

УДК 612.127.2:612.57

В. В. ЗИНЧУК

**ФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ  
КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ КРОВИ  
И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В УСЛОВИЯХ  
ИНГИБИРОВАНИЯ NO-СИНТАЗЫ ПРИ ЛИХОРАДКЕ У КРОЛИКОВ**

Оксид азота (NO) является одним из важнейших биологических медиаторов организма, обуславливающий прежде всего эндотелийзависимую дилатацию в артериальных сосудах, цитотоксическую активность макрофагов, ингибирование агрегации тромбоцитов, функцию мессенджера в клетках нервной системы [1]. Однако многие аспекты действия NO остаются неясными. Образование этой молекулы происходит из аминокислоты L-аргинина под контролем фермента NO-синтазы в присутствии восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата, кальмодулина и ряда кофакторов [2].

Показано участие NO в генезе лихорадочных состояний [1]. При лихорадке отмечаются значительные изменения механизмов терморегуляции, энергообмена организма [3]. Установлено, что при этом наблюдаются существенные изменения сродства гемоглобина к кислороду (СГК), которые влияют на активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) [4]. Целью данной работы было оценить с помощью методов факторного анализа эффект ингибирования синтеза NO на кислородсвязующие свойства крови и ПОЛ при лихорадке у кроликов.

**Материалы и методы исследования.** Для постановки экспериментов использовались беспородные кролики-самцы массой 2,6—3,2 кг, содержащиеся в условиях вивария при температуре 20°C и получавшие пищу *ad libitum*. В условиях быстрого эфирного наркоза в правую яремную вену вставлялся гепаринизированный катетер, служивший для забора смешанной венозной крови и введения различных фармакологических веществ. Лихорадку моделировали путем внутривенного (в/в) введения липополисахарида (ЛПС) от *Salmonella typhi* в дозе 0,6 мкг/кг (Россия). Измеряли ректальную температуру электротермометром, датчик которого находился в прямой кишке на глубине 5 см. В качестве ингибитора NO-синтазы использовался NG-нитро-L-аргинин (L-NNA) («Sigma», США), вводимый однократно в дозе 1 мМ (в 4—5 мл физиологического раствора) 13 кроликам, из которых четыре перед введением L-NNA получали в/в L-аргинин в дозе 1 мМ («Sigma», США). Забор крови осуществляли до и в конце первого, второго и третьего часов лихорадки.

Параметры кислотно-щелочного равновесия и кислородтранспортной функции крови определялись на микрогазоанализаторе ABL-330 ("Radiometer", Дания). СГК оценивалось по показателю  $p50$  ( $pO_2$  крови, соответствующее 50%-ному насыщению ее кислородом), который определялся методом "смешивания" в нашей модификации [5]. Содержание кислорода и кислородная емкость крови измерялись по приросту  $pO_2$  в пробе крови известного объема после вытеснения кислорода из оксигемоглобина 0,33%-ным раствором красной кровяной соли [5], степень насыщения крови кислородом находили расчетным путем. Содер-

жание диеновых конъюгатов измерялось по изменению образуемых конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [6]. Уровень оснований Шиффа определялся на спектрофлуориметре F-4010 фирмы "Hitachi" по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при длине возбуждения 344 нм и длине волны флуоресценции 440 нм [6]. Активность каталазы исследовалась спектрофотометрическим методом [6]. Концентрацию  $\alpha$ -токоферола оценивали по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 293 нм и длине волны флуоресценции 323 нм на спектрофлуориметре F-4010 фирмы "Hitachi" [6]. Исследование деформируемости эритроцитов осуществляли эктацитометрическим методом, основанным на определении индекса деформируемости по картине дифракционного паттерна при прохождении монохроматических когерентных световых лучей ( $\lambda=850$  нм) через ламинарный поток суспензии эритроцитов при термостатируемых условиях [7]. Уменьшение индекса деформируемости отражает ухудшение деформируемости эритроцитов. Полученные данные обрабатывались статистически на персональном компьютере методом факторного анализа (пакет "Statgraphics").

**Результаты исследования и их обсуждение.** Введение ЛПС приводило к повышению ректальной температуры. У животных первой серии (ЛПС+L-NNA) наблюдалось повышение ректальной температуры с  $38,1 \pm 0,18$  до  $39,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  ( $P<0,01$ ) к концу второго часа после введения, а во второй (ЛПС+L-аргинин+L-NNA) отмечался более выраженный подъем температуры тела ( $40,1 \pm 0,2$  ( $P<0,01$ ) и  $39,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  ( $P<0,05$ ) к концу второго и третьего часов после введения при исходном  $38,3 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ), который достоверно не отличался от роста ректальной температуры при введении только ЛПС. Внутривенное введение непосредственно L-NNA достоверно температуру тела не изменяло. Значение рН и  $\text{pO}_2$ , а также содержание кислорода и степень насыщения крови имели тенденцию к уменьшению при ингибировании NO-синтазы, но при введении L-аргинина и L-NNA уменьшение изменения этих параметров было более выражено, что свидетельствует о значительно более глубокой кислородной недостаточности, чем при введении только L-NNA и ЛПС.

Величина стандартного  $\text{p50}$  при лихорадке при введении L-NNA уменьшалась с  $33,8 \pm 1,1$  до  $28,4 \pm 0,98$  ( $P<0,01$ ) и  $29,74 \pm 0,7$  мм рт. ст. ( $P<0,01$ ) к концу первого и третьего часов соответственно. Реальное  $\text{p50}$  при этом также уменьшалось до  $30,4 \pm 0,9$  ( $P<0,05$ ) и  $29,4 \pm 1,3$  ( $P<0,05$ ) при исходном  $35,0 \pm 1,7$  мм рт. ст., что обуславливало сдвиг реальных кривых диссоциаций оксигемоглобина (КДО) влево. Введение L-аргинина и L-NNA при лихорадке характеризовалось увеличением  $\text{p50}$  с  $33,7 \pm 1,1$  до  $37,1 \pm 1,3$  мм рт. ст. к концу второго часа и соответственно сдвигом КДО вправо. В целом характер его изменения был таким же, как и при пирогеноловой лихорадке [4]. Также отмечалось снижение индекса деформируемости, свидетельствующее об ухудшении деформативных свойств эритроцитов.

Выявлено увеличение концентрации диеновых конъюгатов в плазме и эритроцитах, особенно к концу второго часа лихорадки (с  $1,69 \pm 0,25$  и  $12,09 \pm 0,50$  до  $2,51 \pm 0,24$  ( $P<0,05$ ) и  $15,89 \pm 1,15$  ( $P<0,01$ )  $\Delta\text{A}_{233}$ /мл у животных первой группы и с  $1,78 \pm 0,06$  и  $11,85 \pm 0,43$  до  $3,05 \pm 0,09$  ( $P<0,01$ ) и  $21,75 \pm 0,48$  ( $P<0,01$ )  $\Delta\text{A}_{233}$ /мл во второй). Также отмечалось повышение уровня оснований Шиффа к концу второго и третьего часов лихорадки в плазме и эритроцитах: соответственно  $11,85 \pm 1,74$  ( $P<0,01$ ),  $47,22 \pm 6,01$  ( $P<0,01$ ) и  $10,26 \pm 0,94$  ( $P<0,01$ ),  $35,59 \pm 1,26$  ( $P<0,05$ ) в сравнении с исходным  $6,81 \pm 0,72$  и  $26,33 \pm 3,65$  ED/мл при ингибировании NO-синтазы и  $17,75 \pm 1,11$  ( $P<0,01$ ),  $94,25 \pm 1,44$  ( $P<0,001$ ) и  $15,25 \pm 0,48$  ( $P<0,01$ ) и  $41,50 \pm 0,96$  ( $P<0,01$ ) при исходном  $6,75 \pm 0,48$  и  $23,75 \pm 0,49$  ED/мл (при введении ЛПС, L-аргинина и L-NNA). Наблюдалось снижение концентрации  $\alpha$ -токоферола и активности каталазы с наиболее выраженным уменьшением к концу второго часа лихорадки.

Уменьшение  $\alpha$ -токоферола к концу второго часа в плазме и эритроцитах у животных с ингибированием синтеза NO составило 38,9 и 38,7% соответственно и 50,0 и 50,7% при предупреждении его ингибирования. Падение активности каталазы в эритроцитах у животных этих групп к этому временному интервалу достигало 50,8 и 62,8%.

Полученный массив данных оценивался методом главных компонент факторного анализа. Избранная система из трех факторов имеет долю дисперсности 68,3%. На основе метода ортогонального вращения общих факторов *quartimax* была получена матрица (таблица). Наиболее ценным по информативности является первый фактор, имеющий превосходящее значение 0,6 факторной нагрузки для 12 признаков из 25. Факторы 2 и 3 включали соответственно 5 и 2 признака. Первый включает в себя деформируемость эритроцитов, СГК, параметры ПОЛ, антиоксидантной системы и температуры. Его, очевидно, следует интерпретировать как фактор прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма.

Матрица факторного отображения, построенная по показателям кислородтранспортной функции крови и перекисного окисления липидов при лихорадке в условиях изменения активности NO-синтазы

Показатель	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3
Показатель водородных ионов:			
при стандартной температуре	-0,185	-0,038	<u>-0,845</u>
при реальной температуре	-0,054	-0,046	<u>-0,879</u>
Напряжение углекислого газа:			
при стандартной температуре	-0,147	-0,330	0,207
при реальной температуре	-0,260	-0,326	0,216
Напряжение кислорода:			
при стандартной температуре	-0,542	-0,236	-0,542
при реальной температуре	<u>-0,646</u>	-0,158	-0,476
Концентрация гидрокарбоната	0,506	<u>0,753</u>	-0,250
Концентрация общей углекислоты	0,503	<u>0,745</u>	0,275
Реальный дефицит буферных оснований	0,399	<u>0,753</u>	0,302
Стандартный дефицит буферных оснований	0,359	<u>0,696</u>	0,301
Концентрация стандартного бикарбоната	0,524	<u>0,743</u>	0,146
Кислородная емкость	0,135	-0,313	0,326
Содержание кислорода	0,522	-0,584	0,354
Степень насыщения	0,552	-0,539	0,241
Индекс деформируемости	<u>0,791</u>	-0,101	0,413
Сродство гемоглобина к кислороду:			
при стандартных значениях рН, рСО <sub>2</sub> и температуре	<u>0,846</u>	0,100	-0,023
при реальных значениях рН, рСО <sub>2</sub> и температуре	<u>0,809</u>	0,091	-0,349
Концентрация дисенных конъюгатов:			
в плазме	-0,919	0,135	-0,118
в эритроцитах	<u>-0,785</u>	0,052	0,181
Концентрация $\alpha$ -токоферола			
в плазме	<u>0,886</u>	0,125	-0,077
в эритроцитах	<u>0,776</u>	-0,274	0,075
Концентрация оснований Шиффа:			
в плазме	-0,749	0,156	-0,038
в эритроцитах	<u>-0,821</u>	0,063	-0,022
Активность каталазы	<u>0,860</u>	-0,178	0,124
Ректальная температура	<u>-0,822</u>	0,044	0,147

Примечание. Подчеркнуты значения нагрузок на признаки, имеющие величину больше по модулю 0,6.

Ингибирование NO-синтазы в условиях моделирования пирогенальной лихорадки обуславливает снижение гипертермического эффекта, сопровождается сдвигом КДО влево и меньшей активацией ПОЛ, в то время как предварительное введение в избыточном количестве L-аргинаина сопровождалось развитием типичной лихорадочной реакции, обуславливало сдвиг КДО вправо и более выраженную активацию свободнорадикальных процессов.

Известно, что NO участвует в процессах терморегуляции [8]. Показано, что ингибирование NO-синтазы ослабляло термогенные и гипертермические эффекты микроинъекций простагландина E<sub>2</sub> в преоптическую область переднего гипоталамуса у крыс [9]. L-NNA, вводимый в/в, снижал подъем температуры тела у кроликов на введение интерлейкина-1β, при его поступлении в боковые желудочки мозга этого эффекта не наблюдалось [10]. В то же время показано ослабление лихорадочной реакции при в/в и внутричерепном введении донора NO, молсидомина [11]. Представляется возможным участие NO в изменении уровня функционирования периферических механизмов терморегуляции, которые могут являться исполнительными механизмами других функциональных систем. Введение различных эндотоксинов обуславливает экспрессию индуцибельной изоформы NO-синтазы, что приводит к образованию больших количеств NO [1]. Очевидно, наблюдаемое снижение лихорадочной реакции вызвано ингибированием активности прежде всего индуцибельной NO-синтазы и снижением проявления действия ее негативных свойств.

При лихорадке отмечается повышение активности процессов ПОЛ [3, 4], которое не может быть уравновешено активацией механизмов антиоксидантной защиты. Среди различных физиологических защитных механизмов, обеспечивающих поддержание температурного гомеостаза, многие требуют энергии, но альтернативно им существуют механизмы, снижающие потребность кислорода в организме [12]. В наблюдаемом снижении энергообмена и потребления кислорода у лихорадящих больных при охлаждении может участвовать сдвиг КДО влево [13]. При активировании свободнорадикального окисления липидов возрастает количество энергии, высвобождаемой в виде тепла, что позволяет рассматривать их активацию как своеобразный механизм увеличения химической теплопродукции. Очевидно, отмечаемый сдвиг КДО влево ограничивает поток кислорода в ткани и уменьшает его долю в окислительных реакциях. Этот механизм, позволяя уменьшить интенсивность химической терморегуляции, является частью компенсаторно-приспособительных реакций организма по поддержанию температурного гомеостаза при лихорадке и, возможно, эффекторным элементом антипиретической системы.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить характер изменения основных показателей кислородсвязывающих свойств крови и ПОЛ и на основе факторного анализа вскрыть их взаимоотношения. Полученная модель групповой структуры данных признаков позволяет сделать предположение об ингибирующем влиянии левостороннего сдвига КДО на процессы свободнорадикального окисления липидов.

### Summary

Inhibition of nitric oxide synthase under pyrogenal fever simulation in rabbits causes reduction in fever effect accompanied by the shift of oxyhemoglobin dissociation curve (ODC) leftwards and less lipid peroxidation activity, whereas preliminary administration of excessive L-arginine was followed by the development of usual fever reaction with ODC shift rightwards and more pronounced activation of free radical processes. The data array obtained was evaluated by the method of main components of the factor analysis. The constructed model of the parameter group structure indicates inhibition of free radical lipid oxidation by ODC shift leftwards.

## Литература

1. Snyder S. H., Bredt D. S. // *Sci. Am.* 1992. Vol. 266. P. 68—71.
2. Palmer R. M. J., Moncada S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. Vol. 158. P. 348—352.
3. Гури́н В. М. Механизмы лихорадки. Мн., 1993.
4. Borisiuk M. V., Zinchuk V. V. // *Acta Biochim. Pol.* 1995. Vol. 42, N1. P. 69—74.
5. Борисюк М. В., Добродей М. А., Дремза И. К., Зинчук В. В. // Методы исследования массопереноса в системе микроциркуляции. Новосибирск, 1991. С. 156—162.
6. Rice-Evans C. A., Diplock A. T., Symons M. C. R. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research.* Elsevier, 1991.
7. Амбарцумян Р. В., Еремеев В. В., Захаров С. Д. и др. // Краткие сообщения по физике. 1985. №10. С. 44—47.
8. Redford J., Bishai I., Cosciani F. // *Canad. J. Physiol. and Pharmacol.* 1996. Vol. 73. P. 146—147.
9. Amir S., De-Blasio E. // *Brain. Res.* 1991. Vol. 556. P. 157—160.
10. Karas L., Shibata M., Kimura M., Krueger J. M. // *Am. J. Physiol.* 1994. Vol. 266. P. R151—R157.
11. Gourine A. V. // *Gen. Pharmacol.* 1995. Vol. 26. P. 835—841.
12. Wood S. C. // *Annu. Rev. Physiol.* 1991. Vol. 53. P. 71—85.
13. Manthous C. A., Hall J. B., Olson D. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995. Vol. 151, N 1. P. 10—14.

Гродненский государственный медицинский  
институт

Поступила в редакцию  
06.06.96