

ФИЗИОЛОГИЯ

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ И L-АРГИНИН—НО-СИСТЕМЫ

В.В.Зинчук

Кафедра нормальной физиологии (зав. — В.В.Зинчук) Гродненского медицинского университета Беларуси

Изучали эффект коррекции L-аргинин—NO-системы на лихорадочную реакцию и прооксидантно-антиоксидантное состояние в тканях у крыс с повышенным сродством гемоглобина к кислороду (путем приема цианата натрия) при внутримышечном введении липополисахарида. Показано, что степень дисбаланса показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния у животных с повышенным сродством гемоглобина к кислороду при введении липополисахарида была наименьшей. Коррекция L-аргинин—NO-системы при модифицированном сродстве гемоглобина к кислороду практически не влияла на уровень оснований Шиффа и содержание антиоксидантов при введении липополисахарида.

Ключевые слова: сродство гемоглобина к кислороду, перекисное окисление липидов, липополисахарид, оксид азота

Молекулярный кислород необходим для образования его активных интермедиатов, инициации процессов ПОЛ и его дальнейшего протекания на стадиях продолжения и разветвления цепей [1]. Ведущим принципом организации антиоксидантной защиты является снижение внутриклеточной концентрации кислорода [5]. Важное значение в сложной иерархии антиоксидантной системы имеют кислородсвязывающие свойства крови, определяющие величину тканевого P_{O_2} . Ввиду кислородзависимой природы свободнорадикального окисления липидов представляется целесообразным исследовать роль кислородтранспортной функции крови и регулирующих ее факторов в системной организации поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма, что наблюдалось в экспериментах при целенаправленной коррекции сродства ге-

моглобина к кислороду (СГК) либо L-аргинин—NO-системы при гипертермических состояниях различного генеза [3,4]. Целью данной работы было изучение прооксидантно-антиоксидантного состояния организма при введении липополисахарида (ЛПС) в условиях одновременной коррекции СГК и L-аргинин—NO-системы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на лабораторных крысах-самцах массой 200-260 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все животные были разделены на 7 групп. Повышение СГК у крыс 5-7-й групп достигалось путем добавления в пищевой рацион водного раствора 0.5% цианата натрия в течение 8 нед. Для контроля у животных выборочно измеряли СГК. Животным 1-й группы вводили внутривенно (в/в) изотонический раствор NaCl в дозе 10 мл/кг; крысы 3-й и 5-й групп получали нитроглицерин (НГ; "Isis-Cheme") 30 мг/кг в/б; крысам 4-й и

Адрес для корреспонденции: 230015 Беларусь, Гродно, ул. Горького, д. 80. Медицинский университет. zinchuk@grsmi.unibel.by. Зинчук В.В.

7-й групп предварительно вводили метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинин (L-NAME; "Sigma") 25 мг/кг в/б ежедневно в течение 3 сут. Крысам 2, 5, 6 и 7-й групп вводили ЛПС *Salmonella typhi* (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН) 0.1 мг/кг внутримышечно. Лихорадочную реакцию оценивали по приросту величины ректальной температуры. Забор крови из правого предсердия и тканей (печень, почки и сердце) выполняли на 120-й минуте после введения фармакологических средств.

Показатель СГК P_{50} (P_{O_2} , соответствующее 50% насыщению гемоглобина кислородом) измеряли методом "смешивания" в нашей модификации [2] при 37°C, pH 7.4 и P_{CO_2} 40 мм рт. ст.; P_{50} при реальных pH, P_{CO_2} и температуре (P_{50P}) рассчитывали по формулам [10]. Значения P_{O_2} , P_{CO_2} и pH в исследуемых пробах крови (0.13 мл) измеряли при температуре 37°C на микрогазоанализаторе "ABL-330" ("Radiometer"). Реальный избыток буферных оснований, концентрацию общей углекислоты и гидрокарбонатов в плазме (HCO_3^-) рассчитывали по номограммам "Siggaard-Andersen".

Содержание оснований Шиффа оценивали по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длине волны возбуждения 344 нм и эмиссии 440 нм на спектрофлуориметре "F-4010" ("Hitachi") [8]. Каталазную ак-

тивность в биологическом материале оценивали по количеству израсходованной H_2O_2 , способной образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс на спектрофотометре "СФ-46" при длине волны 410 нм [6]. Содержание α -токоферола определяли по интенсивности флюоресценции гептанового экстракта при длине волны возбуждения 292 нм и эмиссии 325 нм на спектрофлуориметре "F-4010" ("Hitachi") [8]. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью пакета "Statgraphics".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение ЛПС в условиях одновременной коррекции СГК и L-аргинин—NO-системы у крыс сопровождалось изменениями параметров кислородтранспортной функции крови, ПОЛ, уровня антиоксидантов и температурного ответа на ЛПС. Наибольший подъем температуры (на $1.60 \pm 0.05^\circ C$) имел место у животных, получавших только ЛПС. Лихорадочный ответ на ЛПС был наименьшим у крыс с повышенным СГК и достоверно не различался при введении животным НГ либо L-NAME.

Введение ЛПС приводило к развитию умеренного метаболического ацидоза (табл. 1), отмечалось ухудшение кислородного обеспечения. У животных с повышенным СГК, а также в ус-

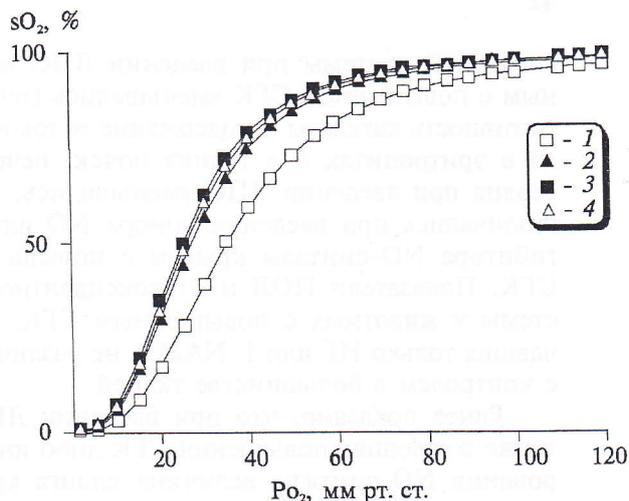
Таблица 1. Характер изменения параметров кислородтранспортной функции крови у крыс при внутримышечном введении ЛПС в условиях одновременной коррекции СГК и L-аргинин—NO-системы ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n=6)	ЛПС (n=7)	НГ (n=5)	L-NAME (n=5)	Повышенное СГК		
					ЛПС (n=5)	ЛПС+НГ (n=6)	ЛПС+ L-NAME (n=6)
pH							
стандартный	7.312±0.006	7.220±0.033*	7.299±0.008	7.325±0.015	7.269±0.013*	7.275±0.013*	7.266±0.013*
реальный	7.294±0.006	7.191±0.033*	7.298±0.006	7.309±0.014	7.254±0.015*	7.256±0.110*	7.242±0.014*
P_{CO_2} , мм рт. ст.							
стандартное	50.33±1.84	51.89±1.47	50.17±0.61	50.88±1.89	52.82±0.80	52.03±2.64	51.6±2.06
реальное	51.45±1.87	56.53±1.59	50.39±0.74	51.83±1.61	55.09±0.85	55.15±2.73	53.87±2.11
P_{O_2} , мм рт. ст.							
стандартное	28.30±1.21	23.71±1.32*	27.37±0.55	27.77±1.17	24.18±0.73	24.10±0.40*	25.76±0.41
реальное	29.37±1.43	27.28±1.55	27.57±0.72	28.61±1.12	26.20±1.05	26.50±0.11	27.61±0.65
Метгемоглобин, %	0.76±0.18	2.41±0.08	3.78±0.37**	0.74±0.12	3.71±0.54**	6.30±0.48**	1.78±0.22
HCO_3^- , моль/л	22.32±1.23	24.27±0.71	24.37±1.04	25.14±1.17	25.14±1.17	24.42±1.27	23.37±1.44
Избыток буферных оснований, ммоль/л	-3.08±0.87	-2.86±1.12	-1.53±0.66	-0.63±0.55	-0.90±0.55	-2.10±0.91	-2.84±0.48

Примечание. Здесь и в табл. 2: $p < 0.05$: *по сравнению с контролем, **по сравнению с группой, получавшей только ЛПС.

ловиях коррекции L-аргинин—NO-системы ухудшение кислотно-основного равновесия и кислородтранспортной функции при введении ЛПС было менее выраженным. У крыс, получавших цианат натрия и ЛПС, P_{50} было значительно меньше, чем в контроле ($p < 0.001$, табл. 1), что обуславливало сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево (рисунок). Существенно, что значения P_{50} при стандартных и реальных значениях pH, P_{CO_2} и температуры при введении модуляторов L-аргинин—NO-системы у крыс с повышенным SGK были весьма близки, а введение ЛПС характеризовалось незначительным изменением P_{50} . Уровень метгемоглобина был наибольшим при введении НГ и ЛПС ($p < 0.05$ по сравнению с контролем, табл. 1).

Активность ПОЛ, оцениваемая по содержанию оснований Шиффа, при введении ЛПС существенно возрастала (табл. 2), однако степень прироста у крыс с повышенным SGK была наименьшей. Так, в эритроцитах содержание оснований Шиффа возрастало при введении только ЛПС более чем на 250%, у животных с модифицированным SGK — на 159%, при предварительном введении L-NAME — на 142%, НГ — на



Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, P_{CO_2} и температуры у крыс с нормальным (1) и с повышенным сродством гемоглобина к кислороду (2-4). 2 — 0.9% NaCl, 3 — липополисахарид, 4 — липополисахарид+L-NAME.

154%, т.е. коррекция L-аргинин—NO-системы практически не влияла на содержание оснований Шиффа при введении ЛПС. Показатели антиок-

Таблица 2. Характер изменения параметров антиоксидантной защиты у крыс при внутримышечном введении ЛПС в условиях одновременной коррекции SGK и L-аргинин—NO-системы ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n=6)	ЛПС (n=7)	НГ (n=5)	L-NAME (n=5)	Повышенное SGK		
					ЛПС (n=5)	ЛПС+НГ (n=6)	ЛПС+L-NAME (n=6)
Каталаза, ед/мг белка							
эритроциты	579.9±30.4	226.9±4.3*	503.4±9.9	422.6±34.7	300.7±9.7**	306.6±16.6**	311.6±5.6**
почки	216.3±2.8	141.6±3.4*	194.6±5.7*	210.9±2.1	173.7±5.1**	170.5±5.2**	165.9±2.1**
печень	406.2±9.9	314.1±5.4*	424.6±16.5	377.5±6.9	342.6±9.9**	358.5±11.8**	355.9±6.3**
сердце	36.5±0.2	21.7±0.4*	35.9±1.4*	34.4±2.7	26.6±1.2**	26.4±0.9**	26.5±1.4**
α-Токоферол, мкмоль/мл							
эритроциты	36.9±1.5	20.3±0.3*	34.9±2.1	32.3±1.12	26.2±1.4**	26.9±1.3**	28.6±0.9**
почки	80.9±1.0	61.2±0.4*	79.1±1.1	79.2±1.9	71.7±1.5**	70.2±1.8**	74.4±1.8**
печень	78.5±2.1	63.4±0.4*	74.5±1.3*	73.3±1.8	71.4±1.5**	69.6±3.6**	70.5±1.2**
сердце	80.6±2.2	62.5±0.6*	80.4±1.5	79.1±1.5	70.4±1.9**	69.2±2.6**	69.1±1.5**
Концентрация оснований Шиффа, ед. флуоресценции							
эритроциты	9.97±2.64	36.80±6.17*	10.31±1.05	14.19±2.32	30.37±3.35*	24.88±1.14	21.19±2.95
почки	55.4±7.5	102.90±5.08*	62.07±4.44	59.30±3.68	73.14±5.61*	75.03±4.68	83.07±4.21*
печень	159.28±13.75	321.31±6.91*	157.20±3.95	153.10±12.97	235.70±11.84*	243.87±6.97	218.25±9.16*
сердце	81.87±6.72	136.01±5.61*	78.9±6.3	69.93±5.06	110.02±6.48*	112.03±6.51	116.40±5.33*

сидантной системы при введении ЛПС животным с повышенной СГК уменьшались (табл. 2). Активность каталазы и содержание α -токоферола в эритроцитах и в тканях почек, печени и сердца при введении ЛПС уменьшались, но не различались при введении донора NO или ингибитора NO-синтазы крысам с повышенным СГК. Показатели ПОЛ и антиоксидантной системы у животных с повышенным СГК, получавших только НГ или L-NAME, не различались с контролем в большинстве тканей.

Ранее показано, что при введении ЛПС, а также в условиях повышения СГК либо ингибирования NO-синтазы величина сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина тесно коррелирует с параметрами свободнорадикального окисления [3,13], что позволило рассматривать СГК как один из физиологических механизмов, участвующих в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма. Примечательно, что в данном исследовании не наблюдалось более выраженного уменьшения лихорадочной реакции и активности ПОЛ в ответ на введение ЛПС в условиях ингибирования синтеза NO или введения его донора при повышении СГК. Анализировать природу протекции левостороннего сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина следует с учетом кислородзависимого характера ПОЛ. При этом возникает функциональное несоответствие между потребностью в кислороде и его потреблением, происходит изменение работы протонных помп, уменьшается скорость дыхания митохондрий, наблюдаются конформационные изменения мембранно-связанных белково-ферментных комплексов, происходит снижение энергетического выхода данных реакций, накопление недоокисленных продуктов обмена и последующее развитие всего спектра деструктивных процессов на клеточном и молекулярном уровнях.

Гемоглобин играет важную роль в элиминации NO из организма. В артериальной крови NO инактивируется в реакции с оксигемоглобином до нитрата и метгемоглобина, а в венозной крови образуется нитрозогемоглобин [9]. Его концентрация в артериальной и смешанной венозной крови нормоксических и гипоксических овец при ингаляции NO зависит от уровня O_2 и NO, причем существует выраженная отрицательная корреляция между его уровнем и степенью насыщения крови O_2 [12]. NO может повышать СГК через взаимодействие с гемической группой (с образованием нитрозо- и метгемоглобина), изменение вязкостных свойств крови [9]. Нитрозогемоглобин является важным модулято-

ром тонуса сосудов на уровне микроциркуляции; предполагается, что он является источником локального образования NO [11]. Анализ спектральных характеристик гемоглобина, обработанного пероксинитритом, свидетельствует о возможности существования нового пути окисления гемоглобина в биологических системах [7], что может иметь важное значение в модификации функциональных свойств гемоглобина и его участия в формировании потока O_2 в ткани и поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме. При одновременной коррекции СГК и L-аргинин—NO-системы не происходит большего усиления защитных эффектов по сравнению с таковым при их изолированном корригировании [13], что отражает, по видимому, истощение адаптационных резервов антиоксидантного характера, реализуемых через кислородсвязывающие свойства гемоглобина.

Изложенные выше данные свидетельствуют о сложной природе участия L-аргинин—NO-системы и кислородсвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма и в его антиоксидантной защите, но, очевидно, через аналогичные механизмы.

Работа выполнена при финансовой поддержке МЗ РБ (грант № 1993292).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Биленко М.В.* Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М., 1989.
2. *Борисюк М.В., Добродей М.А., Дремза И.К., Зинчук В.В.* // Методы исследования массопереноса в системе микроциркуляции. Новосибирск, 1991. С. 156-162.
3. *Зинчук В.В., Борисюк М.В.* // Бюл. exper. биол. 1999. Т. 127, № 6. С. 616-619.
4. *Зинчук В.В., Борисюк М.В.* // Успехи физиол. наук. 1999. Т. 30, № 3. С. 38-48.
5. *Скулачев В.П.* // Мол. биол. 1995. Т. 29, № 6. С. 1199-1209.
6. *Aruoma O.I., Cuppett S.L.* Antioxidant methodology: *in vivo* and *in vitro* concepts. N.Y., 1997.
7. *Minetti M., Scorza G., Pietraforte D.* // Biochemistry. 1999. Vol. 38, N 7. P. 2078-2087.
8. *Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R.* Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. L., 1991.
9. *Sakinis A., Wennmalm A.* // Biochem. J. 1998. Vol. 330, Pt. 1. P. 527-532.
10. *Severinghaus J.W.* // J. Appl. Physiol. 1966. Vol. 21, N 5. P. 1108-1116.
11. *Stamler J.S., Jia L., Eu J.P. et al.* // Science. 1997. Vol. 276. P. 2034-2766.
12. *Takahashi Y., Kobayashi H., Tanaka N. et al.* // Am. J. Physiol. 1998. Vol. 43, N 1. P. H349-H357.
13. *Zinchuk V.* // Respiration. 1999. Vol. 66, N 5. P. 448-454.

Получено 20.04.00