УДК 612.125:612.015.1:547.495.9

О.Я.Скляров, Ю.М. Федевич, О.Я. Мелех, В.В.Стадник

Вплив L-аргініну на антиоксидантну систему та активність $НАДН_2$-залежної метгемоглобінредуктази у крові щурів

Исследовано влияние донора оксида азота – L-аргинина на состояние системы гемоглобина и на ключевые звенья антиоксидантной системы. Установлено ингибирующее влияние гиперпродукции NO на кислородтранспортную функцию гемоглобина, что проявляется в повышении концентрации метгемоглобина и снижении активности метгемоглобинредуктазы. Выявлено повышение активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы та глутатион-S-трансферазы на фоне снижения активности каталазы в гемолизате эритроцитов, что указывает на доминирующую роль системы глутатиона в защите эритроцитарных мембран и гемоглобина от негативного действия оксидативного стресса, индуцированного избытком NO.

ВСТУП

Регуляція дихальної функції крові забезпечується багатьма факторами, серед яких суттєву роль належить оксиду азоту (NO). Це пов'язано з тим, що спорідненість останнього до гемоглобіну у 8000 разів більша, ніж у O_2 [28], і у фізіологічних концентраціях він робить свій внесок у формування киснезв'язувальних властивостей гемоглобіну через утворення метгемоглобіну, S-нітрозогемоглобіну і нітрозилгемоглобіну. Тому значного поширення поширення набуває концепція дихального циклу як системи трьох газів – O_2–CO_2–NO [7, 19]. За умов високого вмісту NO у крові щурів проявляються його цитотоксичні ефекти, що призводить до зміни спорідненості кисню до гемоглобіну, активації процесів вільнорадикального окиснення, ліпопероксидації, окисної модифікації білків [5, 6, 17].

Виявлено тісні взаємовідношення оксиду азоту та глутатіону. Так, NO, перетворюючи радикальну форму глутатіону на нітрозилглутатіон, запобігає розвитку оксидативного стресу. Водночас відновлена форма глутатіону може спричиняти перехід S-нітрозогемоглобіну у нітрозилгемоглобін з вивільненням молекулярного кисню, тим самим відбувається внесок глутатіону у NO-залежну регуляцію киснезв'язувальних властивостей гемоглобіну [19]. Поряд з цим глутатіон – ключовий антиоксидант мембранозв'язаної детоксикаційної системи, яка інактивує токсичні продукти ліпопероксидації. Відтак, підвищення вмісту окисненого еритроцитарного глутатіону призводить до нагромадження в еритроцитах гідроперекисів ліпідів та, як наслідок, зниження активності $НАДН_2$-залежної метгемоглобінредуктази [29, 30]. Метгемоглобінредуктаза – опорний ензим системи, що підтримує адекватні киснезв'язувальні властивості еритроцитарного гемоглобіну і, таким чином, забезпечує належний функціональний стан киснетранспортної системи [16, 20].

Нині недостатньо вивчено зміни активності ензимів глутатіонового циклу та мет-

© О.Я.Скляров, Ю.М. Федевич, О.Я. Мелех, В.В.Стадник

гемоглобінредуктази у крові у взаємозв'язку з процесами ліпопероксидації за умов введення попередника оксиду азоту – L-аргініну і його вплив на функціональні властивості гемоглобіну.

Метою наших досліджень було визначення впливу L-аргініну на активність ензимів глутатіонової системи та метгемоглобінредуктази у взаємозв'язку з процесами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), змінами вмісту продуктів оксиду азоту та лігандних форм гемоглобіну.

МЕТОДИКА

Вміст L-аргініну, активність метгемоглобінредуктази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази, а також вміст гемоглобіну та його похідних визначали в гемолізаті еритроцитів, який отримували з попередньо стабілізованої розчином гепарину крові щурів дослідної та контрольної груп. Вміст NO_2^- та малонового діальдегіду (МДА) визначали в сироватці крові щурів.

Дослідження були проведені на 30 безпородних щурах-самцях масою 250–300 г. Дослідним тваринам внутрішньоочеревинно вводили L-аргінін ("Curtis Healthcare", Польща) у дозі 250 мг/кг, два рази через 6 год, що давало можливість підтримувати його вміст у крові тривалий час і, таким чином, отримати системний і тривалий вплив на досліджувані показники [18]. Забір крові проводили після декапітації тварин.

Гемолізат отримували, здійснюючи гемоліз еритроцитів охолодженою до +4°С дистильованою водою у співвідношенні 1:9. Отриманий гемолізат заморожували та зберігали при -15 °С протягом однієї доби, потім розморожували і визначали досліджувані показники [3]. Визначення активності метгемоглобінредуктази проводили на основі приросту вільного гемоглобіну [4], каталази [9]. Вивчали активність глутатіонпероксидази за допомогою реактиву Елмана [11], глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази [12], концентрацію гемоглобіну метціангідриновим методом [10], МДА [15], продуктів оксиду азоту [22], лігандних форм гемоглобіну [32], L-аргініну [1].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Microsoft Excel (Windows 2000), з визначенням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення L-аргініну призводило до підвищення вмісту метгемоглобіну та загального гемоглобіну (табл. 1), проте відсоток оксиду гемоглобіну у гемолізаті еритроцитів суттєво не змінювався. Згідно з даними літератури введення L-аргініну або інших донорів оксиду азоту призводить до підвищення вмісту метгемоглобіну та спорідненості гемоглобіну до кисню [26].

Після введення L-аргініну його концентрація у крові зростала, паралельно підвищувався вміст МДА та NO_2^- у сироватці та в гемолізаті еритроцитів (табл. 2). Підвищення концентрації L-аргініну активізує процеси ПОЛ у крові, що ймовірно, зумовлено посиленою продукцією пероксинітриту ($ONOO^-$). Підвищення вмісту NO_2^- у гемолізаті еритроцитів у порівнянні з сироваткою крові свідчить про збільшення

Таблиця 1. Зміни вмісту лігандних форм гемоглобіну до та після введення L-аргініну у гемолізаті еритроцитів щурів (M±m; n=10)

Група тварин	Метгемоглобін, %	Оксид гемоглобіну, %	Загальний гемоглобін, мг/мл
Контроль	1,25±0,236	95,56±1,00	128,50±9,56
Дослід	1,97±0,242*	95,18±1,04*	151,16±6,23*

Примітка. Тут і у табл. 2 та 3 *P<0,05 у порівнянні з контролем.

Таблиця 2. Зміни вмісту нітрит–аніона (NO_2^-) у сироватці та гемолізаті та малонового діальдегіду у сироватці крові щурів до та після введення L-аргініну (M±m; n=15)

Група тварин	L-аргінін, мкг/мл	NO_2^-, мкмоль/л		Малоновий діальдегід, мкмоль/мл
		Сироватка	гемолізат	
Контроль	13,58±0,52	2,70±0,27	1,28±0,03	117,0±6,98
Дослід	18,69±0,58*	5,21±0,30*	8,18±0,04*	144,9±4,41*

вмісту NO, який зв'язаний з гемоглобіном. Підвищення вмісту нітрозопохідних у еритроциті впливає на регуляцію киснезв'язувальної функції гемоглобіну.

За фізіологічних умов концентрації зв'язаних форм оксиду азоту та супероксид-аніона (O_2^-) низькі, проте метаболічна ситуація різко змінюється у разі протонування молекули супероксид-аніона чи її приєднання до NO. За цих умов O_2^- здатний викликати цілу низку токсичних ефектів, зокрема активацію ПОЛ, про що свідчить підвищення вмісту МДА.

При введенні L-аргініну спостерігається підвищення активності ензимів антиоксидантного захисту: глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази, глутатіонпероксидази у 3, 7, 2 і 1,6 раза відповідно. Активність каталази зменшується вдвічі (табл. 3).

На фоні посилення вільнорадикальних процесів, що індуковані введенням L-аргініну та утворенням надлишкових кількостей NO, знижується активність $НАДН_2$-залежної метгемоглобінредуктази, яка підтримує відповідний пул відновленого гемоглобіну (рисунок). Імовірно, відбувається ушкодження її активного центру сполуками вільнорадикальної природи, серед яких важливе місце належить пероксинітриту. Можливо, що зниження активності цього ензиму пов'язане з порушенням синтезу $НАДН_2$, що у свою чергу може лімітувати його активність.

Згідно з даними літератури, NO у еритроцитах та ендотеліальних клітинах може брати участь у наступних процесах:

1. L-аргінін ⟶ ендотеліальна NO синтаза ⟶ NO; (ендотеліальні клітини) [2]

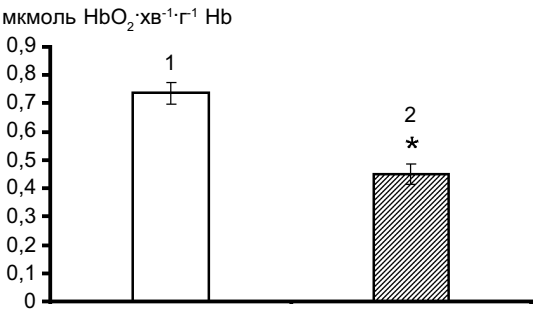
2. $2NO + O_2 + H_2O \longrightarrow 2H^+ + NO_2^- + NO_3^-$; (сироватка крові) [13]

3. $HbsFe^{2+} + NO_2^- + 2H^+ \longrightarrow MetHb^{3+} + NO + H_2O$ (еритроцит)

4. $HbFe^{2+}O_2 + NO_2^- + 2H^+ \longrightarrow$ за фізіологічних умов реакція відбуватися не буде [14]

5. $MetHb^{3+} \longrightarrow$ MetHb редуктаза $\longrightarrow HbFe^{2+} + NO \longrightarrow HbFe^{2+}NO$; (еритроцит) [14]

6. $4(HbFe^{2+}NO + O_2^-) \longrightarrow 4\,HbFe^{2+}ONOO^- + 4H^+ \longrightarrow 2H^+ + 2NO_2^- + 2NO_3^- + H_2O_2 + 4MetHbFe^{3+}$ (еритроцит); $MetHb^{3+} \longrightarrow$ MetHb



Активність $НАДН_2$-метгемоглобінредуктази в гемолізаті еритроцитів щурів при дії L-аргініну.
* P <0,05 у порівнянні з контролем

Таблиця 3. Зміни активності ферментів антиоксидантного захисту у гемолізаті еритроцитів щурів до та після введення L-аргініну (M±m, n=15)

Група тварин	Глутатіонредуктаза, мкмоль НАДФН · $хв^{-1}$ · $г^{-1}$ Hb	Глутатіонтрансфераза, мкмоль GSSG · $хв^{-1}$ · $г^{-1}$ Hb	Глутатіонпероксидаза, мкмоль GSH · $хв^{-1}$ · $г^{-1}$ Hb	Каталаза, мкмоль H_2O_2 · $хв^{-1}$ · $мг^{-1}$ Hb
Контроль	2,29±0,33	2,87±0,24	427,86±7,98	2,34±0,04
Дослід	8,49±0,31*	5,74±0,31*	682,40±6,93*	1,17±0,17*

редуктаза ⟶ $HbFe^{2+}$ (еритроцит) [7, 8].

Отримані нами результати свідчать, що при введенні аргініну, утворений оксид азоту буде взаємодіяти з супероксид-аніоном окиснюючись до пероксинітриту за участю гемоглобіну з утворенням метгемоглобіну і, таким чином, буде впливати на киснезв'язувальні властивості гемоглобіну.

Слід відзначити, що підвищений вміст гемоглобіну при надлишку NO може бути пов'язаний з додатковим надходженням еритроцитів з депо у кров'яне русло, що, ймовірно, є фізіологічною компенсаторною реакцією на тканинний вплив наростаючої гемічної гіпоксії та матиме системне адаптаційне значення.

Глутатіонпероксидаза та каталаза – основні ензими, що інактивують внутрішньоклітинні пероксидні радикали [25, 31]. Співвідношення їх активності змінюється відповідно до особливостей тканинного обміну в цілому та поточних метаболічних умов всередині клітини зокрема.

Імовірно, що активація глутатіонової системи пов'язана з двома наступними аспектами: по-перше, з досить суттєвими значеннями концентрації продуктів перекисного окиснення у еритроцитах, які є більш специфічними для ферментів цього циклу, по-друге, пошкоджувальною дією пероксинітриту на активні центри каталази та глутатіонпероксидази, що у свою чергу може також призводити до зниження їх активності [27].

За таких умов глутатіонзалежна антиоксидантна система виконує детоксикаційну функцію: внаслідок активації глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази збільшується пул відновленого глутатіону. Активація цих ензимів за умов гіперпродукції активних форм кисню, зокрема пероксинітрит аніону, може бути спричинена наступними факторами: підвищенням кількості субстрату (токсичних пероксидів та оксиненого глутатіондисульфіду), нітрозилювання пероксинітрит-аніоном тирозин-активних центрів згаданих ферментів [25] і збільшенням спорідненості активного центру глутатіонредуктази до глутатіондисульфіду [21]. Імовірно, що саме глутатіону належить провідна роль у стабілізації еритроцитарної мембрани та численних мембранних і внутрішньоклітинних білків при оксидативному стресі, що супроводжується активацією глутатіонпероксидази. Особлива роль належить глутатіонпероксидазі, яка забезпечує мембранопротекторну роль і спряжено з метгемоглобінредуктазою запобігає порушенням функціональної здатності гемоглобіну [29].

Підтримання достатньо високого пулу внутрішньоеритроцитарного глутатіону важливе у забезпеченні вже згаданого кооперативного зв'язування NO з гемоглобіном і перетворення S-нітрозоформи оксигемоглобіну на відновлений нітрозогемоглобін і вивільнення кисню в тканини [24].

Внаслідок цих процесів спостерігається утворення метгемоглобіну та збільшення утворення нітрозосполук, що відіграє суттєву роль як на рівні газообміну в альвеолах, так і при віддачі кисню у периферичних капілярах.

ВИСНОВКИ

1. Введення L-аргініну (у загальній дозі 500 мг/кг) призводить до підвищення концентрації оксиду азоту та активації процесів ПОЛ, а також збільшення вмісту метгемоглобіну та загального гемоглобіну в еритроцитах.

2. Надлишок L-аргініну спричинює до пошкодження киснезв'язувальних властивостей гемоглобіну через зниження активності метгемоглобінредуктази, яка разом з глутатіонпероксидазою перешкоджає окисненню гемоглобіну, а, отже, й зниженню його киснетранспортної функції.

3. Надлишки оксиду азоту у крові призводять до активації ферментів глутатіонової

системи, при цьому активність каталази зменшується.

A.Ya. Sklyarov, Yu.M. Fedevych, O.Ya. Meleh, V.V. Stadnyk

ANTIOXIDANT SYSTEM AND $NADH_2$-DEPENDED METHEMOGLOBINEREDUCTASE ACTIVITY CHANGES IN RATS BLOOD UNDER THE L-ARGININE ADMINISTRATION

We investigated the influence of L-arginine, a nitric oxide precursor, on the state of hemoglobin and basic parts of the antioxidant system. We revealed the negative influence of NO hyperproduction on the oxygen transport by haemoglobin, which is manifested by the increase of MetHb concentration and decrease of the MetHb-reductase activity. Also increase of glutathioneperoxidase, glutathionereductase and glutathionetransferase activities were documentated; at the same time catalase activity in the erythrocyte hemolisate was decreased. This can point on the dominating role of glutathione in the protection of erythrocyte membrane and hemoglobin under the condition of oxidative stress, which was induced by NO hyperproduction.

Lviv National Medical University named after Danylo Galytskyi, Lviv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биохимии. – М.: Высш. школа, 1988. – 239 с.
2. Горрен А.К., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимиология синтазы оксида азота // Биохимия. – 1998. – **63**, вып. 7. – С.870 – 880.
3. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. – Одеса: Астропринт, 1998. – 607 с.
4. Дервиз Г.В. Метод определения активности НАДН$_2$ – зависимой метгемоглобинредуктазы в крови (эритроцитах) // Лаб. дело. - 1976. - №4. - С.220–224.
5. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Изменение сродства гемоглобина к кислороду и параметров прооксидантно-антиоксидантного равновесия при введении ЛПС в условиях коррекции L-аргинин–NO-пути // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1999. – **127**, №6. – С.616–619.
6. Зинчук В.В., Борисюк М.В., Корнейчик В.Н. Роль сродства гемоглобина к кислороду в активации перекисного окисления липидов при лихорадке // Там же. – 1996. – **121**, №1. – С. 44–47.
7. Коробов В.М. Роль оксиду азоту в регуляції транспорту газів // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, №4. – С. 13.–18.
8. Коробов В.Н., Климишин Н.И., Павлюк Н.В. и др. Сравнительный анализ кислородосвязывающих и антиоксидантных свойств крови лабораторних животных и ондатры (Ondatra zibethica) // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1995. – **31**, № 3. – С. 369–372.
9. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.
10. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. – М.: Медицина, 1968. – 225 с.
11. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело.- 1986.- №12.- С.724–727.
12. Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Там же. – 1989. – №5. – С.20–23.
13. Реутов В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности // Биохимия. – 2002. – 67, вып. 3. – С.353–376.
14. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Там же. – 1998. – **63**, вып 7. – С.1029–1040.
15. Тимирбулатов Р.А., Селезнев Е.И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
16. Akintonwa D.A. Theoretical mechanistic basis of oxidants of methaemoglobin formation // Med. Hypotheses. – 2000. – **54**, №2 – P. 312–320.
17. Borisiuk M.V., Zinchuk V.V. Analysis of the relationship between hemoglobin-oxygen affinity and lipid peroxidation during fever // Acta Bioch. Pol. – 1995. – **42**, № 1. – P. 69–74.
18. Czako L., Takacs T. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis// Dig. Dis. Sci. – 1998. – **43**. – P.1770–1777.
19. Deem S., Gladwin M.T., Berg J.T. et al. Effects of S-nitrosation of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction and nitric oxide flux // Amer. J. Respir. Crit. Care. Med. – 2001. – **163**, № 5. – P . 1164–1170.
20. Fernandes M.A., Mota I.M., Silva M.T. et al. Human erythrocytes are protected against chromate-induced peroxidation // Ecotoxicol. Environ Saf. – 1999. – **43**, №1. – P. 38–46.
21. Francescutti D., Baldwin J., Lee L., Mutus B. Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site// Protein Engineering. – 1996. – **9**. – P.189–194.
22. Green L.C., Wagner D.A.et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**. – P.131–138.
23. Gross S.S., Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – **96**, №18. – P. 9967–9969.
24. 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. – **100**, №5. – P.1193–1198.
25. Helmut S., Sharov V., Klotz L., Briviba K. Glutathione Peroxidase Protects against Peroxynitrite-mediated Oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 27812–27817.
26. Hrinczenko B.W., Alayash A.I., Wink D.A. et al. Effect of nitric oxide and nitric oxide donors on red blood cell oxygen transport // Brit. J. Haematol. – 2000. – **110**. – P. 412–419.
27. Jones D.P., Eklow I., Thor H., Omenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relatives contributions of catalase and glutathione peroxides in descomposition of endogenously generated hydrogen peroxide // Arch. Biochem. Biophys. – 1981. – **210**. – P.505–516.
28. Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – **218**, №3. – P.749–752.
29. Kozlova N., Slobozhanina E., Antonovich A. et al. Effect of reduced and oxidized glutathione on physicochemical properties of erythrocyte membranes// Biofizika. – 2001. – **46**. – P. 467–470.
30. Lukyanenko L., Kozlova N., Slobozhanina E. Activity of membrane-bound NADH-methemoglobin reductase and physical state of lipids in erythrocyte membranes/ / Bioelectrochemistry. – 2004 – **62**. – P. 191–193.
31. Nagababu E., Francis J. et al. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase // Biochim. Biophys Acta. – 2003. – **1620**. – P. 211–217.
32. Zwart A., Bursa A., van Kampen E.J. at al. A multi "wavelenght" spectrophotometric method for the simultaneous determination of five hemoglobin derivatives // J. Clin. Chem and Clin. Biochem. – 1981. – **19**. – P. 457–463.

Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького

Матеріал надійшов до редакції 12.10.2006