния, т. е. развитию окислительного стресса, который является компонентом патогенеза многих заболеваний [2]. В связи с этим важная роль в антиоксидантной защите отводится механизмам транспорта кислорода [8], в частности, изменению сродства гемоглобина к кислороду (СГК), и регулированию его потока в ткани в соответствии с потребностью [3].

К факторам, ведущим к развитию окислительного стресса относится липополисахарид, источником которого являются грамотрицательные бактерии, большая часть из которых относится к числу условно-патогенных микроорганизмов [12]. Известно, что нарушение редокс-состояния, индуцированное однократным введением липополисахарида (ЛПС), характеризуется увеличением активности ПОЛ и изменением кислородсвязывающих свойств крови [4]. Газотрансмиттеры, такие как сероводород (H_2S),monoоксид азота (NO) и monoоксид углерода представляют собой особую группу газообразных молекул, осуществляющих межклеточную и внутриклеточную регуляцию различных функций организма [10]. Эффекты системы газотрансмиттеров (в частности H_2S и NO) важны для формирования редокс-статуса [23], а также для регуляции транспорта кислорода [27]. Однако многие аспекты их влияний на данные процессы, и в частности, при введении ЛПС изучены недостаточно.

Цель данной работы — изучение эффекта газотрансмиттеров на кислородсвязывающие свойства крови и редокс-статус при введении липополисахарида в течение 3 суток.

МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на лабораторных крысах-самцах ($n = 81$) массой 200—250 г, которые содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, при искусственном освещении: 12 (день) / 12 (ночь) ч. Исследования осуществлялись с разрешения Комиссии по биомедицинской этике.

Все животные были разделены на 8 групп. Введение веществ осуществляли путем внутрибрюшинной инъекции (в объеме 1 мл) в течение 3 суток с интервалом 24 ч. Животным 1-й (контрольной) группы вводили стерильный 0.9 % раствор NaCl. 3-я группа животных получала только инъекцию NaHS. Во 2-й, 4—8-й группах моделировали нарушение редокс-состояния (окисли-

тельный стресс) путем введения ЛПС *Escherichia coli* (Serotype O111:B4) в дозе 5 мг/кг. Коррекцию проводили с помощью исходного субстрата синтеза оксида азота L-аргинина в дозе 100 мг/кг (4-я группа), донора H₂S — гидросульфид натрия (NaHS) в дозе 5 мг/кг (5-я группа), ингибитора цистатионин-γ-лиазы D,L-пропаргилглицина (PAG) в дозе 50 мг/кг (6-я группа), а также комбинаций данных соединений: NaHS и L-аргинин (7-я группа), PAG и L-аргинин (8-я группа). В условиях анальгезии (50 мг/кг тиопентала натрия интраперitoneально) через 12 ч после последней инъекции ЛПС осуществляли забор крови (8 мл) из правого предсердия для оценки кислородотранспортная функция крови КТФ крови, показателей активности ПОЛ и факторов антиоксидантной защиты, содержания NO и H₂S.

Показатели активности ПОЛ определяли в эритроцитарной массе и плазме крови. Содержание диеновых (ДК) и триеновых (ТК) конъюгатов оценивали по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра, характерного для конъюгированных структур гидроперекисей липидов при длине волны 233 и 278 нм на спектрофлуориметре «Solar» CM2203 [6]. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по интенсивности окраски триметинового комплекса, образованного в реакции с 2'-тиобарбитуревой кислотой при температуре 100 °C, на спектрофотометре «Solar» PV1251C при длине волны 540 нм [6]. Активность каталазы в эритроцитарной массе регистрировали по количеству окрашенного продукта в реакции с пероксид водородом и молибденовокислым аммонием, имеющим наименьшее светопоглощение при длине волны 410 нм на спектрофотометре «Solar» PV1251C [7]. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах определяли спектрофотометрически с добавлением реагента Эллмана при длине волны 412 нм [25]. Концентрацию в плазме α-токоферола и ретинола оценивали по методу S. T. Taylor, основанному на определении интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 325 и эмиссии 470 нм для α-токоферола, а также возбуждения 286 и эмиссии 380 нм для ретинола на спектрофлуориметре «Solar» CM2203 [29]. Содержание церулоплазмина в плазме крови определяли спектрофотометрически методом Равина при длине волны 530 нм [6]. Продукцию NO оценивали спектрофотометрически по суммарному содержанию нитрат/нитритов в плазме крови с использованием реактива Грисса на спектрофотометре «Solar» PV1251C при длине волны 540 нм [13]. Концентрацию H₂S в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции между сульфид-анионом и кислым раствором п-фенилендиамина в присутствии хлорного железа при длине волны 670 нм [23].

Оценку показателей КТФ и кислотно-основного состояния в исследуемых образцах крови проводили при температуре 37 °C на микроанализаторе Synthesis-15 «Instrumentation Laboratory». Определяли парциальное напряжение кислорода (pO₂), степень оксигенации (SO₂), количество гемоглобина (Hb), метгемоглобина (MetHb). Оценивали параметры кислотно-основного состояния: pH крови, парциальное напряжение углекислого газа (pCO₂), концентрацию бикарбоната (HCO₃⁻) и общей углекислоты плазмы (TCO₂), реальный и стандартный недостаток/избыток буферных оснований (ABE/SBE), стандартный бикарбонат (SBC). По показателю p50 (pO₂ крови при 50%-ном насыщении ее кислородом) определяли СГК при температуре 37 °C, pH 7.4, pCO₂ 40 мм рт. ст. (p50_{станд}), а затем по формуле Severinghaus J. W. рассчитывали p50 при реальных значениях этих показателей (p50_{реал}) [26]. На основании полученных данных по уравнению Хилла определяли положение кривой диссоциации оксигемоглобина.

Полученные результаты обрабатывали с применением пакетов прикладных программ MS Excel и Statistica. Результаты представлены в виде медианы с интерквартильным размахом (25—75 %). С учетом малых размеров выборки, а также отсутствия нормального распределения в группах, статистическую значимость результатов оценивали методом непараметрической статистики для независимых выборок — критерий Манна—Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение ЛПС в течение 3 суток характеризуется активацией ПОЛ (рис. 1). В эритроцитах и плазме крови наблюдается увеличение концентрации МДА на 154.2 ($p < 0.01$) и 68.0 % ($p < 0.01$), повышение уровня ДК на 57.2 ($p < 0.01$) и 137.0 % ($p < 0.01$), ТК на 75.5 ($p < 0.01$) и 200.0 % ($p < 0.01$) соответственно, в сравнении с контролем. Одновременно с увеличением активности ПОЛ отмечается снижение уровня ферментативного и неферментативного компонентов антиоксидантной системы (табл. 1). В эритроцитарной массе наблюдается снижение активности каталазы на 15.6 ($p < 0.01$) и концентрации восстановленного глутатиона на 33.5 % ($p < 0.01$). В плазме крови уменьшается содержание церулоплазмина на 42.6 ($p < 0.01$), α -токоферола на 46.6 ($p < 0.01$) и ретинола на 52.4 % ($p < 0.01$).

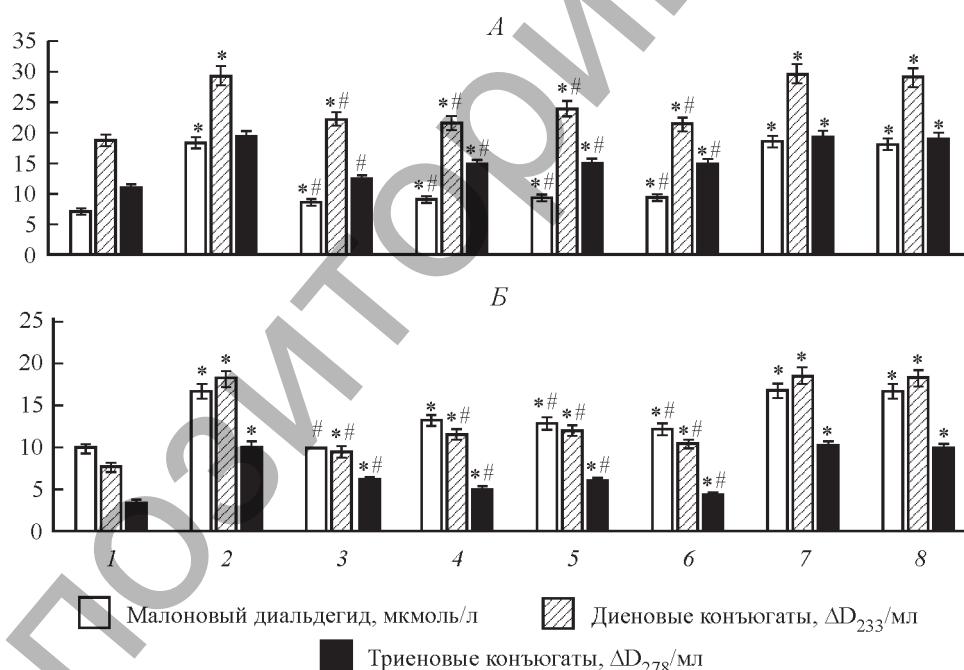


Рис. 1. Изменение параметров перекисного окисления липидов в эритроцитарной массе (A) и плазме крови (Б) крыс при введении ЛПС, в условиях коррекции системы газотрансмиттеров.

1 — контроль, 2 — ЛПС, 3 — NaHS, 4 — ЛПС+L-аргинин, 5 — ЛПС+NaHS, 6 — ЛПС+L-аргинин+NaHS, 7 — ЛПС+PAG, 8 — ЛПС+L-аргинин+PAG. Достоверные отличия: * по отношению к контролю, # по отношению к группе, получавшей только липополисахарид ($p < 0.05$).

Таблица 1
Изменение антиоксидантной системы в крови у крыс при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, в условиях коррекции системы газотрансмиттеров

Показатель	Контроль	ЛПС			ЛПС + L-аргинин			ЛПС + NaHS			ЛПС + L-аргинин + PAG			ЛПС + L-аргинин + PAG		
		n	7	9	12	11	11	11	11	11	11	11	11	9		
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /мин/г НВ	(15,5—16,3) 64,1	16 (42,4—43,1)*	13,5 (13,2—13,5)* 42,6	15,3 (14,7—15,8)**# 51,9	14,2 (13,9—14,6)**# 55,7	14,9 (14,1—15,6)**# 52,2	15,9 (15,2—16,6)**# 52,4	13,5 (12,7—14,6)* 42,5	13,6 (13,2—13,8)* 42,6							
Восстановленный глутатион, мкмоль/г НВ	(63,6—64,7)															
α-токоферол, мкмоль/л	20,4 (18,3—21,4)	10,9 (10—11,7)*	13,9 (12,4—15,6)**#	16,7 (16,3—17,3)**#	14,4 (13,6—15,1)**#	13,5 (12,5—14,3)**#	10,4 (10,0—11,0)*	10,7 (10,7—11,0)*								
Ретинол, мкмоль/л	2,1 (1,8—2,4)	1,0 (0,9—1,1)*	1,6 (1,2—1,9)**#	1,9 (1,8—2,0)**#	1,4 (1,1—1,7)**#	1,7 (1,5—1,8)**#	1,0 (0,8—1,2)*	1,1 (1,1—1,2)*								
Церулоплазмин, мг/л	385 (331—439)	221 (197—249)*	354 (341—380)*	364 (345—398)*	378 (343—414)*	497 (433—534)*#	219 (210—225)*	230 (213—253)*								

Примечание. Различия достоверны: * по отношению к контролю, # по отношению к группе, получавшей только линополисахарид.

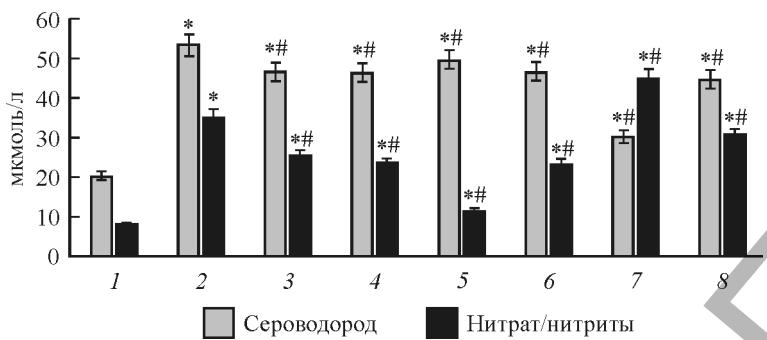


Рис. 2. Изменение концентрации сероводорода и нитрат/нитритов у крыс при введении ЛПС в условиях коррекции системы газотрансмиттеров.

1 — контроль, 2 — ЛПС, 3 — NaHS, 4 — ЛПС+L-аргинин, 5 — ЛПС+NaHS, 6 — ЛПС+L-аргинин+NaHS, 7 — ЛПС+PAG, 8 — ЛПС+L-аргинин+PAG. Достоверные отличия: * по отношению к контролю, # по отношению к группе, получавшей только липополисахарид ($p < 0.05$).

Введение L-аргинина или донора сероводорода характеризуется снижением активности ПОЛ (рис. 1). Так, введение NaHS приводит к уменьшению в эритроцитах и плазме крови содержания МДА на 49 ($p < 0.01$) и 2.3 % ($p < 0.01$), уровня ДК на 18.4 ($p < 0.01$) и 34.6 % ($p < 0.01$), ТК 22.3 ($p < 0.01$) и 41.2 % ($p < 0.01$) соответственно, по сравнению с группой, получавшей только липополисахаридный эндотоксин. В условиях данной модели введения ЛПС применение L-аргинина сопровождается снижением концентрации МДА на 50.8 ($p < 0.01$) в эритроцитах и 20.5 % ($p < 0.01$) в плазме крови. При этом отмечается уменьшение уровня ДК и ТК на 26.5 ($p < 0.01$) и 22.8 % ($p < 0.01$) в эритроцитах, на 36.8 ($p < 0.01$) и 51 % ($p < 0.01$) в плазме крови соответственно. При сочетанном применении L-аргинина и NaHS более выраженное снижение активности ПОЛ не наблюдается. Введение PAG, а также комбинация его с L-аргинином не приводит к уменьшению нарушений редокс-системы по отношению к группе, получавшей только ЛПС.

Применение NaHS и L-аргинина характеризуется повышением антиоксидантного потенциала крови (табл. 1). Их введение сопровождается ростом активности каталазы в эритроцитах на 10.4 ($p < 0.01$) и 13.3 % ($p < 0.01$), концентрации восстановленного глутатиона на 22.5 ($p < 0.01$) и 21.8 % ($p < 0.01$). В плазме крови содержание церулоплазмина увеличивается на 71.0 ($p < 0.01$) и 60.2 % ($p < 0.01$), α -токоферола на 32.1 ($p < 0.01$) и 27.5 % ($p < 0.01$), ретинола на 40.0 ($p < 0.05$) и 60.0 % ($p < 0.01$) соответственно по отношению к группе, получавшей один ЛПС. Схожая динамика наблюдается и у крыс после инъекции ЛПС, L-аргинин в комбинации с донором сероводорода. Активность антиоксидантной защиты организма при введении PAG, а также его сочетание с L-аргинином существенно не изменяется.

В условиях данной модели нарушения редокс-состояния сопровождается увеличение концентрации H_2S и нитрат/нитритов в плазме крови на 160.8 ($p < 0.01$) и 333.9 % ($p < 0.01$) (рис. 2). При введении NaHS наблюдается снижение концентрации H_2S на 6.9 ($p < 0.01$) и содержания нитрат/нитритов на 32.9 % ($p < 0.01$), по сравнению с группой животных, которым вводили только эндотоксин. Подобные изменения наблюдаются и в группах, получавших после инъекции ЛПС только L-аргинин или его комбинацию с NaHS.

Существенных изменений основных показателей кислотно-основного состояния крови в экспериментальных группах не наблюдается за исключением

Таблица 2
Изменение кислородтранспортной функции крови при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, в условиях коррекции системы газотрансмиттеров

№	Контроль	ЛПС	NaHS	ЛПС + L-аргинин	ЛПС + NaHS	ЛПС + NaHS + L-аргинин	ЛПС + PAG	ЛПС + PAG + L-аргинин
n	7	9	12	11	11	11	11	9
p50 _{реак.} , мм рт. ст.	39,5 (39,2—39,8)	37,9 (37,4—38,0)*	33,8 (32,4—34,9)*#	33,1 (32,3—35,4)*#	33,6 (33,6—34,9)*#	33,8 (31,7—34,8)*#	27,8 (25,6—29,7)*#	31,1 (30,3—32,2)*#
p50 _{реак.} , мм рт. ст.	36,5 (34,5—37,6)	35,9 (35—36,4)	31,7 (29,8—33,5)*#	31,8 (30,5—33,3)*#	32,3 (31,4—34,6)*#	31,6 (29,7—33)*#	23,9 (21,2—26,0)*#	29,2 (28,6—30,1)*#
SO ₂ , %	37,4 (34—39,8)	32,6 (31,7—33,6)*	36,2 (35,2—37)*#	34,5 (33,8—35,3)*#	35,2 (34,3—36,4)*#	35,1 (34,6—35,7)*#	25,6 (24—26,4)*#	27 (26,5—27,3)*#
МethB, %	0,3 (0—0,5)	1,2 (1,1—1,4)*	1,1 (1—1,6)*	2,3 (1,9—2,8)*#	2,4 (2,2—2,6)*#	2,1 (1,9—2,5)*#	2,4 (2,1—2,7)*#	2,4 (2,3—2,5)*#
p50 _{реак.} , мм рт. ст.	31,3 (30—32)	28,8 (28—30)*	32,8 (32—34)*#	29,6 (28—30)	28,6 (28—29)*	30,3 (29—32)*	25,2 (24—26)*#	27,2 (27—28)*#
pH, ед.	7,37 (7,314—7,366)	7,349 (7,334—7,364)	7,343 (7,311—7,357)	7,354 (7,314—7,385)	7,354 (7,321—7,390)	7,343 (7,308—7,378)	7,283 (7,254—7,333)*#	7,346 (7,330—7,356)
pCO ₂ , мм рт. ст.	47,3 (42,2—51,9)	49,2 (46,9—50,7)	47,9 (42,4—53,0)	45,9 (44,4—47,7)*#	45,7 (41,1—50,4)	43,7 (41,3—46,9)*#	50,2 (43,6—56,2)	51,7 (47,3—55,9)
HCO ₃ ⁻ , ммол/л	34,5 (31,8—37,1)	29,3 (27—29,3)*	33,8 (30,8—36,2)*	32,9 (29,8—35,5)*#	32,3 (29,4—37)	31,4 (29—35)	26,8 (22,9—29,2)*	28 (26,9—29,4)*
TCO ₂ , ммол/л	36,5 (33,3—39,3)	31,2 (28,9—31,3)*	35,2 (32,7—38,1)*#	34,6 (31,7—37,5)*#	33,9 (31,1—38,9)	33,1 (30,9—36,9)	28,7 (24,8—31,2)*	29,8 (28,5—31,4)*
ABE, ммол/л	7,4 (6,4—8,8)	3,2 (1,4—3,2)*	8,4 (5,8—11,6)*#	6,3 (3,2—9,5)*#	4,9 (2,9—5,4)	5,4 (2,4—8,5)	—1,2 (—6,1—2,3)*#	1,5 (0,3—2,6)*
SBE, ммол/л	8,4 (6,8—10,9)	3,3 (1,3—3,1)*	9,4 (6,2—12,8)*#	6,9 (2,9—10,2)*#	5,3 (2,7—5,8)	6,1 (2,6—9,2)	0,9 (—5,8—3,1)*#	1,8 (0,2—3,6)*
SBC, ммол/л	28,6 (28,1—30,6)	28,4 (26,5—29,6)	29,4 (27,8—31,6)	28,6 (26,5—30,4)	28,3 (26—31,1)	27,4 (26,7—29,8)	24,2 (22,7—26,4)*#	25,5 (25,1—26,1)*#

Примечание. Различия достоверны: * по отношению к контролю, # по отношению к группе, получавшей только липополисахарид.

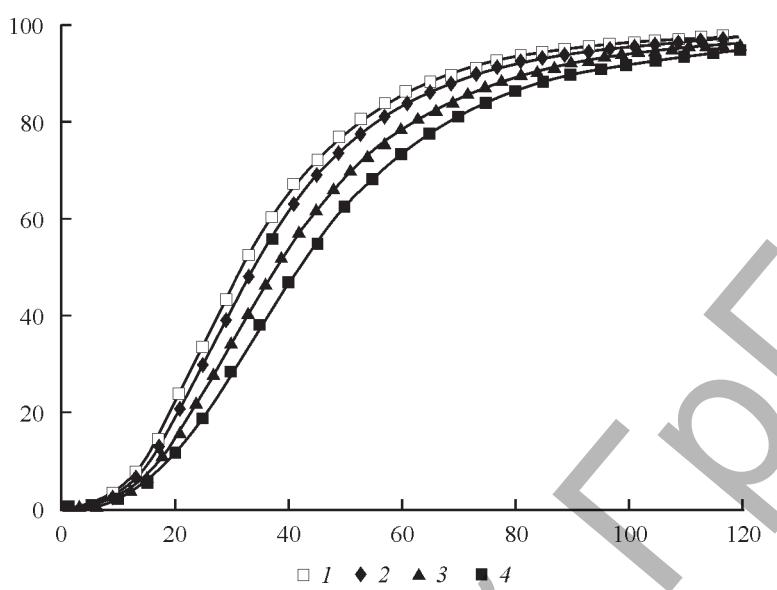


Рис. 3. Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, pCO₂ и температуры при введении липополисахарида (3) и инъекции L-аргинина (2), донора сероводорода (1), контроль (4).

По оси ординат — насыщение гемоглобина кислородом, %; по оси абсцисс — напряжение кислорода в крови, мм рт. ст.

животных, получавших ингибитор цистатионин-γ-лиазы (табл. 2). Введение PAG сопровождается развитием метаболического ацидоза, который характеризуется уменьшением pH на 0.066 ед ($p < 0.05$), а также снижением значений АВЕ на 137.5 ($p < 0.05$), SBE на 127.3 ($p < 0.05$), SBC на 17.8 % ($p < 0.05$) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС. Нарушение редокс-системы сопровождается изменением кислородсвязывающих свойств крови. При введении ЛПС отмечается снижение SO₂ на 12.8 ($p < 0.01$) и pO₂ на 8.0 % ($p < 0.01$) в сравнении с контролем. В то же время применение NaHS, L-аргинина, а также их сочетание после инъекции ЛПС характеризуется меньшим изменением данных показателей. При этом следует отметить в данных группах увеличение концентрации MetHb по сравнению с группой, получавшей только эндотоксин. Наблюдается снижение показателя p50_{peak} до 37.9 (37.4,38.0) ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой [p50_{peak} 39.5 (39.2,39.0) мм рт. ст.], что свидетельствует об увеличении СГК. Введение веществ, модулирующих синтез H₂S и NO, в частности NaHS и L-аргинина, приводит к снижению показателя p50_{peak} [33.6 (33.6,34.9) и 33.1 (32.3,35.4) мм рт. ст. соответственно], по сравнению с группой, получавшей только ЛПС, что отражает смещение кривой диссоциации оксигемоглобина влево (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования показывают, что введение ЛПС в течение трех суток приводит к увеличению активности ПОЛ и снижению антиоксидантной защиты. Использование NaHS и L-аргинина, которые увеличи-

чивают образование соответствующих газотрансмиттеров, уменьшает нарушения редокс-системы.

Как известно, H_2S является антиоксидантом [23]. Будучи сильным восстановителем, он реагирует с активными формами кислорода и азота (супероксид-анион, пероксид водорода, пероксинитрит, оксид азота и др.) и тем самым нейтрализует их цитотоксическую активность [27]. При острой ишемии миокарда показано, что донор сероводорода ($NaHS$) уменьшает его повреждение, в то время как ингибитор сероводорода (PAG) обладает противоположным эффектом [24]. При ишемии-реперфузии почки ингибиторы сероводорода (PAG, гидроксиламин) усиливают повреждения, а однократное введение донора H_2S ($NaHS$) в значительной мере предотвращает их [11].

Известны 3 фермента, которые участвуют в синтезе H_2S : цистотионин- β -синтаза, цистотионин- α -лиаза, 3-меркаптопиуроватсульфуртрансфераза [10]. Исходным субстратом его синтеза в организме является L-цистеин и его дисульфидная форма — цистин, а также L-метионин [22]. В то же время цистеин является важным компонентом редокс-системы [18]. Данный фактор реализует свое антиоксидантное действие через участие в синтезе восстановленного глутатиона и регуляцию внеклеточного уровня глутамата [20].

Кроме того, существует тесное взаимодействие систем генерации H_2S и NO как на уровне регуляции ферментов синтеза, так и мишней их действия [22]. NO ингибирует экспрессию цистатионин- γ -лиазы, а также модулирует каталитическую активность цистатионин- β -синтазы как через нитрозилирование цистеиновых остатков молекулы так, и поглощение цистеина и активность цГМФ-зависимой протеинкиназы [16]. В тоже время H_2S регулирует активность ферментов синтеза NO: индуцибелной и эндотелиальной NO-синтазы (NOS) [31]. Он способен увеличить синтез NO в эндотелии через мобилизацию Ca^{2+} , стабилизацию димерного состояния NOS, стимулирование трансляции мРНК конституциональной изоформы NOS, усиление NO/cGMP/sGC/PKG системы, активацию фосфорилирования регулирующих аминокислот с помощью PI3K/Akt-пути [28]. ЛПС является индуктором индуцибелной изоформы NOS, которая повышает продукцию NO, взаимодействуя с супероксид-анионом и образованием сильного окислителя пероксинитрита. В наших исследованиях развитие редокс-нарушения сопровождается повышением суммарного содержания нитрат/нитритов, что отражает увеличение образования NO. Введение $NaHS$ уменьшает плазменное содержание нитрат/нитритов в плазме крови за счет ингибирования индуцибелной изоформы NOS [17].

Использование веществ, изменяющих содержание H_2S в организме, при введении ЛПС демонстрирует широкую вариабельность эффектов от применения донора H_2S или ингибитора его синтеза, что может быть обусловлено особенностью реализации модели, различием в дозах и стадиях, на которых вводятся корректирующие вещества [31]. Так, Collin M. И соавт. при однократном введение крысам ЛПС и PAG отмечали снижение воспалительной реакции печени [14], а Bekpinar S. И соавт при введение $NaHS$ за 1 ч до инъекции ЛПС наблюдали уменьшение повреждения данного органа [12]. В наших исследованиях применение донора H_2S в условиях действия ЛПС сопровождается усилением антиоксидантной системы и снижением активности ПОЛ. Данный эффект H_2S , возможно, реализуется как непосредственно через его антиоксидантное действие, вклад в функционирование систем цистеин/цистин и L-аргинин-NO, так и через модификацию СГК.

Следует отметить в нашем исследовании парадоксальный факт: снижение концентрации H_2S в крови после введения $NaHS$. Возможно, это связано с

одной стороны, с краткосрочным повышением его содержания в организме, а с другой — с инициированием механизмов его утилизации при взаимодействии с NO (с образованием S-нитротиола), пероксинитритом (с образованием тионитрата) и окислением цистеина в цистеинсульфинат [24].

При гипоксии, сопровождающейся нарушением редокс-гомеостаза, механизмы адаптации направлены на снабжение организма кислородом в соответствии с физиологическими потребностями в нем [5]. В этом плане важная роль отводится гемоглобину, который участвует не только в процессе доставки кислорода в ткани, но и в поддержании редокс-состояния [4]. Сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо направлен на компенсирование кислородной недостаточности, но в условиях окислительного стресса, когда нарушена утилизация кислорода тканями и значительная его часть используется в оксигеназных реакциях, ведущих к образованию активных форм кислорода, возможна активация процессов свободнорадикального окисления.

Продукция NO через образование пероксинитрита, NO-соединений с гемоглобином и регуляцию сосудистого тонуса может изменять СГК, что имеет важное значение для процессов газообмена [3]. Взаимодействие NO с гемоглобином в эритроцитах важно для регуляции состояния обеих этих молекул. 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^- [13]. Также NO связывается с β^{93} -цистеином в глобиновой цепи гемоглобина, образуя S-нитрозогемоглобин [22]. Присутствие этих соединений гемоглобина с NO может по-разному влиять на СГК всей крови: метгемоглобин и нитрозогемоглобин его повышают, а нитрозилгемоглобин снижает. В то же время сероводород непосредственно способен связываться с метгемоглобином, образуя сульфгемоглобин, который уменьшает сродство гемоглобина к кислороду. Также данный гемопротеид играет важную роль в факультативном окислении H_2S , в результате чего образуется тиосульфат и гидросульфид [28]. Совместно с NO-производными гемоглобина сульфгемоглобин может изменять положение кривой диссоциации оксигемоглобина. Кроме того, H_2S может оказывать влияние на активность синтеза NO через активацию эндотелиальной и ингибицию индуцибелльной изоформы NOS [19].

Следует также выделить возможность образования NO и H_2S в эритроцитах [22], что имеет значение для модификации кислородсвязывающих свойств непосредственно гемоглобина через внутриэритроцитарные механизмы. В эритроцитах выявлены особые протеины, расположенные на внутренней стороне плазматической мембранны и обладающие NO-синтазной активностью, сопоставимой с аналогичным ферментом в эндотелиальных клетках [30]. Метabolизм сероводорода в эритроцитах характеризуется повышением продукции H_2S при гипоксических состояниях организма (например синкопальных состояниях) [27]. Взаимодействие NO и H_2S может иметь значение для формирования кислородного обеспечения организма. Данные газотрансмиттеры вносят вклад в модификацию сродства гемоглобина к кислороду через различные механизмы: образование различных дериватов гемоглобина, модулирование внутриэритроцитарной системы формирования кислородсвязывающих свойств крови, а также опосредовано через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина.

Таким образом, применение экзогенного донора сероводорода ($NaHS$) или исходного субстрата синтеза монооксид азота (L-аргинина) уменьшает нарушение редокс-системы. Газотрансмиттеры (донор сероводорода и L-аргинин)

оказывают влияние на кислородсвязывающие свойства крови, в частности повышают сродство гемоглобина к кислороду. При применении ингибитора цистатионин-γ-лиазы этого не наблюдается. Модификация кислородсвязывающих свойств крови, осуществляемая через различные механизмы при участии NO и H₂S, имеет значение для кислородного обеспечения организма и механизмов формирования редокс-системы при введении липополисахарида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Андреев А. Ю., Кушнарева Ю. Е., Мерфи А. Н., Старков А. А. Митохондриальный метаболизм активных форм кислорода: десять лет спустя. Биохимия. 80(5): 612—630. 2015.
- [2] Внуков В. В., Гуценко О. И., Милютина Н. П., Корниенко И. В., Ананян А. А., Даниленко А. О., Панина С. Б., Плотникова А. А., Макаренко М. С. Влияние SKQ1 на экспрессию гена NRF2, ARE-контролируемых генов антиоксидантных ферментов и их активность в лейкоцитах крови крыс при окислительном стрессе. Биохимия. 80(12): 1861—1870. 2015.
- [3] Зинчук В. В., Глуткина Н. В. Кислородсвязывающие свойства крови и монооксид азота. Рос. физiol. журн. им. И. М. Сеченова. 99(5) : 537—554. 2013.
- [4] Зинчук В. В., Шульга Е. В., Гуляй И. Э. Влияние эритропоэтина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние у кроликов при введении липополисахарида. Рос. физiol. журнал. Им. И. М. Сеченова. 96(1): 43—49. 2010.
- [5] Иванов К. П. Современные медицинские проблемы микроциркуляции и гипоксического синдрома. Вест. РАМН. 1—2: 57—62. 2014.
- [6] Камышников В. С. Справ. по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. Минск: Беларусь. 2002.
- [7] Королюк М. А., Иванов Л. И., Масторова И. Г. Метод определения активности катализы. Лаб. дело. : 16—19. 1988.
- [8] Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М. Слово. 2006.
- [9] Терешина Е. В., Ласковый В. Н. Четыре компонента сопряженной редокс-системы организма: углерод, азот, сера, кислород. Биохимия. 80(9): 1440—1455. 2015.
- [10] Черток В. М., Зенкина В. Г. Регуляция функций яичников: участие газовых трансмиттеров NO, CO и H₂S. Успехи физiol/ наук. 46(4): 74—89. 2015.
- [11] Azizi F., Seifi B., Kadahodaee M., Ahghari P. Administration of hydrogen sulfide protects ischemia reperfusion-induced acute kidney injury by reducing the oxidative stress. Ir. J. Med. Sci. 4. 2015.
- [12] Bekpinar S., Develi-Is S., Unlucerci Y., Kusku-Kiraz Z., Uysal M., Gurdol F. Modulation of arginine and asymmetric dimethylarginine concentrations in liver and plasma by exogenous hydrogen sulfide in LPS-induced endotoxemia. Can J Physiol Pharmacol. 91(12): 1071—1075. 2013.
- [13] Bryan N. S., Grisham M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radic. Biol. Med. 43(5): 645—657. 2007.
- [14] Collin M., Anuar F., Murch O., Bhatia M., Moore P., Thiemermann C. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. Pharmacology. 146: 498—505. 2005.
- [15] Dean P. J. Redox theory of aging. Redox Biol. 5: 71—79. 2015.
- [16] Eto K., Kimura H. A novel enhancing mechanism for hydrogen sulfide-producing activity of cystathione beta-synthase. J. Biol. Chem. 277: 42 680—42 685. 2002.
- [17] Ganster F., Burban M., de la Bourdonnaye M., Fizanne L., Douay O., Loufrani L., Mercat A., Calus P., Radermacher P., Henrion D., Asfar P., Meziani F. Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats. Crit. Care. 14(5): 1—11. 2010.
- [18] Go Y. M., Jones D. P. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. Free Radic. Biol. Med. 50(4): 495—509. 2011.
- [19] King A. L., Polhemus D. J., Bhushan S., Otsuka H., Kondo K., Nicholson C.K., Bradley J. M., Islam K. N., Calvert J. W., Tao Y. X., Dugas T. R., Kelley E. E., Elrod J. W., Hu-

- ang P. L., Wang R., Lefer D. J.* Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111(8): 3182—3187. 2014.
- [20] *Lewerenz J., Hewett S. J., Huang Y., Lambros M., Gout P. W., Kalivas P. W., Massie A., Smolders I., Methner A., Pergande M., Smith S. B., Ganapathy V., Maher P.* The cystine/glutamate antiporter system X_c^- in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 18(5): 522—555. 2013.
- [21] *Liu F., Liu G. J., Liu N., Zhang G., Zhang J. X., Li L. F.* Effect of hydrogen sulfide on inflammatory cytokines in acute myocardial ischemia injury in rats. *Exp. Ther Med.* 9(3): 1068—1074. 2015.
- [22] *Nagpure B. V., Bian J. S.* Interaction of hydrogen sulfide with nitric oxide in the cardiovascular. *Oxid Med. Cell Longev.* 2016: 1—16. 2016.
- [23] *Norris E. J., Culberson C. R., Narasimhan S., Clemens M. G.* The Liver as a Central Regulator of Hydrogen Sulfide. *Shock.* 36(3): 242—250. 2011.
- [24] *Olson K. R.* Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Antioxid. Redox Signal.* 22(2): 377—397. 2015.
- [25] *Sedlak J., Lindsay R. H.* Estimation of total, proteinbound and nonprotein sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25: 192—205. 1968.
- [26] *Severinghaus J. W.* Blood gas calculator. *J. Appl. Physiology.* 21(5): 1108—1116. 1966.
- [27] *Shen X., Kolluru G. K., Yuan S., Kevil C. G.* Measurement of H_2S in vivo and vitro by the monobromobimane method. *Methods Enzymol.* (554): 31—45. 2015.
- [28] *Szabo C.* Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 312(1): 3—15. 2017.
- [29] *Taylor S. L., Lamden M. P., Tappel A. L.* Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids.* 11(7): 530—538. 1976.
- [30] *Ulker P., Yaras N., Yalcin O., Celik-Ozenci C., Johnson P. C., Meiselman H. J., Bas-kurt O. K.* Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide.* 24(4): 184—191. 2011.
- [31] *Wang R., Szabo C., Ichinose F., Ahmed A., Whiteman M., Papapetropoulos A.* The role of H_2S bioavailability in endothelial dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* 36(9): 568—578. 2015.

Поступила 2 XI 2016
После доработки 30 V 2017