

УДК 577.121:963

## ПРОЦЕСИ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ І НІТРОЗИЛЮВАННЯ В ЕРИТРОЦИТАХ ХВОРИХ НА АПЛАСТИЧНУ АНЕМІЮ

*Йолкіна Н.М.<sup>1</sup>, Коношенко С.В.<sup>2</sup>, Коцюруба А.В.<sup>3</sup>, Добровольський Ф.В.<sup>3</sup>*

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

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

<sup>3</sup>*Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*

*E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

Показано, що в еритроцитах хворих на апластичну анемію 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, апластична анемія.

### 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 нітрозилювання в еритроцитах хворих на апластичну анемію (аплазію кісткового мозку).

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень слугували еритроцити практично здорових людей (25 донорів станції переливання крові) та хворих на апластичну анемію (11 осіб, середній вік 56,0 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 нітрозилювання визначали вміст низькомолекулярних і високомолекулярних нітрозотіолів [14].

В усіх дослідках використовували спектрофотометричні методи біохімічного аналізу.

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

## 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 апластичну анемію суттєво знижується інтенсивність конститутивного синтезу оксиду азоту.

Активність кальцій-залежної конститутивної синтази оксиду азоту визначена на 43% меншою порівняно з контрольною групою донорів (таблиця). Водночас, інтенсивність індукцйбельного синтезу оксиду азоту значно зростає. Активність кальцій-незалежної синтази оксиду азоту збільшувалась у 3,2 разу порівняно з контрольною групою.

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 апластичну анемію спостерігалось виражене зниження даного показника – до 26,0% 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 апластичну анемію достовірно зростає: у 2,0 разу порівняно з контрольною групою, що свідчить про активізацію неокисного, аргіназного метаболізму, який конкурує з окисним NO-синтазним метаболізмом L-аргініну. Співвідношення неокисного та окисного метаболізму L-аргініну (Arg/NOS) достовірно зросло в еритроцитах хворих: у 1,5 разу порівняно з контрольною групою.

Таблиця

**Показники системи синтезу оксиду азоту і процесів нітрозилювання в еритроцитах хворих на апластичну анемію (відсоткова доля відносно показника контрольної групи\*); М ± m**

Показники	Обстежені групи	
	Контрольна група	Хворі на апластичну анемію
cNOS	100 ± 15,0	57,0 ± 4,5**
iNOS	100 ± 16,4	320,0 ± 45,0**
% c NOS	66,3 ± 6,4	26,0 ± 3,5**
Аргіназа	100 ± 8,0	214,7 ± 36,0**
Arg/NOS	100 ± 17,0	154,0 ± 15,0**
$NO_2^-$	100 ± 18,0	120,0 ± 20,0
$NO_3^-$	100 ± 16,0	77,0 ± 11,0
НМНТ	100 ± 11,3	93,0 ± 11,5
ВМНТ	100 ± 13,5	390,0 ± 55,0**

\* – контроль – 100%;

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

Вивчення пулів стабільних метаболітів оксиду азоту (нітрит- і нітрат-аніонів) показало, що їх вміст зазнає незначні зміни, які простежуються на рівні тенденції. Практично вміст  $NO_2^-$  і  $NO_3^-$  в еритроцитах хворих залишався на рівні контрольної групи. Це може свідчити або про гальмування процесів окиснення NO (на тлі

достатньо високої активності індукцибельної 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 апластичну анемію спостерігається суттєве зростання рівня високомолекулярних нітрозотіолів (ВМНТ): у 3,9 разу порівняно з контрольною групою (таблиця). Вміст низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) практично не змінювався.

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 апластичній анемії 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 апластичну анемію 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 апластичній анемії 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 апластичну анемію, 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. Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньщиков, Н.К. Зенков // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-169.
3. Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщиков, 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 мед. – 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> – depended 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 alcoholdehydrogenase 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.** Процессы синтеза оксида азота и нитрозилирования в эритроцитах больных апластической анемией / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач, Ф.В. Добровольский // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 3. – С.77-83.

Показано, что в эритроцитах больных апластической анемией наблюдаются изменения в системе синтеза оксида азота, которые ведут к преобладанию неокислительного, аргиназного метаболизма над окислительным, NO-синтазным метаболизмом L-аргинаина 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, апластическая анемия.

## **PROCESSES OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND NITROSYLATION IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA**

*Yolkina N.M.<sup>1</sup>, Konoshenko S.V.<sup>2</sup>, Kotsuruba A.V.<sup>3</sup>, Dobrovolsky F.V.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Crimea faculty of Zaporogie National University, Simferopol, Ukraine*

<sup>2</sup>*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine*

<sup>3</sup>*O.O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

*E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

Elucidation of the molecular basis of various diseases and pathological states of human organism is one of the most significant problems of medicine and biology [1-3]. It is known, that the ways of production of free radicals of oxygen and nitric oxide are closely binded [4]. The synthesis of nitric oxide over standard level may causes nitrosative stress, that is binded with active forms of nitric oxide, for example, peroxinitrite and nitric dioxide [4]. The formation of nitrosothiols is one of the markers of nitrosative stress also [4, 5]. Given that in some diseases erythrocytes are involved in pathological process [6, 7], the aim the present work was to study the indexes of the system of nitric oxide synthesis and nitrosylation in erythrocytes under aplastic anemia. The materials for the study were the erythrocytes of healthy subjects (control group) and patients with aplastic anemia. The erythrocytes were hemolised by distilled water. In hemolises of erythrocytes was determined the content of NO-anions ( $NO_2^-$  and  $NO_3^-$ ) [8], low-molecular and high-molecular products of nitrosylation [9] and the activity of arginase [10], cNOS and iNOS [11]. It has been shown, that in erythrocytes of patients with aplastic anemia the system of nitric oxide synthesis is changed. The metabolism of L-arginine by arginase prevails over oxidative metabolism with NO synthesis (was 54% higher when compared to control group). The activity of  $Ca^{2+}$ -dependent NO-synthase was 43% less when compared to control group. The activity of  $Ca^{2+}$ -independent nitric oxide synthase was risen (22% higher when compared to control group). The activity of arginase was risen also (100% higher when compared to control group). The accumulation of NO-anions in erythrocytes of patients was limited. The level of low-molecular products of nitrosylation was not changed. It is known that nitrosoglutathione is one of the main low-molecular products of nitrosylation [4]. The lowering of the content of low-molecular products in erythrocytes of patients with aplastic anemia may be as index of releasing of glutathione from processes of nitrosylation for it more active utilization in reductive reactions. At the same time, the content of high-molecular products of nitrosylation was risen (290% higher when compared to control group). So far as the high-molecular products of nitrosylation are, in the main, nitrosylated proteins [4], these changes in erythrocytes of patients with aplastic anemia may have certain influence on structural-functional state of erythrocyte proteins;

in particular, of haemoglobin. The changes that are observed in the system of nitric oxide synthesis in erythrocytes may have influence on generation of nitric active forms and level of reduced glutathione also.

Thus, under aplastic anemia the metabolic changes are realized in erythrocytes, the development of nitrosative stress is accompanied by realization of some compensative reactions.

**Key words:** erythrocytes, system of nitric oxide synthesis, arginase, NO-synthases, NO-anions, low-molecular and high-molecular products of nitrosylation, aplastic anemia.

### References

1. Dubinina E.E., Pustigina A.V., Oxidative modification of proteins, its importance in pathological states, Ukr. biochem. J., **80**, **6**, 5 (2008).
2. Menshikov E.B., Zenkov N.K., Oxidative stress under inflammation, Impr. mod. biol., **117**, **2**, 155 (1997).
3. Menshikov E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Oxidative stress: pathological states and diseases, 284 p. (ARTA, Novosibirsk, 2008).
4. Sagach V.F., Korkach U.P., Kotsuruba A.V., Prysyzhna O.D., The inhibition of oxidative stresses by ecdysterone as the mechanism of the cardio- and vasoprotective action at type I diabetes, Physiol. J., **54**, **5**, 46 (2008).
5. Akopova O.V., Kotsuruba A.V., Tkachenko U.P., Sagach V.F., Nitric oxide suppresses permeability, transition pore opening and enhances calcium uptake in mitochondria in vivo, Physiol. J., **51**, **3**, 3 (2005).
6. Yolkina N.M., Konoshenko S.V., Shashua I., Enzym activity of human erythrocytes under ischemic heart disease, Scientific Notes Taurida National V.I. Vernadsky University, **24** (**63**), **2**, 124 (2011).
7. Novitski V.V., Goldberg V.E., Kolosova M.V., Protein specter of erythrocyte membranes of patients with lung cancer and tumours of head and neck, Bul. experim. biol. and med., **suppl. 1**, 18 (1999).
8. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J., Analysis of nitrate, nitrite and [N<sup>+5</sup>]-nitrate in biological fluids, Anal. Biochem., **126**, **1**, 131 (1982).
9. Gerdal D., Cederbaum A.J., Inhibition of the catalytic activity of alcoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc, Biochemistry, **35**, **50**, 16186 (1996).
10. Shugaley V.S., Kozina A.S., Content of urea and arginase activity in rats organs under acclimatization for cold, USSR Physiol. J., **8**, 1199 (1977).
11. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J., Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup> – depended NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats, Amer. J. Physiol., **277**, **5**, 797 (1999).

*Поступила в редакцію 16.08.2013 г.*