

УДК 577.112:612

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА И ПРОЦЕССОВ НИТРОЗИЛИРОВАНИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ

Ёлкина Н.М.¹, Коношенко С.В.²

¹Крымский факультет Запорожского национального университета, Симферополь, Республика Крым, Российская Федерация

²Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Республика Крым, Российская Федерация
E-mail: nataleiolkina@gmail.com

Показано, что в эритроцитах больных железодефицитной анемией осуществляются изменения в системе синтеза оксида азота, ведущие к преобладанию неокислительного, аргиназного метаболизма над окислительным метаболизмом L-аргинина и к повышению уровня нитрат-анионов.

Вместе с этим, прослеживается увеличение содержания в эритроцитах высокомолекулярных продуктов нитрозилирования и снижение содержания низкомолекулярных нитрозотиолов.

Ключевые слова: эритроциты, система синтеза оксида азота, NO-синтазы, NO-анионы, аргиназа, низкомолекулярные и высокомолекулярные нитрозотиолы, железодефицитная анемия.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что многие заболевания характеризуются развитием окислительного стресса в результате нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия и усиленного протекания свободно-радикальных реакций с участием активных форм кислорода [1-3].

Вместе с этим, за последние годы накопилось достаточно много данных, свидетельствующих о тесной взаимосвязи продукции свободных радикалов кислорода и оксида азота [4]. Имеются данные о том, что оксид азота (NO) является одним из универсальных регуляторов физиологических функций организма с достаточно широким спектром биологического действия [5]. Так, известно, что в оптимальных концентрациях NO улучшает эндотелиальную функцию периферических сосудов, положительно влияет на активность отдельных протеинкиназ, способен ингибировать каспазы, угнетать индукцию апоптоза [6, 7]. Однако, синтез оксида азота в повышенных концентрациях, превышающих допустимый стационарный уровень, может быть причиной развития нитрозативного стресса, обусловленного образованием активных форм азота, прежде всего, пероксинитрита и продукта его дегградации диоксида азота [4].

Одним из маркёров нитрозативного стресса рассматривается образование низкомолекулярных и высокомолекулярных нитрозотиолов, в частности, продуктов нитрозилирования протеинов [4].

Ранее было показано, что при железодефицитной анемии в эритроцитах усиливаются реакции перекисного окисления липидов и метгемоглобинообразование [8]. Учитывая это и то, что при ряде заболеваний в патологический процесс вовлекаются эритроциты [8, 9], представляло интерес изучить отдельные показатели системы синтеза оксида азота и процессов нитрозилирования в эритроцитах больных железодефицитной анемией, что и составило цель настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (25 доноров станции переливания крови) и больных железодефицитной анемией (20 человек, средний возраст 48,0 лет). В каждой обследованной группе соотношение мужчин и женщин было приблизительно одинаковым. Кровь больных брали на базе Крымского онкологического центра при поступлении в стационар, перед началом лечения.

Гемолиз эритроцитов осуществляли в равном объеме дистиллированной воды, взяв за основу метод Драбкина [10]. Состояние системы синтеза оксида азота оценивали, изучая показатели гемолизатов, характеризующие интенсивность неокислительного (аргиназного) и окислительного (NO-синтазного) метаболизма L-аргинина. Интенсивность неокислительного метаболизма L-аргинина оценивали, определяя активность аргиназы [11]. Интенсивность окислительного превращения аргинина, сопровождающегося синтезом оксида азота *de novo*, оценивали, изучая активность изоэнзимов NO-синтаз – кальций-зависимой, конститутивной (cNOS) и кальций-независимой, индуцибельной (iNOS) синтазы [12].

Процентную долю активности cNOS (% cNOS) относительно суммарной активности NO-синтаз определяли по формуле:

$$\% \text{ cNOS} = \text{cNOS} \cdot 100\% / \text{суммарная активность NOS.}$$

Наряду с этим, в гемолизатах эритроцитов определяли содержание стабильных метаболитов оксида азота – нитрит-анионов (NO_2^-) и нитрат-анионов (NO_3^-) [13].

Процессы нитрозилирования оценивали, определяя содержание низкомолекулярных и высокомолекулярных нитрозотиолов [14].

Использовали спектрофотометрические методы биохимического анализа.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, в эритроцитах больных железодефицитной анемией существенно снижается интенсивность конститутивного синтеза оксида азота. Активность кальций-зависимой, конститутивной синтазы оксида азота была на 62,0% меньше по сравнению с контрольной группой доноров (таблица). Интенсивность индуцибельного синтеза оксида азота была значительно больше. Активность кальций-независимой NO-синтазы увеличивалась на 86,0% по сравнению с контрольной группой. Доля

физиологического конститутивного синтеза оксида азота в эритроцитах практически здоровых людей составляла, в среднем, 66% от суммарного синтеза оксида азота, тогда как у больных железодефицитной анемией наблюдалось выраженное снижение данного показателя – до 28,0%.

Поскольку субстратом для NO-синтаз является L-аргинин представляло интерес дать оценку неокислительного метаболизма этой аминокислоты, превращающейся под действием энзима аргиназы до мочевины и орнитина.

При изучении активности аргиназы было установлено, что в эритроцитах больных железодефицитной анемией данный показатель возрастал в 3,6 раза по сравнению с контрольной группой. Этот факт является свидетельством активизации неокислительного, аргиназного метаболизма, который конкурирует с окислительным NO-синтазным метаболизмом L-аргинина.

Соотношение неокислительного и окислительного метаболизма L-аргинина (Arg/NOS) достоверно увеличивалось в эритроцитах больных: в 4,0 раза по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о преобладании неокислительного метаболизма L-аргинина над окислительным, который ведет к образованию оксида азота.

Изучение пулов стабильных метаболитов оксида азота показало, что их содержание в эритроцитах больных претерпевает некоторые изменения. Так, содержание нитрат-анионов (NO_3^-) возросло на 37% по сравнению с контрольной группой, тогда как содержание нитрит-анионов (NO_2^-) практически не менялось. Эти данные могут свидетельствовать об активизации процессов окисления оксида азота и ограничении использования NO_3^- - анионов в метаболических процессах.

Изучение содержания в эритроцитах низкомолекулярных и высокомолекулярных продуктов нитрозилирования показало, что у больных железодефицитной анемией наблюдается достаточно выраженное увеличение уровня высокомолекулярных нитрозотиолов (ВМНТ): в 3,0 раза по сравнению с контрольной группой.

Содержание низкомолекулярных нитрозотиолов (НМНТ), в отличие от ВМНТ, снижалось (на 26,5% по сравнению с контрольной группой).

Поскольку одним из основных представителей низкомолекулярных нитрозотиолов является нитрозоглутатион [4], можно предположить, что при железодефицитной анемии в эритроцитах реализуется механизм высвобождения глутатиона из процессов нитрозилирования для более активного его использования в восстановительных реакциях.

Вместе с этим, существенное увеличение содержания в гемолизатах эритроцитов больных высокомолекулярных нитрозотиолов свидетельствует об активном протекании процессов, ведущих к образованию продуктов нитрозилирования протеинов, главным образом, гемоглобина, на долю которого приходится основное содержание в эритроцитах.

Учитывая, что оксид азота способен конкурировать с кислородом за связь с Fe^{2+} гемовой группы, можно было бы оценивать нитрозилирование гемоглобина по гему

как один из механизмов регуляции его сродства к кислороду, образования оксигенированной формы.

Таблица

Показатели системы синтеза оксида азота и процессов нитрозилирования в эритроцитах при железодефицитной анемии (ЖДА) (процентная доля относительно показателя контрольной группы*); M±m

Показатели	Обследованные группы	
	Контрольная группа	Больные ЖДА
cNOS	100 ± 15,0	38,0 ± 5,5**
iNOS	100 ± 16,4	186,2 ± 24,6**
% cNOS	66,3 ± 6,4	28,1 ± 2,9**
Аргиназа	100 ± 8,0	360,0 ± 55,0**
Arg/NOS	100 ± 17,0	410,0 ± 65,3**
NO ₂ ⁻	100 ± 18,0	94,2 ± 8,0**
NO ₃ ⁻	100 ± 16,0	137,0 ± 13,2**
HMHT	100 ± 11,3	73,5 ± 9,6**
BMHT	100 ± 13,5	302,0 ± 28,0**

* – контроль – 100%;

** – достоверность отличия показателя относительно контрольной группы (p<0,05).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при железодефицитной анемии в эритроцитах осуществляются метаболические перестройки, связанные с системой синтеза оксида азота и ведущие к преобладанию интенсивности неокислительного, аргиназного метаболизма над интенсивностью окислительного, NO-синтазного метаболизма L-аргинина.

Изменения в системе синтеза оксида азота и в образовании низкомолекулярных и высокомолекулярных нитрозотиолов в эритроцитах больных железодефицитной анемией могут иметь определенное значение, влияя на генерирование активных форм азота и уровень свободного глутатиона, а также на функциональное состояние эритроцитарных протеинов, участвующих в процессах нитрозилирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В эритроцитах больных железодефицитной анемией осуществляются изменения в системе синтеза оксида азота, ведущие к преобладанию неокислительного, аргиназного метаболизма над окислительным, NO-синтазным метаболизмом L-аргинина, а также к повышению уровня NO₃⁻-анионов.
2. При железодефицитной анемии в эритроцитах изменяется соотношение низкомолекулярных и высокомолекулярных продуктов нитрозилирования: существенное увеличение содержания высокомолекулярных нитрозотиолов

сочетается с некоторым уменьшением содержания низкомолекулярных нитрозотиолов.

3. Изменения в системе синтеза оксида азота в эритроцитах при железодефицитной анемии могут иметь определенное значение, оказывая влияние на генерирование активных форм азота и поддержку уровня свободного глутатиона.

Список литературы

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 Ca²⁺-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 [N¹⁵]-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.