

**УДК 577.121:963**

## **ПОКАЗНИКИ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ В ЕРИТРОЦИТАХ ХВОРИХ НА ЕРИТРЕМІЮ**

*Йолкіна Н.М.<sup>1</sup>, Коношенко С.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Кримський факультет Запорізького національного університету, Сімферополь, Україна*

<sup>2</sup> *Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, Сімферополь, Україна*

*E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

Показано, що в еритроцитах хворих на еритремію спостерігаються зміни у системі синтезу оксиду азоту, які ведуть до переваги неокисного, аргіназного метаболізму над окисним, NO-синтазним метаболізмом L-аргініну і до обмеження накопичення NO-аніонів.

Разом із тим, простежується збільшення вмісту в еритроцитах високомолекулярних продуктів нітрозилування, що може мати певний вплив на структурно-функціональний стан еритроцитарних протеїнів.

**Ключові слова:** еритроцити, система синтезу оксиду азоту, аргіназа, NO-синтази, NO-аніони, низькомолекулярні і високомолекулярні продукти нітрозилування, еритремія.

### **ВСТУП**

За багатьох захворювань відбувається посилення перебігу вільно-радикальних реакцій, що призводить до розвитку оксидативного стресу, залежного від активних форм кисню [1-3].

Разом із тим, за останні роки накопичилося багато даних щодо тісної взаємодії продукції вільних радикалів кисню та оксиду азоту [4]. Дослідження останнього десятиріччя показали, що оксид азоту (NO) є одним із універсальних регуляторів фізіологічних функцій організму з надзвичайно широким спектром біологічної дії [5]. Зокрема, відомо, що в оптимальних концентраціях NO поліпшує ендотеліальну функцію периферичних судин, позитивно впливає на активність деяких протеїніназ, а також може бути інгібітором каспаз, пригнічувати індукцію апоптозу [6, 7]. Але синтез оксиду азоту у надмірних концентраціях може бути причиною нітрозативного стресу, що викликається активними формами азоту, перш за все, пероксинітридом і продуктом його деградації діоксидом азоту [4].

Певним маркером нітрозативного стресу вважається також утворення нітрозотіолів, зокрема, продуктів нітрозилування протеїнів [4].

Все це свідчить про доцільність вивчення процесів, які стосуються метаболізму оксиду азоту, його синтезу і використання в клітинах різного типу як за умов норми, так й за умов патології.

Оскільки за рядом захворювань в патологічний процес залучаються еритроцити [8, 9], метою цієї роботи було вивчення окремих показників системи синтезу оксиду азоту і процесів нітрозилування в еритроцитах хворих на еритремію.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень слугували еритроцити практично здорових людей (25 донорів станції переливання крові) та хворих на еритремію (11 осіб, середній вік 55 років). У кожній групі співвідношення чоловіків та жінок було приблизно однаковим. Кров брали на базі Кримського онкологічного центру при їх вступі до стаціонару, перед початком лікування.

Гемоліз еритроцитів здійснювали у рівному об'ємі дистильованої води, взяв за основу метод Драбкіна [10].

Стан системи синтезу оксиду азоту оцінювали, вивчаючи показники гемолізатів, що характеризують інтенсивність неокисного (аргіназного) та окисного (NO-синтазного) метаболізму L-аргініну.

Інтенсивність неокисного метаболізму L-аргініну оцінювали, визначаючи активність аргінази [11]. Інтенсивність окисного перетворення L-аргініну, що супроводжується синтезом оксиду азоту *de novo*, оцінювали за активністю ізоферментів NO-синтаз – кальцій-залежної, конститутивної (cNOS) і кальцій-незалежної індукцибельної (iNOS) синтази [12].

Відсоткову долю активності cNOS (% cNOS) відповідно сумарної активності NO-синтаз визначали за формулою:

$$\% \text{ cNOS} = \text{cNOS} \cdot 100\% / \text{сума активностей NOS}.$$

Поряд із цим, в гемолізатах еритроцитів визначали вміст стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрит-аніонів ( $\text{NO}_2^-$ ) і нітрат-аніонів ( $\text{NO}_3^-$ ) [13].

Для оцінки процесів нітрозилування визначали вміст низькомолекулярних і високомолекулярних нітрозотіолів [14].

В усіх дослідах використовували спектрофотометричні методи біохімічного аналізу.

Одержані експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

З літератури відомо [4], що при різних патологіях активність кальцій-залежної, конститутивної синтази оксиду азоту (cNOS) є порівняно низькою, але зростає активність кальцій-незалежної, індукцибельної синтази (iNOS), яка в багатьох клітинах індукується запальними цитокінами, інтерлейкіном  $\beta$ , інтерфероном  $\gamma$ . Активація конститутивної NOS здійснюється підвищенням внутрішньоклітинного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  і конститутивно протейніназою В, яка знаходиться під контролем інсулінової сигнальної системи чи сфінгомелінового сигнального каскаду [4, 15].

Як показали результати наших досліджень, в еритроцитах хворих на еритремію суттєво знижується інтенсивність конститутивного синтезу оксиду азоту.

Активність кальцій-залежної конститутивної синтази оксиду азоту визначена на 89% меншою порівняно з контрольною групою донорів (таблиця). Водночас, інтенсивність індукцибельного синтезу оксиду азоту значно зростає. Активність кальцій-незалежної синтази оксиду азоту збільшувалась у 2,0 рази порівняно з контрольною групою.

Таблиця

Показники системи синтезу оксиду азоту і процесів нітрозилювання в еритроцитах хворих на еритремію (відсоткова доля відносно показника контрольної групи<sup>\*</sup>);  $M \pm m$

| Показники | Обстежені групи  |                            |
|-----------|------------------|----------------------------|
|           | Контрольна група | Хворі на еритремію         |
| cNOS      | 100 ± 15,0       | 10,9 ± 0,4 <sup>**</sup>   |
| iNOS      | 100 ± 16,4       | 200,1 ± 33,0 <sup>**</sup> |
| Аргіназа  | 100 ± 8,0        | 285,0 ± 33,0 <sup>**</sup> |
| Arg/NOS   | 100 ± 17,0       | 384,0 ± 39,0 <sup>**</sup> |
| $NO_2^-$  | 100 ± 18,0       | 112,0 ± 16,0               |
| $NO_3^-$  | 100 ± 16,0       | 78,0 ± 10,0                |
| НМНТ      | 100 ± 11,3       | 70,5 ± 9,0                 |
| ВМНТ      | 100 ± 13,5       | 436,0 ± 62,0 <sup>**</sup> |

Примітка: <sup>\*</sup> – контроль – 100%;

<sup>\*\*</sup> – вірогідність відміни показника відносно контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

Доля фізіологічного конститутивного синтезу оксиду азоту в еритроцитах практично здорових людей складала, в середньому, 66% від сумарного синтезу оксиду азоту, тоді як у хворих на еритремію спостерігалось виражене зниження даного показника – до 9,3% від показника контрольної групи.

Оскільки субстратом для NO-синтаз є L-аргінін було важливим дати оцінку неокисного метаболізму цієї амінокислоти, здатної перетворюватися ферментом аргіназою до сечовини та орнітину. Було встановлено, що активність аргінази в еритроцитах хворих на еритремію достовірно зростає: у 2,9 разу порівняно з контрольною групою, що свідчить про активізацію неокисного, аргіназного метаболізму, який конкурує з окисним NO-синтазним метаболізмом L-аргінину. Співвідношення неокисного та окисного метаболізму L-аргінину (Arg/NOS) достовірно зросло в еритроцитах хворих: у 3,8 разу порівняно з контрольною групою.

Вивчення пулів стабільних метаболітів оксиду азоту (нітрит- і нітрат-аніонів) показало, що їх вміст зазнає незначні зміни, які простежуються на рівні тенденції для  $NO_2^-$ . Вміст  $NO_3^-$  в еритроцитах хворих достовірно збільшувався на 22,0 % порівняно з контрольною групою. Це може свідчити або про гальмування процесів окиснення NO (на тлі достатньо високої активності індукцйбельної синтази оксиду азоту), або про більш активне використання NO в інших реакціях метаболізму оксиду азоту, зокрема, в реакціях утворення нітрозотіолів.

Вивчення вмісту в еритроцитах низькомолекулярних і високомолекулярних продуктів нітрозилування показало, що у хворих на еритремію спостерігається суттєве зростання рівня високомолекулярних нітрозотіолів (ВМНТ): у 4,36 разу порівняно з контрольною групою (таблиця). Вміст низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) був на 30,0 % менше.

Оскільки головним представником низькомолекулярних нітрозотіолів є нітрозоглутатіон [4], можна допустити можливість вивільнення глутатіону з процесів нітрозилування для більш активного його використання еритроцитами за умов патології у відновлювальних реакціях.

Разом із тим, досить виражене збільшення вмісту в еритроцитах хворих високомолекулярних нітрозотіолів свідчить про активний перебіг процесів, що ведуть до утворення різних продуктів хімічної модифікації протеїнів, головним чином, гемоглобіну. Нітрозилування гемоглобіну можна було б оцінювати як один з механізмів регуляції його спорідненості до кисню, утворення оксигенованої форми (за умов нітрозилування по залізу гемової групи).

Отже, одержані дані свідчать про те, що за еритремії в еритроцитах відбуваються метаболічні перебудови, які пов'язані з системою синтезу оксиду азоту і ведуть до переваги інтенсивності неокисного, аргіназного метаболізму над інтенсивністю окисного, NO-синтазного метаболізму L-аргініну. Зміни у системі синтезу оксиду азоту разом із відповідними особливостями в утворенні низькомолекулярних і високомолекулярних продуктів нітрозилування можуть мати певне значення, впливаючи на генерування в еритроцитах хворих активних форм азоту, на рівень відновлювальних еквівалентів у формі глутатіону, а також, що цілком імовірно, на функціональний стан окремих протеїнів, зокрема, гемоглобіну.

#### ВИСНОВКИ

1. В еритроцитах хворих на еритремію відбуваються зміни у системі синтезу оксиду азоту, що ведуть до переваги неокисного, аргіназного метаболізму над окисним, NO-синтазним метаболізмом L-аргініну, а також до обмеження накопичення NO-аніонів.
2. За еритремії в еритроцитах змінюється співвідношення низькомолекулярних і високомолекулярних продуктів нітрозилування: суттєво збільшується вміст високомолекулярних нітрозотіолів, що може вплинути на структурно-функціональний стан еритроцитарних протеїнів.
3. Зміни у системі синтезу оксиду азоту, які простежуються в еритроцитах хворих на еритремію, можуть мати певне компенсаторне значення, впливаючи на генерування активних форм азоту і підтримку рівня відновлювальних еквівалентів у формі глутатіону.

#### Список літератури

1. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5-18.
2. Меньшиков Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-169.

3. Меньшиков Е.Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин // Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
4. Сагач В.Ф. Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо- і вазопротекторної дії екдистерону за умов експериментального цукрового діабету I типу / В.Ф. Сагач, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба, О.Д. Присяжна // Фізіол. журн. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 46-54.
5. Аكوпова О.В. Оксид азоту пригнічує відкриття мітохондріальної пори і збільшує кальцієву ємність мітохондрій in vivo / О.В. Аكوпова, А.В. Коцюруба, Ю.П. Ткаченко, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 3-11.
6. Ping P. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric-oxide-induced and ischemia-induced preconditioning / P. Ping, H. Takano, J. Zhang et al // Circulat. Res. – 1999. – V. 84. – P. 587-604.
7. Li J. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes / J. Li, C.A. Bombeck, S. Yang, Y.M. Kim, T.R. Billiar // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 17325-17333.
8. Ёлкина Н.М. Энзиматическая активность эритроцитов человека при ишемической болезни сердца в условиях развития окислительного стресса / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко, И. Шашуа // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – Серия: Биология, химия. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 124-128.
9. Новицкий В.В. Белковый спектр мембран эритроцитов у больных раком легкого и с опухолями головы и шеи / В.В. Новицкий, В.Е. Гольберг, М.В. Колосова и др. // Бюл. эксперим. биол. и медиц. – 1999. – Прил. 1. – С. 18-20.
10. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. biochem. – 1949. – V. 21. – P. 224-226.
11. Шугалей В.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду / В.С. Шугалей, А.С. Козина // Физиол. журн. СССР. – 1977, № 8. – С. 1199-1202.
12. Chin S.Y. Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / S.Y. Chin, K.N. Pandey, S.J. Shi et al // Amer. J. Physiol. – 1999. – V. 277, N 5. – P. 797-804.
13. Green L.L. Analysis of nitrate, nitrite and [N+5]-nitrate in biological fluids / L.L. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski et al // Anal. Biochem. – 1982. – V. 126, N 1. – P. 131-138.
14. Gerdal D. Inhibition of the catalytic activity of alkoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc / D. Gerdal, A.J. Cederbaum // Biochemistry. – 1996. – V. 35, N 50. – P. 16186-16194.
15. Villa Bianca R. Sphingosine 1-phosphate induced endothelial nitric-oxide synthase activation through phosphorylation in human corpus cavernosum / R. Bianca Villa, R. Sorrentino, C. Imbimbo et al // J. Pharmacol. Exp. Therap. – 2006. – V. 316, N 2. – P. 703-708.

**Ёлкина Н.М. Показатели метаболизма оксида азота в эритроцитах больных эритремией / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014 – Т. 27 (66), № 1. – С.64-70.**

Показано, что в эритроцитах больных эритремией наблюдаются изменения в системе синтеза оксида азота, которые ведут к преобладанию неокислительного, аргиназного метаболизма над окислительным, NO-синтазным метаболизмом L-аргинина и к ограничению накопления NO-анионов.

Вместе с этим, прослеживается увеличение содержания в эритроцитах высокомолекулярных продуктов нитрозилирования, что может влиять на структурно-функциональное состояние эритроцитарных протеинов.

**Ключевые слова:** эритроциты, система синтеза оксида азота, аргиназа, NO-синтазы, NO-анионы, низкомолекулярные и высокомолекулярные продукты нитрозилирования, эритремия.