

УДК 612.127.2:612.014.464:616.152.21

# КИСЛОРОДТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Е.В. Шульга

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*В исследовании на кроликах было показано, что селективная коррекция L-аргинин-NO системы аминоксантидином через NO-зависимый механизм улучшает показатели кислородтранспортной функции крови, повышает СГК и участвует в поддержании прооксидантно-антиоксидантного баланса организма через 12 часов после инъекции липополисахарида.*

**Ключевые слова:** аминоксантидин, липополисахарид, кислород, оксид азота, антиоксидант.

*In investigation on rabbits it has been shown that selective correction of the L-arginine-NO system by aminoguanidine through the NO-dependent mechanism improves parameters of oxygen transport function of blood, increases hemoglobin – oxygen affinity and participates in the maintenance of prooxidant-antioxidant balance of the organism 12 hours later after lipopolysaccharide injection.*

**Key words:** aminoguanidine, lipopolysaccharide, oxygen, nitric oxide, antioxidant.

## Введение

Липополисахарид (ЛПС) повышает выработку провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- $\alpha$ , активирует ядерный фактор-карраВ, увеличивает продукцию свободных радикалов [12], при этом также происходит повышение в плазме крови уровня оксида азота (NO) за счет активации индуцибельной изоформы NO-синтазы, увеличение циклооксигеназы-2 в печени, легких, аорте и лимфоцитах [8]. Есть данные о том, что аминоксантидин (АГ) обратимо инактивирует индуцибельную изоформу NO-синтазы, изменяя конформацию белка и ковалентно связываясь с геном, но без изменения его структуры [1]. Он полностью блокирует ЛПС-индуцированную активацию синтеза индуцибельных белков теплового шока HSP70 во всех типах макрофагов и защищает от ЛПС-индуцированного апоптоза [5]. АГ уменьшает нарушения функции почек через NO-зависимый механизм при эндотоксемии у кроликов [17], снижает активность миелопероксидазы, уровень малонового диальдегида (МДА) в крови и тканях, экспрессию индуцибельной изоформы NO-синтазы [16]. Целью данного исследования было изучение параметров кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантного состояния у кроликов в условиях коррекции L-аргинин-NO системы индуцибельной селективным ингибитором изоформы NO-синтазы АГ через 12 часов после введения ЛПС.

## Материалы и методы

Эксперименты проводили на кроликах-самцах ( $n=17$ ) массой 2.5-3.5 кг, которые содержались в стандартных условиях вивария. ЛПС от *E.coli* (Serotype O111:B4, «Sigma» L-2630) в дозе 500 мкг/кг вводили в краевую вену уха животным первой группы ( $n=8$ ). АГ разводили в 0.9 % NaCl и доводили раствор с помощью 0.1 N NaOH до pH=7.4, а затем вводили кроликам второй группы ( $n=9$ ) под-

кожно в дозе 300 мг/кг за 1 час до ЛПС. Забор смешанной венозной крови из правого предсердия и образцов тканей (аорта, сердце, легкие, печень и почки) осуществляли в условиях адекватной анальгезии (30 мг/кг тиопентала натрия внутривенно) через 12 часов после введения ЛПС. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями, подготовленными Европейской комиссией по защите используемых в экспериментах животных, и с разрешения этической комиссии Гродненского государственного медицинского университета.

На микрогазоанализаторе Syntesis-15 «Instrumentation Laboratory» оценивали напряжение кислорода ( $pO_2$ ), содержание кислорода ( $C_vO_2$ ), степень оксигенации ( $SO_2$ ), pH крови, напряжение углекислого газа ( $pCO_2$ ), концентрацию общей углекислоты плазмы ( $TCO_2$ ) и бикарбоната ( $HCO_3^-$ ), реальный и стандартный недостаток/избыток буферных оснований (ABE/SBE), стандартный бикарбонат плазмы (SBC) при температуре 37°C. Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю  $p50$  ( $pO_2$  крови при 50% насыщении ее кислородом). При стандартных условиях ( $T=37^\circ C$ ,  $pH=7.4$ ,  $pCO_2=40$  мм рт.ст.) оценивали  $p50_{\text{станд}}$  [13], а затем рассчитывали  $p50_{\text{реал}}$  для реальных значений этих факторов по формулам Severinghaus J. W. [14]. Продукцию NO определяли по уровню общих нитритов ( $NO_3^-/NO_2^-$ ) в плазме крови с помощью реактива Грисса на спектрофотометре «Solar» PV1251C при длине волны 540 нм [7].

Содержание диеновых конъюгатов измеряли спектрофотометрически по интенсивности УФ-поглощения после экстракции липидов смесью гептана в изопропиловом спирте в области 232-234 нм [2]. Уровень МДА оценивали с помощью 2'-тиобарбитуровой кислоты по интенсивности развивающейся окраски на «Solar» PV1251C при длине волны 535 нм [11]. Содержание  $\alpha$ -токоферола оп-

ределяли в верхнем гексановом слое на спектрофлуориметре «Hitachi F-4010» при  $\lambda_{\text{возб}}=295$  и  $\lambda_{\text{исп}}=326$  нм [4]. Активность каталазы оценивали спектрофотометрически по количеству  $\text{H}_2\text{O}_2$ , израсходованной в реакции с молибденовокислым аммонием, при длине волны 410 нм [6]. Данные результаты представлены в виде  $\bar{x} \pm S_x$ , где  $\bar{x}$  – среднее значение,  $S_x$  – ошибка среднего значения. С учетом малых размеров выборки и отсутствия нормального распределения в группах, статистическую значимость оценивали методом непараметрической статистики для независимых выборок (Mann-Whitney U test). За достоверный принимали уровень статистической значимости  $p < 0.05$ .

**Результаты и обсуждение**

В наших исследованиях коррекция L-аргинин-NO системы в условиях введения ЛПС приводит к изменению показателей кислородтранспортной функции крови (табл.1). Наблюдается повышение рН с  $7.228 \pm 0.02$  до  $7.333 \pm 0.002$  ед. ( $p < 0,05$ ), а также увеличение значений АВЕ на 35.3% ( $p < 0,05$ ),  $\text{pCO}_2$  на 23.8%. ( $p < 0,05$ ), в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС. При окислительном стрессе наблюдается ухудшение кислородтранспортной функции крови, в то время как использование АГ и ЛПС приводит к увеличению показателей  $\text{CvO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{pO}_2$  и гемоглобина на 22.2% ( $p < 0,05$ ), 12.6% ( $p < 0,05$ ), 12.0% ( $p < 0,05$ ) и 9.7% ( $p < 0,05$ ), соответственно.

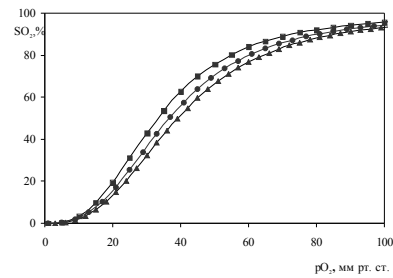
В условиях направленной коррекции L-аргинин-NO системы при введении эндотоксина отмечается снижение показателя  $\text{p50}$  при реальных значениях рН,  $\text{pCO}_2$  и температуры на 6.2% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС, повышение СГК, что соответствует отклонению кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных условиях циркуляции влево (рис.1). В то же время, показатель  $\text{p50}_{\text{станд}}$  остается без изменений.

Применение АГ перед ЛПС приводит к умень-

**Таблица 1** – Показатели кислородтранспортной функции крови у кроликов после введения амингуанидина и липополисахарида ( $\bar{x} \pm S_x$ )

Показатель	Липополисахарид	Амингуанидин и липополисахарид
n	8	9
$\text{p50}_{\text{реал}}$ , мм рт.ст.	$39.2 \pm 0.93$	$36.7 \pm 0.38^{\#}$
$\text{p50}_{\text{станд}}$ , мм рт.ст.	$29.5 \pm 0.45$	$30.1 \pm 0.41$
$T, ^\circ\text{C}$	$39.3 \pm 0.12$	$38.9 \pm 0.06^{\#}$
рН, ед.	$7.288 \pm 0.02$	$7.333 \pm 0.02^{\#}$
Гемоглобин, г/л	$85.4 \pm 2.65$	$93.7 \pm 2.61^{\#}$
$\text{CvO}_2$ , %	$6.64 \pm 0.45$	$8.10 \pm 0.39^{\#}$
$\text{SO}_2$ , %	$59.76 \pm 2.38$	$67.32 \pm 1.45^{\#}$
MetHb, %	$1.08 \pm 0.23$	$1.09 \pm 0.06$
$\text{pO}_2$ , мм рт.ст.	$38.5 \pm 1.45$	$43.1 \pm 1.11^{\#}$
$\text{pCO}_2$ , мм рт.ст.	$28.2 \pm 1.30$	$34.9 \pm 0.67^{\#}$
$\text{HCO}_3^-$ , ммоль/л	$13.64 \pm 0.59$	$16.26 \pm 1.07$
$\text{TCO}_2$ , ммоль/л	$14.49 \pm 0.62$	$17.30 \pm 1.11$
АВЕ, ммоль/л	$-10.98 \pm 0.70$	$-7.10 \pm 0.66^{\#}$
SBE, ммоль/л	$-13.18 \pm 0.79$	$-10.47 \pm 1.30$
SBC, ммоль/л	$15.70 \pm 0.59$	$15.71 \pm 1.04$
$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , мкмоль/л	$22.28 \pm 1.32$	$6.34 \pm 0.51^{\#}$

<sup>#</sup> $p < 0,05$  по отношению к группе введения липополисахарида.



**Рисунок 1** - Кривые диссоциации оксигемоглобина у кроликов при реальных значениях рН,  $\text{pCO}_2$  и температуры в контроле (0,9% NaCl) (■), 12 часов после введения липополисахарида (▲), амингуанидин + липополисахарид (●)

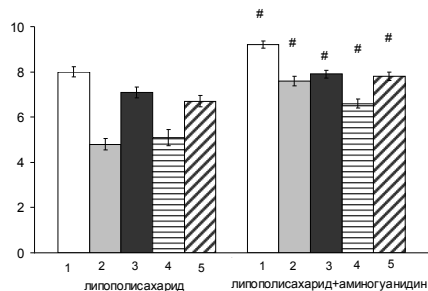
шению NO-продуцирующей активности организма: уровень общих нитритов в плазме крови снижается на 71.5% ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе животных, получавших только ЛПС (табл. 1).

При окислительном стрессе, индуцированном ЛПС, отмечается нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в сторону активации свободнорадикальных процессов. В условиях коррекции L-аргинин-NO системы наблюдается снижение прироста уровня диеновых конъюгатов (табл. 2) на 16.1% в аорте ( $p < 0,05$ ), на 14.8% в сердце ( $p < 0,05$ ), на 20.6% в печени ( $p < 0,05$ ) и на 16.7% в почках ( $p < 0,05$ ), а также уменьшение содержания МДА на 23.1% в аорте ( $p < 0,05$ ), на 20.3% в сердце ( $p < 0,05$ ), на 28.1% в легких ( $p < 0,05$ ), на 16.3% в печени ( $p < 0,05$ ) и на 32.6% в почках ( $p < 0,05$ ), по отношению к группе животных, получавших только ЛПС. Одновременно со снижением активности свободнорадикальных процессов отмечается повышение уровня  $\alpha$ -токоферола (рис. 2) с  $8.0 \pm 0.22$  до  $9.2 \pm 0.16$  мкмоль/г в аорте ( $p < 0,05$ ), с  $4.8 \pm 0.25$  до  $7.6 \pm 0.21$  мкмоль/г в сердце ( $p < 0,05$ ), с  $7.1 \pm 0.24$  до  $7.9 \pm 0.18$  мкмоль/г в легких ( $p < 0,05$ ), с  $5.1 \pm 0.36$  до  $6.6 \pm 0.21$  мкмоль/г в печени ( $p < 0,05$ ), с  $6.7 \pm 0.25$  до  $7.8 \pm 0.18$  мкмоль/г в почках ( $p < 0,05$ ) и активности каталазы (рис. 3) с  $1.6 \pm 0.15$  до  $3.5 \pm 0.21$  ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/г белка в аорте ( $p < 0,05$ ), с  $2.3 \pm 0.33$  до  $3.0 \pm 0.16$  ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/г белка в сердце ( $p < 0,05$ ), с  $1.2 \pm 0.23$  до  $2.7 \pm 0.17$  ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/г белка в легких ( $p < 0,05$ ), с  $1.9 \pm 0.25$  до  $2.8 \pm 0.19$  ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/г белка в печени ( $p < 0,05$ ), с  $3.0 \pm 0.19$  до  $3.9 \pm 0.13$  ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/г белка в почках ( $p < 0,05$ ), в сравнении с группой ЛПС.

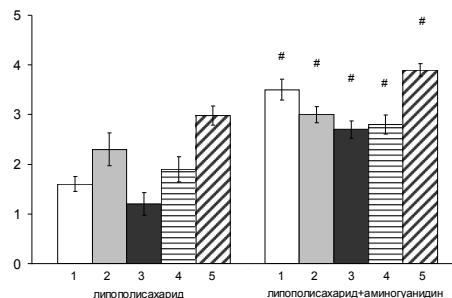
**Таблица 2** – Изменение содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в тканях у кроликов после введения амингуанидина и липополисахарида ( $\bar{x} \pm S_x$ )

Показатель		Липополисахарид	Амингуанидин и липополисахарид
n		8	9
Диеновые конъюгаты, $\Delta\text{D}_{233}/\text{г}$	Аорта	$3.2 \pm 0.13$	$2.7 \pm 0.10^{\#}$
	Сердце	$2.9 \pm 0.13$	$2.5 \pm 0.08^{\#}$
	Легкие	$2.8 \pm 0.17$	$2.5 \pm 0.15$
	Печень	$3.8 \pm 0.33$	$3.0 \pm 0.12^{\#}$
	Почки	$3.8 \pm 0.19$	$3.1 \pm 0.12^{\#}$
Малоновый диальдегид, мкмоль/г	Аорта	$4.0 \pm 0.11$	$3.1 \pm 0.14^{\#}$
	Сердце	$2.6 \pm 0.11$	$2.3 \pm 0.15^{\#}$
	Легкие	$4.1 \pm 0.09$	$2.9 \pm 0.18^{\#}$
	Печень	$1.7 \pm 0.08$	$1.4 \pm 0.06^{\#}$
	Почки	$4.1 \pm 0.07$	$2.8 \pm 0.18^{\#}$

<sup>#</sup> $p < 0,05$  по отношению к группе введения липополисахарида



**Рисунок 2 - Изменение содержания  $\alpha$ -токоферола в тканях у кроликов после введения аминогуанидина и липополисахарида.** По оси ординат – содержание  $\alpha$ -токоферола, мкмоль/г; по оси абсцисс – гомогенаты тканей: 1 – аорта, 2 – сердце, 3 – легкие, 4 – печень, 5 – почки. Примечание: \* $p < 0,05$  по отношению к группе введения липополисахарида



**Рисунок 3 - Изменение активности каталазы в тканях у кроликов после введения аминогуанидина и липополисахарида.** По оси ординат – содержание каталазы, ммоль  $H_2O_2$ /мин/г белка; по оси абсцисс – гомогенаты тканей: 1 – аорта, 2 – сердце, 3 – легкие, 4 – печень, 5 – почки. Примечание: \* $p < 0,05$  по отношению к группе введения липополисахарида

В наших экспериментах АГ, введенный перед инъекцией ЛПС, снижает активность свободнорадикальных процессов и повышает уровень антиоксидантных факторов защиты. Известно, что ЛПС является индуктором индуцибельной изоформы NO-синтазы, под действием которой вырабатывается большое количество NO, обладающего цитотоксическим действием, так как при взаимодействии с супероксид анионом образуется мощный окислитель пероксинитрит [9]. Очевидно, эффекты АГ при окислительном стрессе связаны с уменьшением стабильных метаболитов NO, а также продукции свободнорадикальных молекул ( $O_2^-$ ), и повышением активности супероксиддисмутазы [3].

По результатам наших исследований АГ через NO-зависимый механизм улучшает показатели кислородтранспортной функции крови, повышает СГК и участвует в поддержании прооксидантно-антиоксидантного баланса организма через 12 часов после инъекции ЛПС. Эндотоксин уменьшает венозное  $pO_2$  в почечных сосудах и доставку кислорода к тканям [10], в то время как АГ улучшает доставку и потребление кислорода при эндотоксемии [15]. Введение селективного ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы уменьшает избыточную продукцию NO, что видно по снижению уровня общих нитритов в наших исследованиях, влияет на СГК через образование различных NO-производных: метгемоглобин, нитрозогемоглобин, нитрозилгемоглобин, контролируя процессы оксигенации и поддержание прооксидантно-антиоксидантного баланса организма.

### Выводы

1. Введение селективного ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы через 12 часов после введения липополисахарида снижает активность свободнорадикальных процессов и повышает уровень антиоксидантных факторов защиты.

2. Аминогуанидин через NO-зависимые механизмы влияет на формирование кислородтранспортной функции крови, сродство гемоглобина к кислороду и их участие в оксигенации тканей и поддержании прооксидантно-антиоксидантного баланса организма.

### Литература

1. Бонарцев А.П. и др. Влияние хронического введения аминогуанидина на реактивность легочных сосудов у крыс с монокроталиновой моделью легочной гипертензии // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90, № 7. – С. 908-915.
2. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике – Минск, 2002. – Т. 2. – 463 с.
3. Орлова Е.А. Комаревцева И.А. Роль NO-синтазы в стимуляции опитных рецепторов и устойчивости почек к оксидативному стрессу // Укр. биохим. журн. – 2004. – Т. 76, № 1. – С. 97-102.
4. Рагино Ю.И. и др. Применение новых биохимических способов для оценки окислительно-антиоксидантного потенциала липопротеинов низкой плотности // Клин. лаб. диагн. – 2005. – № 4. – С. 11-15.
5. Малышева Е.В. и др. Роль экстраклеточного и внутриклеточного оксида азота в регуляции клеточных ответов макрофагов // Бюл. эксп. биол. мед. – 2006. – Т. 141, № 4. – С. 386-388.
6. Aruoma O.I., Cuppett S.L. Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro Concepts // New York, AOCSPress, 1997. – 256 p.
7. Bryan N.S., Grisham M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – Vol. 43, № 5. – P. 645-657.
8. Shen K.P. et al. Eugenosedin-A amelioration of lipopolysaccharide-induced up-regulation of p38 MAPK, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 // J. Pharm. Pharmacol. – 2007. – Vol. 59, № 6. – P. 879-889.
9. Kawano T. et al. iNOS-derived NO and nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2007. – Vol. 27, № 8. – P. 1453-1462.
10. Mik E.G., Johannes T., Ince C. Monitoring of renal venous  $pO_2$  and kidney oxygen consumption in rats by a near-infrared phosphorescence lifetime technique // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2008. – Vol. 294, № 3. – F. 676-681.
11. 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. – 291 p.
12. Victor V.M. et al. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy // Curr. Pharm. Des. – 2005. – Vol. 11, № 24. – P. 3141-3158.
13. Scheid P., Meyer M. Mixing technique for study of oxygen-hemoglobin equilibrium: a critical evaluation // J. Appl. Physiol. – 1978. – Vol. 45, № 5. – P. 616-622.
14. Severinghaus J.W. Blood gas calculator // J. appl. Physiol. – 1966. – Vol. 21, № 5. – P. 1108-1116.
15. Tang H.X., Fan X.M. Effect of dexamethasone, aminoguanidine, amrinone on oxygen utilization in endotoxin shock rabbits // Zhonghua Er. Ke. Za. Zhi. – 2003. – Vol. 41, № 4. – P. 282-285.
16. Ogetman Z. et al. The effect of aminoguanidine on blood and tissue lipid peroxidation in jaundiced rats with endotoxemia induced with LPS // J. Invest. Surg. – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 19-30.
17. Wang L., Fan X.M., Tang H.X. Effects of aminoguanidine in different dosages on renal function in endotoxin induced rabbits shock model // Zhonghua Er. Ke. Za. Zhi. – 2004. – Vol. 42, № 3. – P. 206-209.

Поступила 08.04.09