

УДК 612.014.481.1+577.112.385.2:611.018.53:577.152.6

**АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗИ ТА ВМІСТ СТАБІЛЬНИХ МЕТАБОЛІТІВ
ОКСИДУ АЗОТУ У ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ
ПРИ ВВЕДЕННІ L-АРГІНІНУ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОГО
РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ**

Л. Дацюк, Ю. Перетятко, У. Старанко, Н. Сибірна

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: bhndllab@franko.lviv.ua*

Досліджено вміст нітритів і нітратів та активність NO-синтази в імункомпетентних клітинах периферичної крові щурів за умов хронічного рентгенівського опромінення на фоні перорального введення L-аргініну. Встановлено, що введення L-аргініну призводить до пригнічення цитотоксичного впливу оксиду азоту шляхом зниження його надпродукції за умов хронічного рентгенівського опромінення.

Ключові слова: L-аргінін, активність NO-синтази, нітрити, нітрати, лейкоцити, рентгенівське опромінення.

За дії низьких доз іонізуючого випромінювання основним фактором ураження клітин живих організмів є активація вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів, окисна модифікація білків і пошкодження ДНК активними метаболітами оксигену (АМО). Серед них визначальна роль відводиться пероксинітритові (ONOO⁻), який утворюється при взаємодії продуктів NO-синтазної реакції – оксиду азоту (NO) та супероксид аніон радикалу (O₂⁻), рівень яких за радіаційного впливу істотно зростає [6]. Зміни інтенсивності синтезу NO притаманні організмам за дії різних факторів і змін умов середовища, оскільки це є багатофункціональна ефекторна молекула, котра в багатьох випадках сприяє адаптації різних систем організму до шкідливих факторів впливу. Дія NO на клітини залежить від його кількості. За низьких фізіологічних концентрацій цей метаболіт бере активну участь у процесах регуляції судинного тонуусу [5, 10, 12], має протизапальний і антитромбогенний ефекти [11], блокує стимульовану цитокінами експресію адгезивних молекул, знижує агрегацію нейтрофілів та моноцитів і перетворення їх у макрофаги [8], регулює функціонування мембранних іонних каналів і процеси фосфорилування білків, забезпечує нормальний перебіг інших реакцій і, зокрема, інгібує опосередковані Fe³⁺ оксидативні реакції, гальмуючи процеси перекисного окиснення ліпідів [13], тоді як при надлишковій продукції NO викликає цитотоксичний ефект через активацію експресії проапоптичних білків.

Метою даної роботи було дослідити вплив введення L-аргініну на NO-синтазу активність і вміст стабільних продуктів метаболізму оксиду азоту в лейкоцитах периферичної крові білих щурів за умов тривалого низькоінтенсивного рентгенівського опромінення.

Дослідження були проведені на білих безпородних щурах масою 150–170 г згідно з етичним кодексом МОЗ України. Тварини перебували у стаціонарних умовах віварію із забезпеченням вільного доступу до їжі та води. У процесі досліджень щурі були поділені на чотири групи: перша – контрольні тварини; друга – тварини, які з питною водою впродовж 30-ти діб отримували L-аргінін (“Sigma”, США) у концентрації 1,25 г/л; третя – щурі, яких піддавали опроміненню щодобовою дозою 1сГр на апараті РУМ-17 з такими

параметрами: шкірно-фокусна відстань 178 см, напруга 110 кВ, сила струму 4 мА, фільтри Cu 0,5 мм та Al 1,0 мм, потужність дози 0,042 мГр·с⁻¹; четверта – тварини, які з питною водою отримували L-аргінін і були піддані 30-добовому фракційному опроміненню. Дозу опромінення контролювали клінічним дозиметром типу 27012 (Otto Shon, Німеччина). Сумарна доза на 10, 20 і 30-ту добу опромінення становила відповідно 10, 20 та 30 сГр.

Визначення вмісту нітритів та нітратів і сумарної активності NO-синтази проводили у лейкоцитах периферичної крові тварин, підданих декапітації під ефірним наркозом, на 10, 20 і 30-ту добу експерименту.

Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові у градієнті густини фікол-тріомбразу ($\rho=1,076-1,078$) [4]. Після центрифугування клітини двічі відмивали фізіологічним Na,K-фосфатним буфером (PBS, pH 7,4). Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою ніж 98%. Крім того, проводили цитологічний аналіз виділеної популяції моноядерних клітин. Для цього на чисте знежирене предметне скло наносили краплю лейкоконцентрату. Сухий мазок фіксували 100% метанолом і після повного висихання заливали 70% етанолом для попередження змиву клітин, після чого фарбували за Романовським-Гімзою [3]. Аналіз мазка за допомогою світлового мікроскопа показав, що було отримано гетерогенну фракцію лейкоцитів, у якій домішки еритроцитів становили менше 0,1%.

Клітинну суспензію 20 млн/мл, приготовану у бідистиляті, двічі лізували шляхом заморожування в рідкому азоті й розтавання на водяній бані при 37°C.

Отриманий лізат використовували для визначення сумарної активності NO-синтази (NOS) та вмісту нітритів і нітратів.

Визначення активності NOS лейкоцитів проводили в 3 мл інкубаційного середовища, що містило: 0,1 мл лізату лейкоцитів, трис-HCl – 0,1 М (pH 7,4), CaCl₂ – 0,9 М, L-аргінін – 5,74 мМ, НАДФН(H⁺) – 1,2 мМ. Контрольні та безсубстратні проби готували аналогічно до дослідних, шляхом вилучення з інкубаційного середовища відповідно НАДФН(H⁺) та L-аргініну та внесення замість них бідистильованої води. Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних і безсубстратних при 340 нм, після чого всі проби інкубували протягом 10 хв при 37°C. Реакцію зупиняли внесенням 0,1 мл HClO₄ (1,5 М) і реєстрували зниження екстинкції. Активність NOS виражали в нмолях НАДФН(H⁺), окисненого впродовж 1 хв у розрахунку на 1 мг білка у пробі [7].

Визначення вмісту нітритів проводили згідно з методом [14], а нітратів – згідно з методом [2, 9].

Концентрацію білка у пробах визначали загальноновживаним методом Лоурі [15].

Результати досліджень обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Відмінність досліджуваних показників вважалася статистично вірогідною при $p \leq 0,05$.

Було встановлено, що вплив рентгенівського опромінення у щодобовій дозі 1 сГр зумовлює стійке зростання сумарної активності NOS та вмісту продуктів метаболізму NO впродовж 30-добового експерименту (рис. 1, табл. 1).

Якщо на 10-ту добу радіаційного впливу була виявлена лише тенденція до зростання ензиматичної активності, то на 20-ту і 30-ту добу опромінення активність NOS перевищувала рівень контролю у 2 та 4 рази відповідно. Зростання сумарної активності NOS супроводжувалося і змінами вмісту продуктів окиснення NO – нітритів і нітратів, однак вірогідне зростання їхньої кількості було встановлене лише на 30-ту добу опромінення – більш як у 2 рази NO₂⁻ та в 1,5 разу NO₃⁻ (табл. 1).

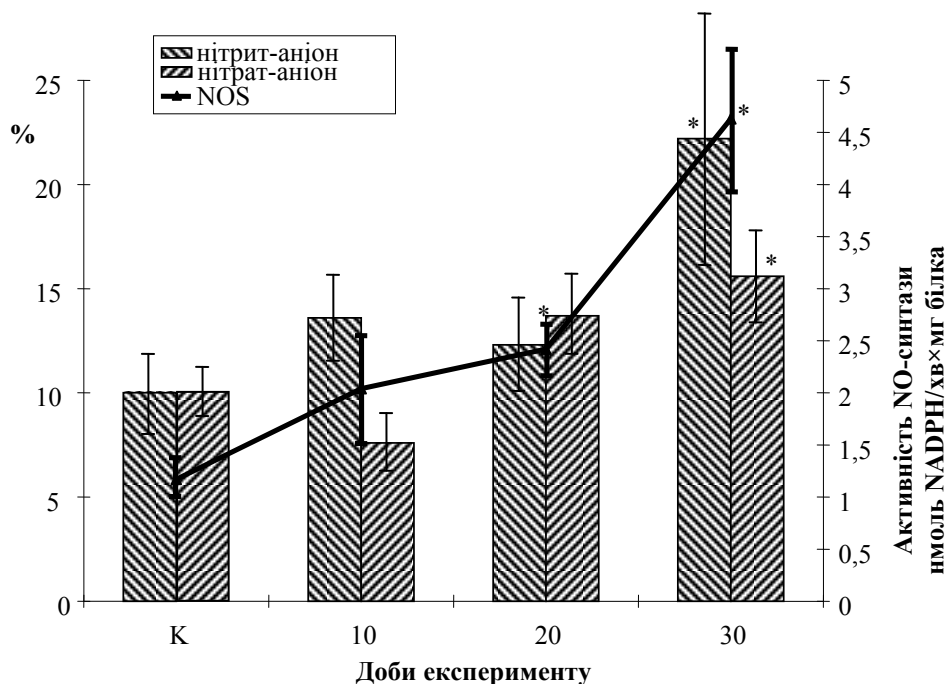


Рис. 1. Динаміка змін вмісту нітритів і нітратів (діаграма, контроль прийнято за 100%) та активність NO-синтази (графік) у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов радіаційного впливу. * – різниця між дослідом і контролем вірогідна, $p \leq 0,05$.

Таблиця 1

Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту (нмоль/мг білка) та активність NO-синтази (нмоль NADPH/хв мг білка) у лейкоцитах периферичної крові щурів ($M \pm m$, $n=6$)

Доби експерименту	Досліджувані показники		
	Нітрит-аніон	Нітрат-аніон	NO-синтаза
	Контроль		
	1,21±0,23	42,50±5,30	1,17±0,36
Опромінення			
10	1,64±0,25	32,30±5,90	2,04±0,52
20	1,49±0,27	58,10±8,20	2,42±0,47*
30	2,69±0,81*	66,60±9,40*	4,63±1,02*
L-аргінін			
10	2,58±0,43*	81,40±5,30*	0,82±0,31
20	4,24±0,46*	89,30±15,40*	0,67±0,30
30	1,08±0,10	66,30±2,86*	0,41±0,18
Опромінення + L-аргінін			
10	2,60±0,77	95,00±9,16*	2,40±0,19*
20	2,82±0,60*	105,80±5,80*	1,18±0,28
30	2,24±0,37*	60,30±5,40*	1,40±0,40

Примітка.* – відмінність між контролем і дослідом вірогідна ($p \leq 0,05$).

Введення екзогенного L-аргініну щурам упродовж 30-ти діб викликало поступове зниження активності NOS порівняно з контролем, тоді як вміст NO_2^- у лейкоцитах периферичної крові підслідних тварин зростав у 2 та 3,5 разу на 10-ту і 20-ту добу, а вміст NO_3^- перевищував показник норми удвічі в ці ж терміни експерименту (рис. 2).

Виявлене зниження активності ензиму майже у 3 рази на 30-ту добу спостереження обумовлене, ймовірно, інгібуванням за типом негативного зворотного зв'язку, яке відбувається шляхом приєднання NO за гемзалежним механізмом до NO-синтази. Опосередковано про зростання вмісту NO свідчить висока концентрація його стабільних метаболітів, зафіксована у наших дослідженнях на 10-ту і 20-ту добу експерименту. Крім цього, можливим є і пригнічення активності NOS за рахунок активації аргінази, яка виступає потужним конкурентом за субстрат – L-аргінін, регулюючи продукування NO [1].

За умов впливу рентгенівського опромінення, на фоні перорального введення L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів на 10-ту добу експерименту виявлено зростання активності NOS більш ніж удвічі, (рис. 3), на відміну від тварин, яких піддавали лише іонізуючому опроміненню; в подальші терміни значення активності ферменту перебували в межах контрольних величин.

Слід відзначити, однак, значно вищий вміст стабільних продуктів окиснення NO – нітритів і нітратів у лейкоцитах периферичної крові на 10-ту і 20-ту добу експерименту порівняно з результатами досліджень їхнього вмісту в імунокомпетентних клітинах крові за радіаційного впливу. На 30-ту добу сукупного впливу опромінення та введення L-аргініну вміст стабільних метаболітів оксиду азоту хоча істотно і перевищував рівень контролю, однак був нижчим, ніж за тривалої дії іонізуючого випромінювання (рис. 1, табл. 1).

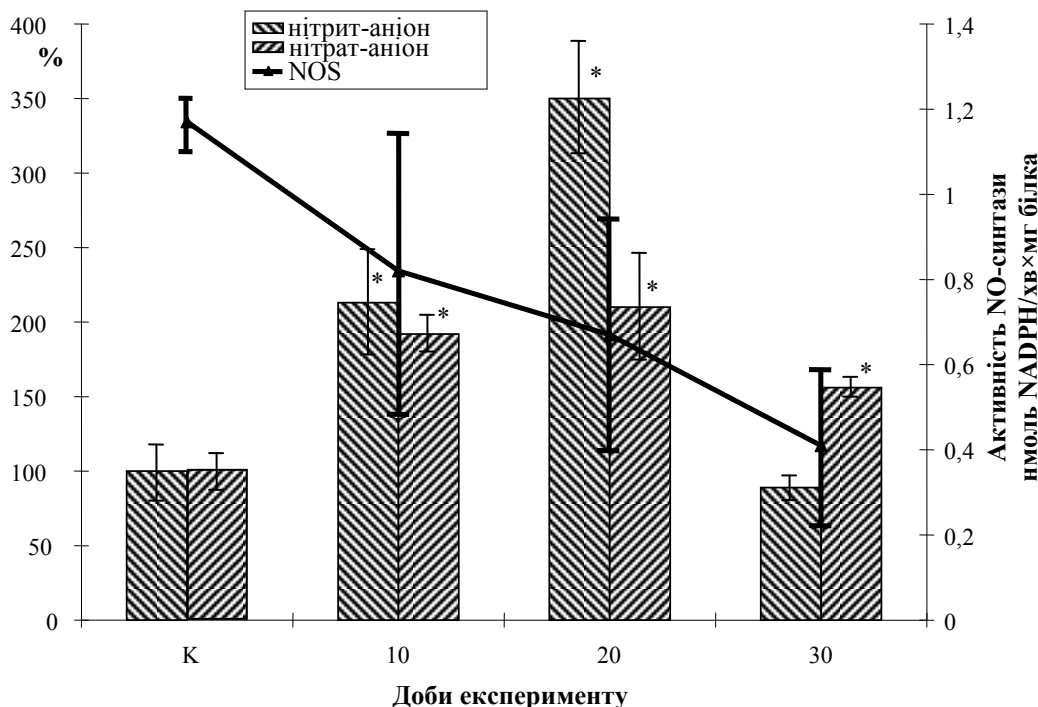


Рис. 2. Динаміка змін вмісту нітритів і нітратів (діаграма, контроль прийнято за 100%) та активність NO-синтази (графік) у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов перорального введення L-аргініну. * – різниця між дослідом і контролем вірогідна, $p \leq 0,05$.

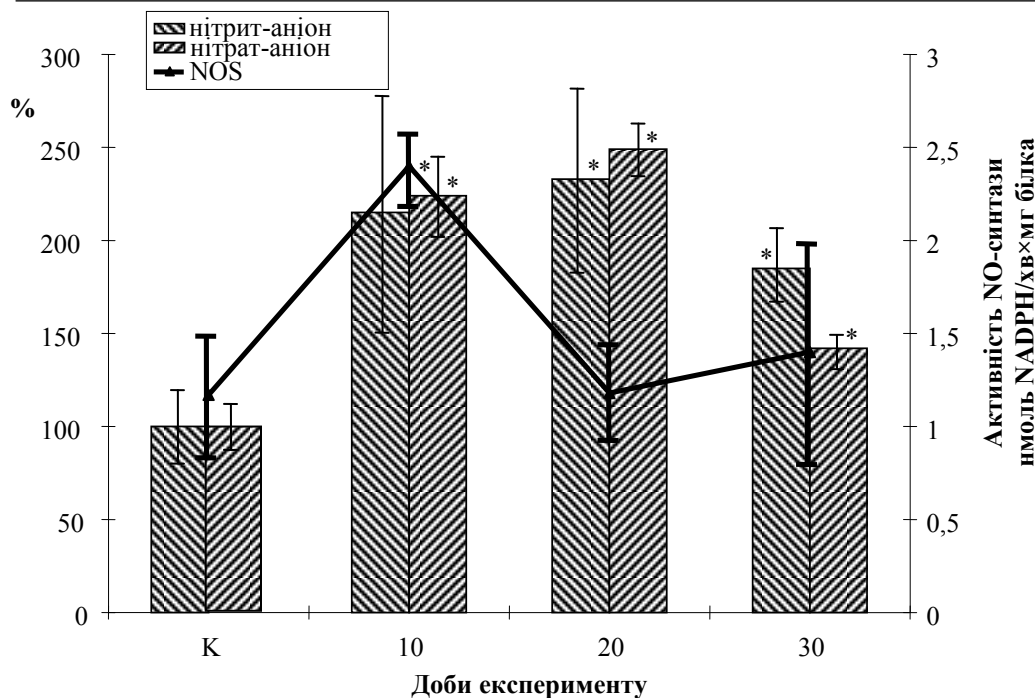


Рис. 3. Динаміка змін вмісту нітритів і нітратів (діаграма, контроль прийнято за 100%) та активність NO-синтази (графік) у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов перорального введення L-аргініну та іонізуючого випромінювання. * – різниця між дослідом і контролем вірогідна, $p \leq 0,05$.

Таким чином встановлено, що пероральне введення L-аргініну впродовж тривалого впливу фракційного рентгенівського випромінювання в добовій дозі 1 сГр призводить до зниження як активності NOS, так і вмісту нітритів та нітратів у лейкоцитах периферичної крові щурів і забезпечує цитопротекторний ефект шляхом зниження продукції оксиду азоту та супероксиданіон радикалу.

1. *Зенков Н. К., Меньшикова Е. Б.* Окислительный стресс при воспалении // *Успехи совр. биологии.* 1997. № 117. Т. 2. С. 155–165.
2. *Кіселик І. О., Луцик М. Д., Шевченко Л. Ю.* Особливості визначення нітритів та нітратів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // *Лаб. діагностика.* 2001. № 3. С. 43–45.
3. *Кондрахин І. П., Кудрин Н. В., Малахов А. Г. и др.* Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. М.: Агропромиздат, 1985. 287 с.
4. *Лаповець Л., Луцик Б.* Лабораторна імунологія. К.: ПП «Арал», 2004. 173 с.
5. *Реутов В. П.* Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала // *Вестн. РАМН.* 2000. № 4. С. 35–41.
6. *Реутов В. П.* Цикл окиси азота в организме млекопитающих // *Успехи биол. химии.* 1995. Т. 35. С. 189–228.
7. *Сагач В., Присяжна О., Ткаченко М., Коцюруба А.* Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету // *Фізіол. журн.* 2005. Т. 51. № 2. С. 3–7.
8. *Саприн А. Н., Калинина Е. В.* Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // *Успехи биол. химии.* 1999. № 39. С. 289–326.

9. Сибірна Н. О., Маєвська О. М., Барська М. Л. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу: Навч.-метод. посібн. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. 60 с.
10. Сидоренко Б. А., Затеїциков Д. А. Дисфункція ендотелія в патогенезі атеросклероза і його ускладнень // Кремлевская медицина. 1999. № 2. С. 51–54.
11. Стокле Ж.-К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клецев А. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов // Биохимия. 1998. № 7. С. 967–983.
12. Ткаченко М. М. Оксид азоту та судинна регуляція // Журн. АМН України. 1997. Т. 3. С. 241–254.
13. Beltran B., Orsi A., Clementi E., Moncada S. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells // Br. J. Pharmacol. 2000. Vol. 129. N 5. P. 953–960.
14. Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J. G. Analysis of nitrate, nitrite and ¹⁵N—nitrate in biological fluids // Anal.Biochem. 1982. Vol. 126. N 1. P. 131–138.
15. Lowri O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P. 265–275.

ACTIVITY OF NO-SYNTHASE AND CONTENT OF STABLE METHABOLIC NITRIC OXIDE PRODUCTS IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES UNDER THE CHRONIC X-RAY RADIATION AND ADMINISTRATION OF L-ARGININE

L. Datsyuk, Yu. Peretyatko, U. Staranko, N. Sybirna

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: bhndllab@franko.lviv.ua*

It was evaluated the content of nitrates and nitrites and activity of NO-synthetase in immunocompetent cells of rat peripheral blood under the chronic x-ray radiation and peroral administration of L-arginine were studied. It was shown that administration of L-arginine leads to inhibition of nitric oxide cytotoxic effect by reducing it overproductions under the chronic x-ray radiation.

Key words: L-arginine, activity of NO-synthase, nitrates, nitrites, leukocytes, x-ray radiation.

АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ L-АРГИНИНА И ВОЗДЕЙСТВИИ ХРОНИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Л. Дацюк, Ю. Перетятко, У. Старанко, Н. Сибирная

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: bhndllab@franko.lviv.ua*

Исследовано содержание нитритов, нитратов и активность NO-синтазы в иммунокомпетентных клетках периферической крови крыс при воздействии хронического рентгеновского облучения на фоне перорального введения L-аргинина. Установлено, что введение L-аргинина обуславливает угнетение цитотоксического влияния оксида азота путем снижения его чрезмерной продукции при хроническом рентгеновском облучении.

Ключевые слова: L-аргинин, активность NO-синтазы, нитриты, нитраты, лейкоциты, рентгеновское облучение.

Стаття надійшла до редколегії 27.05.09

Прийнята до друку 02.06.09