

М. Э. Казак, В. В. Зинчук, И. Э. Гуляй

## УЧАСТИЕ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ В АДАПТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Установлено, что введение L-аргинина в дозе 100 мг/кг, в условиях действия эндотоксина, характеризуется более выраженным повышением сродства гемоглобина к кислороду ( $p50_{\text{реал}}$  снижается на 8,5%,  $p < 0,01$ ), уменьшая процессы пероксидации, что предупреждает окислительные повреждения клеток, вызываемые липополисахаридом.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения физиологически активных веществ, изменяющих состояние L-аргинин-NO системы и повышающих устойчивость организма к длительному действию липополисахаридного эндотоксина, реализующих своё действие через механизм изменения сродства гемоглобина к кислороду.

**Ключевые слова:** хронический окислительный стресс.

M. E. Kazak, V. V. Zinchuk, I. E. Huljai

## L-ARGININE-NITRIC OXIDE PATHWAY INVOLVEMENT IN ADAPTIVE PROCESSES DURING CHRONIC OXYDATIVE STRESS

It was established that administration of L-arginine in dose of 100 mg/kg, under the action of endotoxin, is characterized by a pronounced increase of hemoglobin oxygen affinity ( $p50_{\text{real}}$  reduced by 8.5%,  $p < 0.01$ ), decreasing peroxidation processes, that prevents oxidation cell damage caused by lipopolysaccharide.

These results indicate the possibility of using physiologically active substances that alter the state of L-arginine-NO pathway and increase the body's resistance to a prolonged action of lipopolysaccharide endotoxin, implementing its action through the mechanism of hemoglobin oxygen affinity changes.

**Key words:** chronic oxidizing stress.

NO является регулятором множества процессов в организме. Эта молекула является универсальным физиологическим регулятором и содержится практически во всех тканях человеческого организма. В настоящее время установлено, что данная субстанция в организме человека непрерывно продуцируется ферментативным путем и выполняет функции универсального мессенджера внутри и межклеточной сигнализации [1]. Биосинтез NO в организме осуществляется путем превращений L-аргинина под влиянием специфического фермента NO-синтазы (NOS) и является кислородзависимым процессом [2]. Существует тесная взаимосвязь между уровнями NO и  $pO_2$ : кислород является важным фактором, который определяет активность NOS в гипоксических тканях или в сосудистом русле [3]. Известно, что в условии развития неконтролируемого воспалительного процесса, вызванного действием ЛПС, генерируемые макрофагами и нейтрофилами реактивные соединения кислорода и азота, способствуют развитию окислительного и нитрозивного стресса, что проявляется изменением активности антирадикальной ферментативной защиты, функционирования цепи электронного транспорта, окислительного фосфорилирования, снабжения кислородом тканей [4].

В результате окислительно-восстановительных реакций, в организме постоянно происходит генерация активных форм кислорода (АФК), обладающих высокой способностью вызывать окислительную модификацию биополимеров: белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот. При поступлении ЛПС в общий кровоток происходит усиление генерации АФК, что приводит к развитию окислительного стресса, который сопровождается изменением снабжения кислородом тканей и как результат существенными нарушениями метаболизма в организме [4]. Кислородзависимый механизм образования свободных радикалов предполагает участие кислородтранспортной функции (КТФ) крови в процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ). Несмотря на имеющиеся работы, посвященных изучению эффектов и механизмов действия ЛПС на организм, вопрос об изменении кислородсвязывающих свойств крови и других, связанных с ними процессов, в условии окислительного стресса, индуцированного многократным введением ЛПС, остается до конца не изученным, что и предопределило интерес к данной проблеме.

Цель исследования – на основе оценки характера изменений кислородтранспортной функции крови крыс после

многократного введения липополисахарида, определить возможность их коррекции с помощью веществ, изменяющих активность L-аргинин-NO системы.

**Материалы и методы.** Экспериментальная часть работы была выполнена на лабораторных крысах-самцах массой 200–250 г. Животные содержались в условиях университетского вивария при свободном доступе к воде и пище, при искусственном освещении: 12 ч (день) – 12 ч (ночь); стандартизации температурного режима (20–22 °C), умеренной влажности и искусственной вентиляции помещения. Исследования проводили в первой половине дня (7:00–12:00). Манипуляции на животных выполнялись в условии адекватной анальгезии, в соответствии с рекомендациями, которые разработаны Европейской комиссией по защите используемых в экспериментах на животных и с решения комиссии по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета. С учетом проведенного анализа литературы и техники постановки эксперимента, была избрана модель трехкратного интраперитонеального введения ЛПС *E. coli* (Serotype O111:B4, «Sigma») в дозе 5 мг/кг с интервалом между инъекциями 1 сутки. Исследуемые эффекты оценивали через 12 часов после последнего введения ЛПС. Животным контрольной группы вводили интраперитонеально болюсно 1,0 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Температуру тела измеряли перед забором крови с помощью электротермометра ТПЭМ-01, датчик которого находился в прямой кишке животного на глубине 5 см.

Для коррекции L-аргинин-NO системы использовали внутривенное введение L-аргинина в дозе 100 мг/кг, неселективного ингибитора NOS (L-NAME (Nw – L-аргинин метиловый эфир) в дозе 20 мг/кг), селективного ингибитора iNOS (АГ (аминогуанидин) в дозе 100 мг/кг), а также применяли их сочетание: L-аргинин и L-NAME, L-аргинин и АГ в тех же дозах. Данные физиологически активные соединения вводились через 15 минут после инъекции ЛПС, предварительно растворимые в 0,9% NaCl. Методику введения L-аргинина, L-NAME применял J. Jaworek et al. [5] в своих исследованиях по изучению влияния многократного введения ЛПС на функционирование поджелудочной железы, в условиях действия модуляторов синтеза NO. Данный способ введения АГ у крыс применяется при изучении длительного воздействия эндотоксина на организм в условиях коррекции NO-синтезирующих функций.

В условиях адекватного наркоза (50 мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально) проводили забор смешанной

венозной крови из правого предсердия. Забор крови (10 мл) осуществляли через 12 часов после последней инъекции ЛПС, в предварительно подготовленный шприц с количеством гепарина из расчета 50 ЕД на 1 мл крови. Кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут для разделения плазмы и эритроцитов. Продукцию NO оценивали по суммарному содержанию нитрат/нитритов в плазме крови с реактивом Грисса. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Все показатели проверялись на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка, Манна-Уитни. Достоверными считались отличия при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Трехкратное введение крысам липополисахарида (с интервалом 1 сутки) внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг приводит к увеличению сродства гемоглобина к кислороду при реальных значениях pH,  $pCO_2$  и температуры ( $p50_{\text{реал}}$  снижается на 4,7%,  $p < 0,01$ ) и характеризуется сдвигом прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону усиления свободно-радикальных процессов (рост ДК и МДА, снижение активности каталазы). Введение L-аргинина в дозе 100 мг/кг, в условиях действия эндотоксина, характеризуется более выраженным повышением сродства гемоглобина к кислороду ( $p50_{\text{реал}}$  снижается на 8,5%,  $p < 0,01$ ) и приводит к уменьшению активности процессов перекисного окисления липидов, уменьшая процессы перекисаации, что предупреждает окислительные повреждения клеток, вызываемые липополисахаридом.

Суммарное содержание нитрат/нитритов в сравнении с контрольными животными увеличивается во всех экспериментальных группах. Так, введение эндотоксина приводило к повышению концентрации данного показателя с  $17,89 \pm 1,26$  до  $41,52 \pm 3,79$  мкмоль/л ( $p < 0,01$ ), L-аргинина до  $29,27 \pm 1,33$  мкмоль/л ( $p < 0,01$ ), L-NAME до  $40,74 \pm 3,38$  мкмоль/л ( $p < 0,01$ ), совместное введение L-аргинина с L-NAME увеличало до  $33,72 \pm 3,11$  мкмоль/л ( $p < 0,01$ ), инъекция с АГ до  $26,84 \pm 1,76$  мкмоль/л ( $p < 0,01$ ), а его сочетание с L-аргинина до  $31,43 \pm 1,30$  мкмоль/л ( $p < 0,01$ ), по отношению к контролю. Однако, в сравнении с группой животных получавших только ЛПС, введение модуляторов L-аргинин-NO системы сопровождалось снижением суммарного содержания нитрат/нитритов: L-аргинин уменьшал данный показатель на 29,51% ( $p < 0,01$ ), АГ на 35,36% ( $p < 0,01$ ), а их сочетание на 24,31% ( $p < 0,05$ ).

ЛПС от *E. coli* стимулирует экспрессию иNOS, увеличивая избыточную продукцию NO, а также вызывает нарушение активности эNOS в различных органах, что обуславливает дисбаланс L-аргинин-NO системы и изменение физиологической роли NO [6]. В данной работе продукцию NO оценивали по суммарному содержанию нитрат/нитритов. Так, после трех-

кратного введения эндотоксина данный показатель увеличился, что косвенно указывает на увеличение образования NO. Однако, в условиях коррекции L-аргинин-NO системы (введение L-аргинина, АГ и их сочетание) наблюдалось снижение этого параметра.

Таким образом, установлено, что трехкратное введение крысам липополисахарида (с интервалом 1 сутки) внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг приводит к увеличению сродства гемоглобина к кислороду при реальных значениях pH,  $pCO_2$  и температуры ( $p50_{\text{реал}}$  снижается на 4,7%,  $p < 0,01$ ), повышению концентрации нитрат/нитритов в плазме крови (на 132,1%,  $p < 0,01$ ) и характеризуется сдвигом прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону усиления свободно-радикальных процессов (рост ДК и МДА, снижение активности каталазы).

Введение L-аргинина в дозе 100 мг/кг, в условиях действия эндотоксина, характеризуется более выраженным повышением сродства гемоглобина к кислороду ( $p50_{\text{реал}}$  снижается на 8,5%,  $p < 0,01$ ), уменьшая процессы перекисаации, что предупреждает окислительные повреждения клеток, вызываемые липополисахаридом.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения физиологически активных веществ, изменяющих состояние L-аргинин-NO системы и повышающих устойчивость организма к длительному действию липополисахаридного эндотоксина, реализующих своё действие через механизм изменения сродства гемоглобина крови.

### Литература

1. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species / D. A. Wink [et al.] // Toxicology Letters. – 1995. – Vol. 82. – P. 221–226.
2. LeCras, T. D. Nitric oxide production in the hypoxic lung / T. D. LeCras, I. F. McMurtry // Am. J. Physiol. – 2001. – Vol. 208, № 4. – P. 575–582.
3. Whorton, A. R. Regulation of nitric oxide synthesis by oxygen in vascular endothelial cells / A. R. Whorton, D. B. Simonds, C. A. Piantadosi // Am J. Physiol. – 1997. – Vol. 16. – P. 1161–1166.
4. Роль свободных радикалов азота и кислорода в патогенезе ЛПС-индуцированной эндотоксими / Т. В. Саникидзе [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 2. – С. 172–176.
5. Protective role of endogenous nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide-induced pancreatic damage (a new experimental model of acute pancreatitis) / Jaworek [et al.] // J Physiol Pharmacol. – 2000. – Vol. 51, № 1. – P. 85–102.
6. Глебов, А. Н. Кислородтранспортная функция крови крыс при введении липополисахарида в условиях коррекции L-аргинин-NO системы / А. Н. Глебов, В. В. Зинчук // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2005. – Т. 91, № 9. – С. 1052–1059.