

УДК 612.592.:616-001.18): 612.398.145.1

ЗНАЧЕНИЕ L-АРГИНИН-НО СИСТЕМЫ В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ГИПОТЕРМИИ

Л.В. Дорохина, В.В. Зинчук

Гродненский государственный медицинский университет

Монооксид азота выполняет многочисленные физиологические функции, в том числе участвует в обеспечении организма кислородом и поддержании температурного баланса. Анализируются особенности взаимодействия гемоглобина с монооксидом азота, имеющие важное значение для формирования кислородтранспортной функции крови и поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия при гипотермии.

Ключевые слова: монооксид азота, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, сродство гемоглобина к кислороду, гипотермия

Nitric oxide have many physiological functions, including its significance in oxygen delivery and temperature balance. We have analyzed the interactions between nitric oxide and hemoglobin which are important for blood oxygen transport and maintenance of prooxidant-antioxidant balance during hypothermia.

Key words: nitric oxide, lipid peroxidation, antioxidants, hemoglobin-oxygen affinity, hypothermia

Среди факторов, обеспечивающих поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия, важное значение имеет монооксид азота (NO), обладающий широким спектром действия в организме [4]. Аминокислота L-аргинин, которая поступает в клетку с помощью специфического транспортующего фактора, является естественным предшественником NO в организме [9]. Под влиянием фермента NO-синтазы, который осуществляет синтез NO, происходит инкорпорирование молекулярного кислорода к атому азота из терминального участка гуанидиновой группы L-аргинина с образованием L-цитруллина, который может снова рециклироваться, пополняя запасы L-аргинина [25]. Для образования NO необходим кислород, поскольку именно из него образуется супероксидный радикал, который включается в гуанидиновую группу L-аргинина. Таким образом, NO-синтазный механизм - это синтез NO при наличии O_2 . Тем не менее при гипоксиях различного генеза может активироваться другой механизм синтеза NO, что связано с восстановлением анионов NO_2^- в NO. Возможная последовательность метаболических преобразований: L-аргинин \rightarrow NO \rightarrow NO_2^-/NO_3^- \rightarrow NO - формирует цикл оксида азота [9]. Известно, что NO участвует в обеспечении организма кислородом (регуляция сосудистого тонуса, взаимодействие с гемоглобином) и поддержании температурного баланса [36]. При взаимодействии NO с молекулами-мишенями происходит перенос электронов в реакциях нитрования, нитрозирования и нитрозилирования молекул-мишеней *in vivo*, данный

механизм существенно отличается от выявленных до сих пор путей действия нейротрансмиттеров и гормонов [27].

При гипотермии изменяется активность L-аргинин-NO системы, наблюдается снижение конечных продуктов элиминации NO и нитрозогемоглобина [30], однако многие аспекты действия NO на транспорт O_2 кровью в этих условиях не ясны. Поэтому нами было проведено изучение показателей кислородтранспортной функции (КТФ) крови у крыс в условиях модификации L-аргинин-NO системы при гипотермии. Подробно условия эксперимента описаны нами ранее [5]. Результаты исследований свидетельствуют о защитном эффекте L-аргинина при введении непосредственно перед охлаждением, связанном с изменениями КТФ крови и ослаблением возникающей гипоксии. В условиях модуляции L-аргинин-NO системы степень снижения ректальной температуры была наиболее выражена при ингибировании NO-синтазы и менее - при инфузии L-аргинина (300 мг/кг). Во всех гипотермических группах развивался метаболический ацидоз и гиперкапния, наименее выраженные в группе, получавшей непосредственно перед охлаждением L-аргинин. Величина стандартного $p50$ при введении L-аргинина увеличивалась, а нитропруссид натрия - уменьшалась. С учетом изменения pH, pCO_2 и температуры его реальное значение уменьшалось более чем на 10 мм рт. ст., что существенно уменьшает поток кислорода в ткани и, несмотря на значительно сниженную потребность в нем в связи с изменением температуры

тела, будет способствовать возникновению гипоксического состояния. У получавших L-аргинин - исходный субстрат синтеза NO, сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево был наименьшим, что в большей степени способствовало компенсации недостатка O_2 [37].

Наблюдаемое в наших экспериментах антиоксидантное действие L-аргинина, может быть обусловлено как меньшим снижением pH и уменьшением ацидоза, так и образуемым в физиологических количествах NO и последующим его взаимодействием с O_2^- и H_2O_2 в условиях, при которых его главным эффектом является устранение этих радикалов [16]. NO в данном случае действует как эндогенный гаситель свободных радикалов. В его присутствии цитотоксичность O_2^- или H_2O_2 заметно сокращается [34], в то время как введение нитропруссид натрия вызывает образование избыточного количества NO, который при наличии больших количеств супероксиданиона образует мощный окислитель – пероксинитрит [21], что приводит к усилению процессов пероксидации. Известно, что при недостатке L-аргинина в клетках NO-синтаза начинает восстанавливать кислород до супероксидного анион-радикала и перекиси водорода [24]. Такие условия могут быть следствием нарушения транспорта L-аргинина, поскольку развивающаяся гипоксия снижает транспорт и синтез этой аминокислоты, который осуществляется в цикле мочевины печени [32]. Показано, что при гипоксии резко усиливается утилизация L-аргинина. Это, с одной стороны, может являться следствием активации NO-синтазной компоненты цикла оксида азота, а с другой – отражать усиленное использование этой аминокислоты при гипоксии в цикле трикарбоновых кислот [9].

Анализируя роль L-аргинин-NO системы в механизмах развития устойчивости к холодовому воздействию, необходимо учитывать особенности взаимодействия NO с гемоглобином. NO имеет высокое сродство к нему, и при взаимодействии с оксигемоглобином превращается в ион нитрата, образуя в качестве побочного продукта метгемоглобин, при соединении с дезоксигемоглобином NO образует стабильную молекулу нитрозогемоглобин, которая затем превращается в нитрат и метгемоглобин [29]. Как известно, гемоглобин играет важную роль в элиминации NO, более того, образуемый нитрозогемоглобин может быть источником NO на

уровне микроциркуляции [31]. Показано, что гемоглобин переносит NO в виде S-нитрозоцистеина из лёгких в периферические ткани, что предполагает участие этого цикла в регуляции сосудистого давления и эффективной доставки O_2 на уровне капиллярного русла как у взрослых животных, так и у плода [15]. В гипоксических тканях происходит повышенное высвобождение NO из нитрозоформ, что приводит к снижению регионального сосудистого сопротивления и улучшению транспорта кислорода, путем достижения соответствия региональных потребностей в кислороде и кровотока [6]. Возможно, протекторный эффект L-аргинина связан с улучшением физических свойств крови в условиях глубокой гипотермии: уменьшением общего периферического сосудистого сопротивления, вязкости крови и улучшением проходимости микроциркуляторного русла.

Взаимодействие гемоглобина с NO имеет важное значение для формирования КТФ крови, в частности, сродства гемоглобина к кислороду, однако влияние NO неоднозначно [36]. Образование метгемоглобина и нитрозогемоглобина ведет к повышению сродства гемоглобина к кислороду, напротив, образование нитрозилгемоглобина его снижает [29]. По данным Kosaka H. и Seiyama A. [20], высокие дозы нитроглицерина (донора NO) вызывают образование HbNO, коррелируя при этом со значением p50 и соответствующим сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо. Кроме этого, NO может влиять на сродство гемоглобина к кислороду через конформационные изменения Hb (R- и T-структуры) [18].

Анализ спектров гемоглобина, обработанного пероксинитритом, указывает, что в присутствии CO_2 , оксигемоглобин окисляется до феррильной формы, что предполагает новый путь зависимого от пероксинитрита окисления гемоглобина, преобладающего в биологических системах, содержащих CO_2 [23], что может иметь важное значение в модификации его функциональных свойств и участия в формировании потока кислорода в ткани и поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме.

Изменение сродства гемоглобина к кислороду, вызванное введением в организм модуляторов L-аргинин-NO системы, регулируя поступление кислорода в ткани, может участвовать в формировании прооксидантно-антиоксидантного равновесия

[35, 38]. Свободнорадикальный гомеостаз клеток и тканей обеспечивается согласованными ферментативными и неферментативными системами генерации активных форм кислорода, с одной стороны, и системами их элиминации - с другой [22, 37]. Глубокая гипотермия сопровождается смещением баланса в сторону избыточной генерации свободных радикалов и возникновением дефицита антиоксидантов, что, в свою очередь, оказывает существенное влияние на химический состав биологических мембран, их ультраструктурную организацию, проницаемость, активность мембранных ферментов [8].

Защитный эффект L-аргинина, возможно, связан и с тем, что он предупреждает истощение антиоксидантного потенциала тканей [8]. Наблюдаемое в наших экспериментах менее выраженное снижение количества а-токоферола у крыс, получавших L-аргинин, может содействовать утилизации свободных радикалов, модификации активности антиоксидантных ферментов, стабилизации клеточных мембран [3]. Известно, что экзогенный L-аргинин при введении в реперфузат в условиях глубокой гипотермии (20°C) улучшает восстановление механической функции сердца и коронарного кровотока путем стимуляции выработки NO [12]. Введение L-аргинина при ишемически-реперфузионном повреждении печени ведет к нормализации тканевого pO_2 и восстановлению кровотока после ишемии [33].

Кроме того, после установления локализации NO-синтазы на внутренней митохондриальной мембране описаны эффекты прямого влияния продукции NO на функционирование дыхательной цепи [17]. Прямое измерение продукции NO в интактных митохондриях подтвердило гипотезу, что оксид азота, продуцируемый митохондриями, изменяет показатели дыхания и синтеза АТФ через ингибирование цитохромоксидазы [14]. Последняя осуществляет его преобразование до NO_2^- , NO_3^- и других продуктов. В зависимости от «выбора» на митохондриальном уровне субстрата окисления, определяемого физиологическими условиями, уровень продукции NO также может изменяться. Дыхательная цепь митохондрий является источником не только макроэргов, но и мощным регулятором кислородзависимых свободнорадикальных процессов в клетке. Поэтому поддержание оптимального функционального состояния митохондрий в усло-

виях сниженного парциального давления кислорода может выступать одним из ведущих средств коррекции энергообеспечения [7, 28].

Учитывая происходящие при гипотермии нарушения энергообмена и кислородзависимую природу перекисного окисления липидов (ПОЛ), представлялся значимым дальнейший поиск путей нормализации происходящих нарушений и средств повышения холодовой устойчивости.

Так, известно, что карнитин замедляет процессы ПОЛ, активирует утилизацию свободных жирных кислот, осуществляя их транспорт в митохондрии, тормозит падение уровня макроэргических фосфатов [2, 10]. Согласно литературным данным, использование для защиты от гипоксии головного мозга и миокарда в условиях искусственного кровообращения и гипотермии ингибиторов свободнорадикальных процессов, в том числе карнитина, оказывает благоприятный эффект [1]. Установлено положительное действие карнитина при острой сердечной недостаточности [10]; при дилатационной кардиомиопатии [19].

Нами в условиях глубокой гипотермии на фоне курсового введения карнитина и L-аргинина изучены показатели ПОЛ и антиоксидантной системы тканей крыс. Доказано, что курсовое введение карнитина (в/б 200 мг/кг, 4 недели) оказывает выраженное ингибирующее действие на ПОЛ и приводит к наименьшему истощению антиоксидантной защиты при охлаждении организма [5]. Отсутствие защитного эффекта при хроническом введении L-аргинина (в/б 500 мг/кг, 10 дней), возможно, объясняется быстрым снижением концентрации экзогенного L-аргинина вследствие его ускоренной утилизации, так как образующийся NO, обладает высокой химической активностью, и его свободные молекулы могут перехватываться различными эндогенными ловушками. В печени уровень L-аргинина остается повышенным только 30 минут после введения, а в плазме крови до - 180 минут [11].

Таким образом, коррекция нарушений возникающих при глубокой гипотермии, может быть достигнута как прямым воздействием на L-аргинин-NO систему, так и опосредована через модификацию сродства гемоглобина к кислороду, что оптимизирует течение обменных и энергетических процессов в клетке.

Литература

1. Бокерия Л. А., Лобачева Г. В., Ваничкин А. В. и др. Противоишемическая защита головного мозга и миокарда после радикальной коррекции врожденных пороков сердца синего типа в условиях искусственного кровообращения и гипотермии с использованием ингибиторов свободнорадикальных процессов // Грудная и сердечно-сосуд. хирург. – 2000. - № 1. – С. 42-45.
2. Быков И. Л., Нефедов Л.И. L – карнитин: общая характеристика, биосинтез, метаболизм и функции в организме млекопитающих / / Здравоохранение. – 2000. - № 8. – С. 35-40.
3. Васількова Т.У., Кухта В.К. Колькасць прадуктаў перакіснага акіслення ліпідаў і стан антыаксіляльнай ахоўнай сістэмы эрытрацытаў ва ўмовах ахаладжэння арганізма // Весці АН Беларусі. / сер. біял. навук. - 1988. - № 5. - С. 64-76.
4. Висмонт Ф.И., Зинчук В.В. Об участии монооксида азота в процессах поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия и температуры тела у крыс при перегревании // Доклады НАН РБ. - 1999. - №1. - С.84 -87.
5. Дорохина Л.В., Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // Весці НАН РБ / сер. біял. навук. - 2000. - № 4. - С. 87-90.
6. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиол. наук. - 2003. - Т. 34, № 2. - С. 33-45.
7. Кургалюк Н.Н. Оксид азота как фактор адаптационной защиты при гипоксии // Усп. физиол. наук. – 2002. – Т. 33, № 4. – С. 65-79.
8. Львова С.П., Горбунова Т.Ф., Абаева Е.М. Влияние гипотермии и даларгина на перекисное окисление липидов в тканях крыс // Вопр. мед. химии. - 1993. - Т. 39. - С. 21 - 24.
9. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е. и др. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. - М.: Наука, 1998. - 159 с.
10. Симоненко В.Б., Тесля А.Н. Применение карнитина и солкосерила в комплексном лечении больных инфарктом миокарда пожилого и старческого возраста // Клини. медицина. - 1998. - № 1. – С. 42-45.
11. Сныткина И.В. и др. Влияние экзогенного L-аргинина на обмен углеводов и аминокислот // Мат. междунар. науч. конфер. «Биологически активные соединения в регуляции метаболического гомеостаза». – 2000. – Ч. II. – С. 207-211.
12. Amrani M., Gray C.C., Smolenski R.T. et al. The effect of L-arginine on myocardial recovery after cardioplegic arrest and ischemia under moderate and deep hypothermia // Circulation. - 1997. - Vol. 96. - P. 274-279.
13. Beaumier L., Castillo L., Ajami A. et al. Urea cycle intermediate kinetics and nitrate excretion at normal and «therapeutic» intakes of arginine in humans // Am. J. Physiol. - 1995. - Vol. 269. - P. 884-896.
14. Boruraite V., Brovn C. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide / / Biochem. J. - 1996. - Vol. 315. - P. 295-299.
15. Funai E.F., Davidson A., Seligman S.P. et al. S-nitrosohemoglobin in the fetal circulation may represent a cycle for blood pressure regulation // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1997. – Vol. 239. – P. 875-877.
16. Gaboury J., Woodman R.C., Granger D.N. et al. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide // Am. J. Physiol. - 1993. - Vol. 265, № 3-2. - P. H862-867.
17. Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism // Biochem. J. - 1998. - Vol. 332. - P. 673-679.
18. Head C.A., Brugnara C., Martinez-Ruiz R. et al. Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo // J. Clin. Invest. - 1997. - Vol. 100, № 5. - P.1193-1198.
19. Keene B.W. Pathogenesis of Canine Dilated Cardiomyopathy // Lecture: 4th Annual Congress. - 1994, Brussels, Eur. Soc. of Vet. Inter. Med. (EVSIM).
20. Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues // Biochem. Res. Commun. – 1996. – Vol. 218. – P. 749-752.
21. Lee C.I., Liu X.P., Zweier J.L. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxyinitrite // J. Biol. Chemist. – 2000. – Vol. 275. – P. 9369-9376.
22. McCord J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress // Am. J. Med. – 2000. – Vol. 108. – P. 652-659.
23. Minetti M., Scorza G., Pietraforte D. Peroxynitrite induces long-lived tyrosyl radical(s) in oxyhemoglobin of red blood cells through a reaction involving CO₂ and a ferryl species // Biochem. - 1999. - Vol. 38, № 7. - P. 2078-2087.
24. Mohazzab K., Fayngersh R., Wolin M. Nitric oxide pulmonary artery catalase and H₂O₂-associated relaxation // Am. J. Physiol. - 1996. - Vol. 40. - P. H1900-1906.
25. Moncada S., Higgs E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway // New Engl. J. Med. - 1993. - Vol. 329, № 27. - P. 2002 - 2012.
26. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology // Pharmacol. Rev. -1991. - Vol. 44, № 2. - P. 109-142.
27. Nakaki T., Fuji T. Nippon-Biological significance of nitration, nitrosation and nitrosylation in vivo // Yakurigaku. Zasshi. – 1998. – Vol. 112. – P. 161-168.
28. Palmeri F., Bisaccia F., Capobianco L. et al. Mitochondrial metabolite transporters // Biochim. Biophys. Acta. - 1996. - Vol. 1275. - P. 127-132.
29. Sakinis A., Wennmalm A. Estimation of total rate of formation of nitric oxide in the rat // Biochem. J. - 1998. - Vol. 330, № 1 - P. 527-532.
30. Steiner A.A., Carnio E.C., Antunes-Rodrigues J. et al. Role of nitric oxide in systemic vasopressin-induced hypothermia // Am. J. Physiol. - 1998. - Vol. 275, № 4 (Pt 2). - P. R937-941.
31. Stepuro I., Chaikovskaya N., Piletskaya T. et al. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin // Pol. J. Pharmacol. - 1994. - Vol. 46. - P. 601-607.
32. Su Y., Block E. Hypoxia inhibits L-arginine synthesis from L-citrulline in porcine pulmonary artery endothelial cells // J. Physiol. - 1995. - Vol. 269. - P. L581-L587.
33. Uhlmann D., Scommotau S., Witzigmann H. et al. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury // Eur. Surg. Res. – 1998. – Vol. 30, № 3. – P. 175-184.
34. Wink D.A., Cook J.A., Pacelli R. et al. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species // Toxicol. Letters. - 1995. - Vol. 82/83. - P. 221 - 226.
35. Zinchuk V. Effect of NO-synthase inhibition on hemoglobin-oxygen affinity and lipid peroxidation in rabbits during fever // Respiration. – 1999. - Vol. 66, № 5. - P. 448-454.
36. Zinchuk V., Borisiuk V. The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats // Respir. Physiol. - 1998. - Vol. 113, № 1. - P. 39-45.
37. Zinchuk V.V., Dorokhina L.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with a modification of L-arginine-NO pathway // Nitric oxide: Biol. and Chemistry. - 2002. - Vol. 6, № 1. - P. 29 - 34.
38. Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., Maltsev A.N. Prooxidant-antioxidant balance in rats under hypothermia combined with modified hemoglobin-oxygen affinity // J. Thermal. Biol. - 2002. - Vol. 27. - P. 345 - 352.