

## ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ L-АРГИНИН-NO-СИСТЕМЫ

А.Н.Глебов, В.В.Зинчук

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

Изучали параметры прооксидантно-антиоксидантного равновесия при окислительном стрессе на крысах в условиях коррекции L-аргинин-NO-системы. Окислительный стресс моделировали внутривенным введением ЛПС от *E. coli*. Наименьшие нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия при окислительном стрессе отмечены в условиях направленной селективной коррекции L-аргинин-NO-системы. L-аргинин и неселективный блокатор NO-синтазы выраженного защитного воздействия не оказывали.

**Ключевые слова:** перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, липополисахарид, оксид азота

Образование активированных кислородных метаболитов ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , OH-радикала, синглетного кислорода, NO-радикала, пероксирадикалов) играет ключевую роль в молекулярно-клеточных механизмах развития окислительного стресса [1]. Свободный радикал NO синтезируется в организме, обеспечивая многие нормальные клеточные функции, однако при высоком уровне NO, взаимодействуя с другими окислителями, образует активные формы азота, которые повреждают клеточные мишени. Образующийся из NO и  $O_2^{\cdot-}$  пероксинитрит является сильным окислителем, реагирующим с биомолекулами. Активные формы азота и кислорода находятся в сложных взаимоотношениях, обеспечивающих как синергические, так и антагонистические эффекты, которые зависят от изменения скорости образования NO и  $O_2^{\cdot-}$  [4].

Цель работы — изучение параметров прооксидантно-антиоксидантного равновесия при окислительном стрессе в условиях коррекции L-аргинин-NO-системы.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на лабораторных крысах-самцах ( $n=69$ ) массой 190-230 г, содержащихся в условиях вивария при 20°C. Окислитель-

ный стресс моделировали внутривенным введением ЛПС от *E. coli* в дозе 5 мг/кг ("Sigma"; наиболее часто применяются дозы от 2 до 20 мг/кг [8]), что вызывало окислительный стресс средней степени тяжести.

Коррекцию L-аргинин-NO-системы выполняли внутривенной инъекцией L-аргинина в дозе 300 мг/кг за 10 мин до введения ЛПС, метилового эфира N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинина (L-NAME; "Sigma") в дозе 20 мг/кг, селективного ингибитора NO-синтазы — L-лизин-N<sup>ω</sup>-ацетамида (L-NIL; "Sigma") в дозе 2 мг/кг через 45 мин после введения ЛПС. Через 180 мин после введения ЛПС брали образцы тканей (сердца, легких, печени, почек, мышц). Использованные нами дозы и способы введения веществ для коррекции L-аргинин-NO-системы обеспечивали значимую коррекцию NO-образующей функции организма [6,9].

Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) определяли по измерению конъюгированных диеновых структур из образуемых гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот [7]. Уровень оснований Шиффа определяли по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при  $\lambda_{возб}=344$  нм и  $\lambda_{эм}=440$  нм на спектрофлуориметре "F-4010" ("Hitachi") [7]. Каталазную активность в биологическом материале оценивали по количеству израсходованной  $H_2O_2$ , способной образовывать с солями молибдена стойко окра-

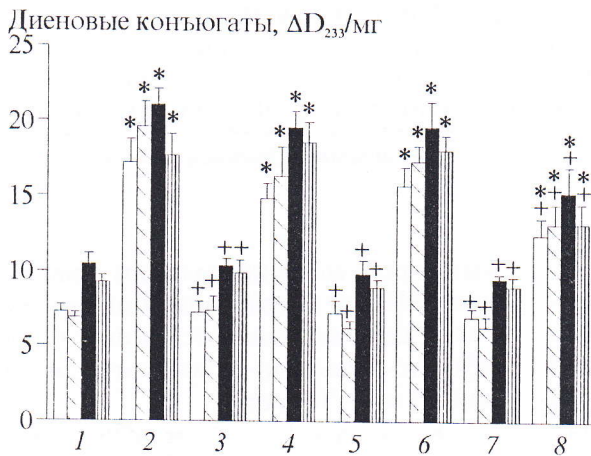
*Адрес для корреспонденции:* zinchuk@grsmu.by. Зинчук В.В.

шенный комплекс на спектрофотометре "СФ-46" при  $\lambda=410$  нм [2]. Содержание  $\alpha$ -токоферола определяли по интенсивности флуоресценции гептанового экстракта при  $\lambda_{возб}=292$  нм и  $\lambda_{эм}=325$  нм на спектрофлуориметре "F-4010" ("Hitachi") [2].

Данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием *t* критерия Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При окислительном стрессе в тканях интенсифицируются процессы ПОЛ (рис.1, 2). Уровень

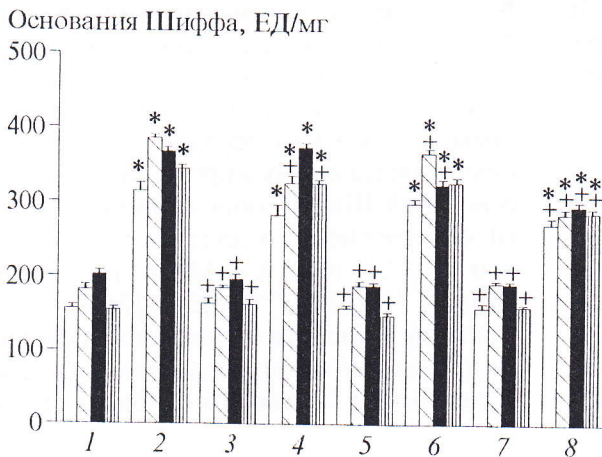


**Рис. 1.** Изменение диеновых конъюгатов у крыс при окислительном стрессе в условиях коррекции L-аргинин-NO-системы.

Здесь и на рис. 2: светлые столбики — сердце, темные столбики — печень, косая штриховка — легкие, вертикальная штриховка — почки.

1 — контроль; 2 — ЛПС; 3 — L-NAME; 4 — ЛПС+L-NAME; 5 — L-аргинин; 6 — L-аргинин+ЛПС; 7 — L-NIL; 8 — ЛПС+L-NIL.

$p < 0.05$  по сравнению \*с контрольной группой, +с ЛПС.



**Рис. 2.** Изменение оснований Шиффа у крыс при окислительном стрессе в условиях коррекции L-аргинин-NO-системы.

**Таблица 1.** Активность каталазы (ммоль  $H_2O_2$ /с×г белка) в тканях крыс при окислительном стрессе в условиях коррекции L-аргинин-NO-системы ( $M \pm m$ )

Ткань	Контроль	ЛПС	L-NAME	ЛПС+L-NAME	L-аргинин	L-аргинин+ЛПС	L-NIL	ЛПС+L-NIL
Сердце	41.28±1.79	20.79±2.32*	42.40±1.71*	26.31±2.63*	42.94±1.10*	27.83±3.65*	44.51±2.26*	31.19±2.14**
Легкие	35.28±1.69	17.04±3.18*	34.51±2.07*	21.87±2.77*	36.78±2.06*	19.29±3.97*	37.72±2.14*	25.99±2.18**
Печень	93.69±1.14	46.02±2.73*	98.86±3.13*	47.20±4.16*	90.60±3.61*	52.41±3.55*	89.96±2.67*	62.16±3.59**
Почки	66.04±2.99	28.24±4.82*	68.04±3.13*	30.40±3.30*	63.14±4.09*	34.17±3.52*	69.91±1.09*	46.83±4.41**

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой, \*\*с ЛПС.

**Таблица 2.** Изменение содержания  $\alpha$ -токоферола (нмоль/г) в тканях крыс при окислительном стрессе в условиях коррекции L-аргинин-NO-системы ( $M \pm m$ )

Ткань	Контроль	ЛПС	L-NAME	ЛПС+L-NAME	L-аргинин	L-аргинин+ЛПС	L-NIL	ЛПС+L-NIL
Сердце	191.9±3.57	123.4±7.66*	199.5±2.60*	131.8±6.40*	186.2±2.21*	133.2±3.52*	189.8±5.18*	148.6±5.89**
Легкие	280.1±5.90	126.3±9.94*	279.5±6.36*	142.4±5.84*	270.5±7.06*	138.8±9.27*	269.8±5.13*	191.3±7.37**
Печень	135.6±3.76	94.3±4.38*	140.7±2.61*	94.5±5.25*	131.7±2.45*	97.5±5.57*	129.7±3.72*	113.5±3.91**
Почки	181.1±4.59	141.8±5.69*	195.1±5.88*	147.1±5.56*	186.7±4.09*	148.2±6.64*	185.0±3.33*	159.7±4.10**

ДК возрастал на 137.6% в сердце, на 184.1% в легких, на 101.2% в печени, на 90.4% в почках, а уровень оснований Шиффа — на 99.2% в сердце, на 111.3% в легких, на 81.8% в печени, на 121.3% в почках ( $p < 0.001$ ). Наименьшие нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в тканях отмечались при направленной селективной коррекции L-аргинин-NO-системы. При этом прирост содержания ДК был меньше в сердце на 27.6% ( $p < 0.05$ ), на 32.6% ( $p < 0.01$ ) в легких, на 27.4% ( $p < 0.02$ ) в печени, на 25.1% ( $p < 0.02$ ) в почках, а оснований Шиффа — на 13.8% ( $p < 0.01$ ) в сердце, на 26.1% в легких, на 19.6% в печени, на 16.8% в почках ( $p < 0.001$ ) по сравнению с контрольной группой. Было изучено влияние введения в кровоток ЛПС на основные факторы системы антиоксидантной защиты (табл. 1, 2). При окислительном стрессе в тканях снижалась активность каталазы и содержание  $\alpha$ -токоферола. Наиболее значимо ( $p < 0.001$ ) активность каталазы уменьшилась в сердце (49.6%), легких (51.7%), печени (50.9%), почках (57.2%), а уровень  $\alpha$ -токоферола — в легких (54.9%). Введение в условиях окислительного стресса L-NIL увеличивало значение этих показателей антиоксидантной защиты. L-аргинин и неселективный блокатор L-NAME выраженного защитного воздействия не оказывали.

Данные об эффекте ингибирования NO-синтазы противоречивы, что, возможно, связано с различиями в моделях септического шока и применяемыми дозами ингибиторов синтеза NO, стадией, на которой вводятся корректирующие средства, и местной концентрацией NO [5]. Эффект NO (протекторный или депрессивный) за-

висит от выраженности окислительного стресса. При чрезмерном образовании радикалов по отношению NO индуцируются повреждающие эффекты [3].

Таким образом, выявлено влияние NO на развитие окислительного стресса. Можно рекомендовать использование высокоспецифичных маркеров окислительного стресса (содержание изопростанов, степень повреждения ДНК и т.д.) для оценки роли NO в его генезе.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований РБ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М., 2001.
2. *Aruoma O.I., Cuppett S.L.* Antioxidant methodology: in vivo and in vitro concepts. NY., 1997.
3. *Berges A., Van Nassauw L., Bosmans J. et al.* // *Acta Cardiol.* 2003. Vol. 58, N 2. P. 119-132.
4. *Brune B., Zhou J., von Knethen A.* // *Kidney Int. Suppl.* 2003. N 84. P. S22-S24.
5. *Connelly L., Palacios-Callender M., Ameixa C. et al.* // *J. Immunol.* 2001. Vol. 166, N 6. P. 3873-3881.
6. *Fisher L.G., Horstman D.J., Hahnenkamp K. et al.* // *Anesthesiology.* 1999. Vol. 91, N 6. P. 1724-1732.
7. *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.
8. *Zhang C., Walker L.M., Hinson J.A., Mayeux P.R.* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. Vol. 293, N 3. P. 968-972.
9. *Zinchuk V.V., Dorokhina L.V.* // *Nitric Oxide.* 2002. Vol. 6, N 1. P. 29-34.

Получено 05.04.04