



УДК 616.438-008.931:577.152.-02

ВПЛИВ ЛАБІЛЬНОГО ФЕРУМУ КРОВІ НА РОЗВИТОК НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАБДОМІОЛІЗУ У ЩУРІВ

І. М. Чумаченко, Л. Г. Капустяненко, С. Г. Шандренко

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна
e-mail: chumak_ig@yahoo.com*

На експериментальній моделі індукованого гліцерином рабдоміолізу в щурів досліджено утворення нового пулу негемового феруму в плазмі крові та з'ясована його причетність до інтенсифікації утворення NO. Вже на першу добу після внутрішньом'язового введення тваринам 50% гліцерину в дозі 10 мл/кг реєструється 10-кратне збільшення вмісту вільного гему у плазмі крові та 6-кратне підвищення гемоксигеназної активності у печінці. За допомогою методу ЕПР доведено факт утворення у плазмі крові дослідних тварин пулу лабільного тривалентного феруму, який був повністю відсутнім у зразках інтактної групи. У період з першої по шосту добу досліду вміст цієї форми феруму становив 2 мг/л, що суттєво перевищувало вміст заліза у трансферині. На фоні формування пулу лабільного феруму спостерігалось підвищення показників нітрозативного стресу. Так, на четвертий день спостерігалось збільшення вмісту загальної NO синтази щодо контролю у печінці та S-нітрозотіолів і нітрозопроліну в плазмі крові удвічі. Для перевірки гіпотези про причетність лабільного феруму до розвитку нітрозативного стресу був використаний унітіол як акцептор феруму. Застосування унітіолу привело до зменшення концентрації лабільного феруму в плазмі крові утричі на четверту добу розвитку патології порівняно з тваринами з експериментальним рабдоміолізом. Виявлено позитивну кореляцію між вмістом лабільного феруму в крові та показниками нітрозативного стресу: вміст загальної NO синтази, нітрозопроліну та S-нітрозотіолів зменшився у 1,5 разу на фоні падіння концентрації лабільного феруму в крові. За умови розвитку рабдоміолізу, стимульованого гліцерином, у плазмі крові щурів відбувається утворення нового пулу негемового тривалентного феруму, яке не зв'язане з трансферином і тому здатне до хімічної взаємодії. Таким чином, лабільний ферум є одним із ініціаторів нітрозативного стресу при рабдоміолізі.

Ключові слова: ферум, трансферин, рабдоміоліз, унітіол, NO.

ВСТУП

Рабдоміоліз – патологічний стан, що спричинений пошкодженням м'язів і характеризується вивільненням вмісту м'язових клітин (електроліти, міоглобін та інші саркоплазматичні протеїни) у кров'яне русло. Міоглобін крові фільтрується

клубочками нирок і з'являється в сечі (міоглобінурія), що супроводжується порушенням кровопостачання ниркової кори і зменшенням клубочкової фільтрації. Розвиваються структурні зміни в нирках, головним чином у канальцях. Наслідком цього є гостра ниркова недостатність, яка виникає приблизно через 24–48 год після початкового пошкодження м'язів, незалежно від виду фактора, який спричинив даний патологічний стан та є домінуючим проявом даної патології [8].

Відомо, що індукція гемоксидази є одним із основних механізмів деградації гемопротеїнів та перешкоджає розвитку тканинних ушкоджень у нирках при рабдоміолізі у щурів [2, 4] та при ін'єкції гемоглобіну мишам [5]. У процесі інтенсивного вивільнення гему з цих протеїнів можливе утворення вільного феруму.

Також відомо, що лабільний ферум здатний взаємодіяти з оксидом нітрогену [9]. Воно, разом із низькомолекулярними тіоловмісними сполуками (цистеїн, глутатіон) утворює динітрозильний комплекс, у складі якого NO здатне транспортуватися в організмі. Вважають, що саме цей комплекс є ендотеліязалежним фактором релаксації судин [6]. Тому ми висунули припущення про можливість виникнення взаємозв'язку між змінами в обміні заліза та утворенням NO в організмі в умовах рабдоміолізу.

Мета роботи полягала у дослідженні утворення нового пулу негемового заліза у плазмі крові щурів в умовах експериментального рабдоміолізу, індукованого гліцерином, а також у з'ясуванні причетності цього заліза до інтенсифікації процесу утворення NO.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на щурах самцях лінії Wistar масою 180–220 г, раціон харчування яких складався із концентрованого гранульованого комбікорму. Всі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження”. Тварин розділяли на 7 груп по 6 у кожній: гр. №1 – контроль (інтактні тварини); щурам з інших груп (№ 2–7) вводили одноразово в обидва стегнових м'язи 50% водний розчин гліцерину в дозі 10 мл/кг маси тіла. Через 1 добу після ін'єкції гліцерину групі № 7 додатково один раз на добу протягом 3-х днів підшкірно вводили розчин 5% унітіолу у дозі 10 мл/кг. Тварин виводили з експерименту декапітацією під ефірним наркозом через 1 добу (гр. № 2), 3 доби (гр. № 3), 4 доби (гр. № 6 та 7), 6 діб (гр. № 4), 10 діб (гр. № 5) після введення гліцерину.

У тварин відбирали зразки крові та тканину печінки.

У тканині печінки визначали гемоксигеназну активність (ГО) за кількістю утвореного білірубину [7], концентрацію нітрозопроліну – за допомогою тонкошарової хроматографії з подальшою флюорометричною детекцією [11].

У зразках плазми крові визначали вміст гему – піридингемохромним методом, активність креатинкінази – з використанням набору „Audit Diagnostics” (Ірландія), а також білірубін, креатинін, сечову кислоту, ферум і ферумзв'язуючу здатність – з використанням наборів реактивів фірми „Філісіт-Діагностика” (Україна). Вміст лабільного феруму в плазмі крові визначали з використанням вищевказаного набору, замінивши у буферному розчині гліцин/HCl (0,2 M) на фосфатний буфер pH 7,4 (0,1 M).

Вміст загальної NO синтази в печінці та нітротирозину в плазмі крові визначали твердофазним імуноферментним аналізом (т-ІФА) за допомогою відповідних специфічних антитіл („Sigma”, США) [3].

Спектр ЕПР реєстрували на радіоспектрометрі „Varian E-109” (США) при температурі рідкого азоту. Оптичні показники розчинів визначали на спектрофотометрі „μQuant” (США).

Вміст S-нітрозотіолів у плазмі крові та швидкість утворення NO в печінці визначали оригінальними методами *in vitro* з використанням екзогенної пастки для NO (комплекс діетилдитіокарбамату та двовалентного феруму).

Визначення вмісту S-нітрозотіолів у плазмі крові ґрунтується на тому, що пастка для NO – ферум сульфурний комплекс діетилдітіокарбамату з двовалентним ферумом (ДТК-Fe) – здатна перехоплювати NO з S-нітрозотіолів [1]. До 2 мл плазми крові додавали 0,5 мл розчину діетилдитіокарбамату натрію (ДТК, 100 мкМ) та 0,5 мл розчину ферум сульфату (75 мкМ); після утримання зразків на шутері протягом 20 хв у темряві, протеїни осаджували додаванням 500 мкл насиченого розчину Ba(OH)₂, та 200 мкл 20% розчину ZnSO₄; осад протеїнів багатократно відмивали до відсутності залишків нітритів і нітратів у надосадовій рідині; до осаду протеїнів додавали розчин хлоридної кислоти до концентрації 1М; після центрифугування у надосадовій рідині визначали сумарний вміст нітритів і нітратів шляхом відновлення нітратів до нітритів на кадмієвій колонці з їх подальшим визначенням спектрофотометричним методом за допомогою реактиву Грісса [13].

Оцінку швидкості утворення NO в тканині печінки проводили за схемою: до 2 мл гомогенату тканини печінки, який готується на 10 мМ фосфатному буфері рН 7,4 у співвідношенні 1:5, додавали 0,5 мл розчину ДТК (100 мкМ) та 0,5 мл розчину ферум сульфату (75 мкМ); суміш інкубували 60 хв у темряві за температури 37°C. Подальший аналіз проводили за схемою, що описана у вищенаведеному методі.

Статистичну обробку результатів проводили у програмі Excel, для оцінки достовірності змін застосували *t*-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Характеристика моделі експериментального рабдоміолізу. Отримані нами біохімічні показники, які характеризують ступінь розвитку рабдоміолізу наведені в табл. 1. Уже на першу добу після введення щурам гліцерину в зразках плазми крові реєструвалося значне підвищення (у 10 разів) загального вмісту гему, що є результатом вивільнення гемопротеїнів, у першу чергу міоглобіну, з ушкоджених клітин м'язів. У період з 3 по 10 добу цей показник поступово зменшувався, однак залишався на підвищеному рівні щодо контрольної групи. Так, на 10 добу він у 3 рази перевищував рівень у контролі. Типовим для розвитку рабдоміолізу є стрімке зростання креатинкіназної активності. На першу добу ця активність була у 10 разів більшою за контроль, та в подальшому поступово зменшувалася, як і у випадку із загальним гемом. Коефіцієнт кореляції між змінами цих двох показників, які характеризують процес руйнування міоцитів і вивільнення внутріклітинних компонентів у кров'яне русло, становив 0,99.

Одним із механізмів захисту організму від токсичної дії вільного гему є його утилізація в гемоксигеназній реакції. На сьогодні відомі дві ізоформи гемоксигенази: індукцйбельна (ГО-1) та конститутивна (ГО-2). Перша розглядається як стресовий протеїн, синтез якого індукується у відповідь на різні стрес-фактори та забезпечує захист клітин від ушкоджуючої дії вільного гему. Раніше встановлено важливість індукції ГО-1 за умови рабдоміолізу, стимульованого гліцерином [5]. Так, у нокаутних по гену даного ізоферменту тварин на експериментальній моделі рабдоміолізу

набувають розвитку симптоми ниркової недостатності зі 100%-ною летальністю. У нашому досліді на 1–3 добу після введення гліцерину рівень ГО-активності у печінці був у 5–6 разів вищим за контрольні значення, що свідчить про індукцію даного ферменту. В результаті функціонування ГО гемова група трансформується у білірубін, спричиняючи стрімке зростання вмісту останнього в крові. На 1–3 добу експерименту рівень білірубину в плазмі крові дослідних тварин був у 7 разів вищим, ніж у контрольних тварин. Цей показник поступово зменшувався, проте на 10 добу він залишався у 4 рази вищим порівняно з контрольними значеннями.

Таблиця 1. Біохімічні показники плазми крові та печінки щурів за умови експериментального рабдоміолізу

Table 1. Biochemical characteristics of rat's blood plasma and liver under rhabdomyolysis

Показники	Групи тварин				
	гр. 1 – контроль	гр. 2 – 1 доба	гр. 3 – 3 доби	гр. 4 – 6 діб	гр. 5 – 10 діб
Плазма крові					
Загальний гем, мкМ	11±5	120±26*	45±9*	41±10*	34±9*
Креатинкіназна активність, мкМ/хв	32±10	350±95*	184±77*	68±19*	53±18*
Креатинін, мкМ	62±9	95±9*	79±10	130±18*	243±27*
Сечова кислота, мМ	0,11±0,04	0,19±0,05	0,2±0,05*	0,28±0,07*	0,39±0,11*
Сечовина, мМ	2,4±0,3	4,0±0,5*	6,5±1,0*	8,7±1,6*	8,5±1,7*
Білірубін, мкМ	4,6±0,6	31±4*	34±6*	20±4*	18±4*
Загальний ферум, мг/л	1,2±0,2	3,1±0,7*	3,5±0,7*	3,3±0,7*	2,4±0,5*
Зв'язаний ферум, мг/л	1,2±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2*	1,2±0,3	1,5±0,4
Лабільний ферум, мг/л	н.в.	2,1±0,6	2,6±0,6	2,1±0,6	0,9±0,4
Зв'язуюча здатність, мг/л	4,4±0,9	4,8±0,9	5,0±0,9	4,8±1,0	5,8±0,9*
% зв'язування феруму, %	27±3	21±4	18±3*	25±4	26±5
Печінка					
Гем-оксигеназна активність, нмоль білірубину/хв/мг білку	8,1±2,0	47±7*	51±8*	38±5*	22±7*

Примітки: * – вірогідні зміни щодо гр.1 – контроль (p(t)<0,05)

Note: * – significant changes relative to gr. 1 – control (p(t)<0.05)

Динаміка вмісту у плазмі крові таких метаболітів, як креатинін, сечовина та сечова кислота характеризують другу „хвилю” розвитку патологічного стану, що є наслідком погіршення екскреторної функції нирок.

Зміни у формах заліза в плазмі крові. Було проведено детальний аналіз параметрів, які характеризують вміст різних форм заліза у крові. У плазму крові залізо надходить із травного каналу у відновленому стані й утворює нестійкі ферум-сульфурні комплекси з альбуміном. Церулоплазмін (ЦП) окислює це залізо та сприяє його включенню до трансферину (ТР): $Fe^{+2} + ЦП \rightarrow ЦП-Fe^{+3} \rightarrow ЦП-Fe^{+3}-ТР \rightarrow Fe^{+3}-ТР$, де воно екранується від хімічної взаємодії. Важливо, що до ТР можливе приєднання тільки початково двовалентного феруму та тільки за безпосередньої участі ЦП.

Самостійне приєднання як дво-, так і тривалентного феруму до ТР у фізіологічних умовах неможливе. Якщо внаслідок ряду патологічних процесів, наприклад при гемолізі, рабдоміолізі, дії різноманітних окислювачів, у плазмі крові з'являється „лабільний” (не зв'язаний з трансферином) тривалентний ферум, він випадає зі стандартної схеми обміну феруму і тому здатен накопичуватися у крові та посилювати окисні процеси.

На користь гіпотези про утворення пулу лабільного редокс-активного тривалентного феруму в плазмі крові свідчать дані ЕПР-спектроскопічного дослідження. Окислений ферум (Fe^{+3}), на відміну від відновленого феруму (Fe^{+2}), має парамагнітні властивості, тому його сигнал реєструється у спектрі ЕПР. Залежно від мікросередовища феруму сигнал ЕПР має різні параметри. Так, ферум у складі метгемоглобіну дає сигнал з $g = 6,0$; нітрозильного комплексу гемоглобіну – $g = 2,3$; гему цитохрому Р-450 – $g = 2,52$ і $2,24$; мітохондріальних ферум-сульфурних комплексів – $g = 1,94$. Отже, ферум може бути в складі різних протеїнів і мати різні сигнали. Ці сигнали добре розділяються у спектрі ЕПР по g -фактору і можуть бути окремо визначені. Тривалентний ферум, що зв'язаний з ТР, має характерний анізотропічний синглетний сигнал $g = 4,3$ з триплетною тонкою структурою (рис. 1, А, „класичний” сигнал). Як у випадку гемолітичних процесів, наприклад при інтоксикації щурів гідроксиламіном [12], так і при гіперпродукції оксиду нітрогену [14], за умови експериментального рабдоміолізу у зразках плазми крові щурів реєструвався сигнал з $g = 4,3$, форма якого відмінна від форми відповідного сигналу у контрольній групі тварин (рис. 1, В, „рабдоміолітичний” сигнал). Такі зміни, можливо, пов'язані з формуванням нового пулу тривалентного феруму, який не зв'язаний з трансферином. Щоб підтвердити це припущення, було отримано спектр ЕПР модельного розчину Fe^{+3}

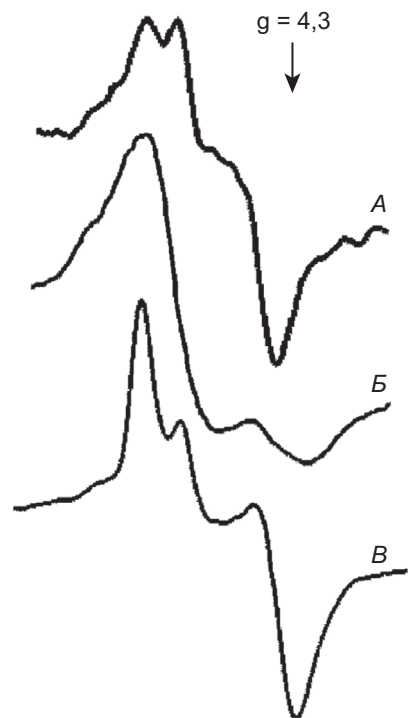


Рис. 1. Сигнали ЕПР тривалентного феруму з $g = 4,3$ у плазмі крові: А – інтактних щурів, класичний сигнал феруму у трансферині; Б – модельного розчину Fe^{+3} (20 мкМ $FeCl_3$) на 4% БСА (рН 7,4, 0,2 М фосфатний буфер); В – щурів з рабдоміолізом, індукованим гліцерином, „рабдоміолітичний” сигнал зі зміненою формою

Fig. 1. EPR signal of Fe^{+3} with $g = 4,3$ at blood plasma: А – control rats, classical signal of transferrin binded iron; Б – model solution of Fe^{+3} (20 мкМ $FeCl_3$) in 4% BSA (pH 7.4, 0.2 M phosphate buffer); В – rats with glycerol induced rhabdomyolysis, „rhabdomyolysis” signal with changed shape

(20 мкМ FeCl_3) на 4% БСА (рН 7,4, 0,2 М фосфатний буфер) зі сигналом $g = 4,3$, який представлено на рис. 1, Б. Цей сигнал не має виразного триплетного розщеплення. За умови суперпозиції останнього з „класичним” сигналом отримуємо зміну форми, що є аналогічною для сигналу у дослідній групі. Для остаточної перевірки був використаний комплексон феруму – діетилдитіокарбамат (ДТК). Попередні досліди показали, що ДТК стосовно лабільного Fe^{+3} виступає відновником. Утворюється ферум-сульфурний комплекс, у якому $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$. Тому при додаванні ДТК до модельного розчину заліза на альбуміні сигнал $g = 4,3$ зникав. ДТК не взаємодіє із Fe^{+3} , що включений до ТР. Ферумтранспортний протеїн екранує зв'язаний ферум від хімічної взаємодії. У разі додавання розчину ДТК до плазми крові інтактних тварин сигнал з $g = 4,3$ не змінювався. У випадку зразків з дослідної групи при додаванні розчину ДТК відбувалася нормалізація форми сигналу, який став аналогічним до „класичного” сигналу.

У різних органах і тканинах щурів в умовах експериментального рабдоміолізу за дії ензимів з ГО-активністю відбувалося вивільнення феруму з гему з подальшою передачею його на ферумзв'язуючі протеїни. Однак при значній інтенсивності цього процесу можливий „витік” лабільного феруму та формування його пулу в крові. У зразках плазми крові контрольних тварин така форма феруму не визначалася. У зразках дослідних тварин вже на першу добу після введення щурам гліцерину кількість лабільного феруму майже удвічі перевищувала вміст заліза у ТР контрольних тварин (табл. 1). Високий рівень лабільного феруму зберігався до 6 діб унаслідок поповнення продуктами ГО-активності, що спричиняло каталіз окисних процесів в організмі. Максимальні зміни в параметрах обміну феруму спостерігалися на 3 добу експерименту. Загальний вміст феруму плазми крові (за винятком гемового феруму, що не визначається за допомогою ферозину), на цей період зростав майже втричі порівняно з контролем. Зростання цього показника є наслідком формування пулу саме лабільного феруму, вміст якого також майже втричі перевищував вміст зв'язаного з ТР феруму. Показник зв'язаного феруму зменшився на 25% порівняно з контрольними значеннями. Проте рівень апотрансферину (зв'язуюча здатність ТР) залишався незмінним, що призвело до зменшення відсотка заповнення ТР ферумом у 1,3 рази. Коефіцієнт позитивної кореляції між вмістом лабільного феруму в плазмі крові та ГО-активністю в печінці становить 0,98 (при $p < 0,05$). Встановлений нами сильний взаємозв'язок між цими двома показниками свідчить, що саме процес катаболізму вільного гему за дії ГО-оксидази є джерелом утворення пулу лабільного феруму в крові.

Показники нітрозативного стресу за умов рабдоміолізу. Під час розвитку рабдоміолізу на фоні формування пулу лабільного феруму в крові спостерігалось підвищення показників нітрозативного стресу (табл. 2). Так, на 4 день спостерігалось збільшення вмісту загальної NO синтази у печінці удвічі щодо контролю. Суттєво підсилювалися процеси нітрузування протеїнів. Так, концентрація нітритозину в крові та печінці, а також нітрозопроліну в крові збільшилась у 3 та 2 рази відповідно. Показники загальної продукції NO в печінці та концентрація S-нітрозотіолів у плазмі крові збільшилась в 1,4 та 2 рази щодо контролю. Для перевірки гіпотези про причетність лабільного феруму до розвитку нітрозативного стресу був використаний комплекс унітіол–ферум, який має дві сульфгідрильні групи і тому утворює з лабільним ферумом стабільний ферум-сульфурний комплекс із характерним спектром оптичного поглинання (рис. 2). Дані, наведені у табл. 2, свідчать про те, що на 4 день розвитку досліджуваної патології застосування унітіолу привело до

Таблиця 2. Показники нітрозативного стресу та лабільного феруму на 4-ту добу експериментального рабдоміолізу

Table 2. Nitrosative stress and labile iron indicators at 4th day

Групи тварин	Лабільний ферум, мг/л	Загальна NO синтаза, нмоль/мг протеїну	Нітротирозин, нмоль/г протеїну		Нітрозопролін, нмоль/г тк	Загальна продукція NO, мкмоль/год/г тк	S-нітрозотіоли, мкМ
		печінка	сироватка	печінка	печінка	печінка	сироватка
гр.1 – контроль	відсутнє	0,43±0,02	7,0±1,6	8,6±0,9	8,4±0,4	70±6	1,72±0,17
гр.6 – РМ	2,4±0,6*	0,84±0,04*	21±5*	23±6*	16,5±0,8*	97±10*	3,36±0,09*
гр.7 – РМ±Унітіол	0,7±0,4#	0,55±0,03#	8,7±1,4#	11±2#	12,1±0,6#	66±10#	2,1±0,52#

Примітки: * – вірогідні зміни щодо гр. 1 – контроль ($p(t)<0,05$); # – результати, що достовірно відрізняються від гр. 2 – РМ ($p(t)<0,05$).

Note: * – significant changes relative to gr. 1 – control ($p(t)<0.05$); # – significant changes relative to gr. 2 – rhabdomyolysis ($p(t)<0.05$).

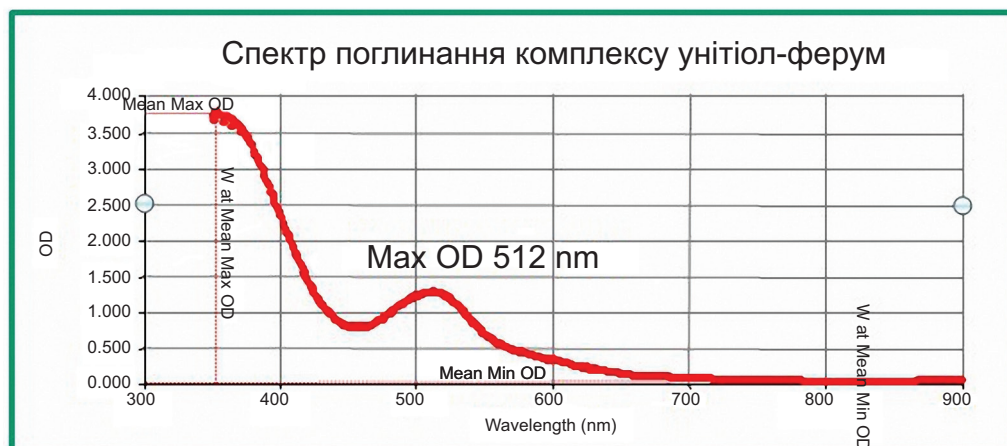


Рис. 2 Спектр поглинання комплексу унітіол-ферум. Максимум поглинання при 512 нм

Fig. 2. Absorption spectrum of unithiol-iron complex. Maximum absorption at 512 nm

зменшення концентрації лабільного феруму в плазмі крові щурів у 3 рази порівняно з аналогічним показником у групі тварин, які не отримували унітіол за умов експериментального рабдоміолізу. Зміна вмісту лабільного феруму в крові супроводжувалася зниженням показників нітрозативного стресу. Так, вміст загальної NO синтази зменшився в 1,5 разу, нітротирозину в 2 рази, нітрозопроліну в 1,3 разу ($p(t)<0,05$), загальна продукція NO в 1,4 разу, концентрація S-нітрозотіолів у 1,6 разу щодо рабдоміолізних тварин, яким не вводили унітіол. Можна припустити, що утворений в організмі тварин ферум-сульфурний комплекс унітіол-ферум перехоплює NO та утворює нітрозильний комплекс, тим самим зменшуючи певні показники, такі як вміст нітрозопохідних, а отже, зміни цих показників не є наслідком змін у концентрації лабільного феруму [10]. Однак унітіол і його комплекси не здатні

впливати на вміст ферменту – NO-синтази. Саме зменшення цього показника при введенні унітіолу дало підстави стверджувати про наявність зв'язку між вмістом лабільного феруму та інтенсивністю процесів утворення NO.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що за умови розвитку гліцерин-стимульованого рабдоміолізу у плазмі крові щурів відбувається утворення нового пулу негемового тривалентного феруму, яке не зв'язане з трансферином і тому здатне до хімічної взаємодії.

Зниження концентрації лабільного феруму за рахунок введення унітіолу приводить до зменшення показників нітрозативного стресу, а головне, вмісту загальної NO-синтази.

Таким чином, лабільний ферум, що накопичується внаслідок катаболізму вільного гему є одним з ініціаторів нітрозативного стресу за умов експериментального рабдоміолізу.

1. *Arnelle D.R., Bay B.J., Stamler J.S.* Diethyl Dithiocarbamate-Induced Decomposition of S-Nitrosothiols. **Nitric Oxide**, 1997; 1(1): 56–64.
2. *Boutaud O., Jackson Roberts L.* Mechanism-based therapeutic approaches to rhabdomyolysis-induced renal failure. **Free Radical Biology and Medicine**, 2011; 51: 1062–1067.
3. *Khan J., Brennan D.M., Bradley N.* et al. 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. **Biochemical Journal**, 1998; 330: 795–801
4. *Nath K.A.* Heme oxygenase-1: A provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. **Kidney International**, 2006; 70: 432–443.
5. *Nath K.A., Haggard J.J., Croatt A.J.* et al. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity *in vivo*. **American Journal of Pathology**, 2000; 156: 1527–1535.
6. *Remizova M.I., Kochetygov N.I., Gerbout K.A.* et al. Effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment. **European Journal of Pharmacology**, 2011; 662(1–3): 40–46
7. *Sardana M.K., Sassa S., Kappas A.* Hormonal regulation of heme oxygenase induction in avian hepatocyte culture. **Biochemical Pharmacology**, 1985; 34(16): 2937–2944.
8. *Sauret J.M., Marinides G., Wang G.K.* Rhabdomyolysis. **American Family Physician**, 2002; 65(5): 907–912.
9. *Vanin A.F., Serezhenkov V.A., Mikoyan V.D., Genkin M.V.* The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. **Nitric Oxide**, 1998; 2: 224–234.
10. *Дмитренко Н.П., Шандренко С.Г., Кузьминский С.Н.* и др. Биологическая активность нового препарата – акцептора оксида азота. **Журнал АМН України**, 1996; 2(4): 722–731.
11. *Капустяненко Л.Г., Овчаренко В.И., Дмитренко М.П.* Метод определения содержания пролина, тиропролина, нитрозопролина и нитрозотиопролина в биологическом материале при помощи тонкослойной хроматографии и флуориметрии. **Мат. X^o Укр. біохім. з'їзду в м. Одесі** (Україна, 13–17 вересня 2010 р. Одеса), 2010; 82(4): 188.
12. *Проданчук Г.Н., Шандренко С.Г., Кишко Т.О., Дмитренко Н.П.* Новые аспекты механизма токсического действия гидроксилламина. **Современные проблемы токсикологи**, 2006; 1: 37–46.
13. *Смердова Л.Н., Кишко Т.О., Паршиков А.В., Дмитренко Н.П.* Изучение влияния некоторых метаболитов на синтез оксидов азота перитонеальными макрофагами крыс. **Укр. біохім. журнал**, 1999; 71(3): 30–34.
14. *Шандренко С.Г., Кишко Т.О., Чумаченко І.М., Дмитренко М.П.* Зміни в обміні оксиду азоту та заліза у щурів? спричинені азбестом. **Укр. біохім. журнал**, 2011; 83(2): 93–100.

BLOOD LABILE IRON EFFECT ON NITROSATIVE STRESS DEVELOPMENT UNDER RAT EXPERIMENTAL RHABDOMYOLYSIS

I. M. Chumachenko, L. G. Kapustyanenko, S. G. Shandrenko

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine

e-mail: chumak_ig@yahoo.com

Under experimental model of glycerol-induced rhabdomyolysis in rats new pool of nonheme iron formation in the blood plasma and its effect on NO synthesis was studied. On the first day after intramuscular 50% glycerol injection (10 ml/kg) more than 10 times increase of free heme content in plasma and 6 times increase of heme oxygenase activity in the liver was registered. Labile ferric iron pool formation in rhabdomyolysis rat blood plasma, which is completely absent in the samples of the intact group, was proved by EPR analysis. In period from 1st to 6th day of the experiment the contents of this form of iron was greater than 2 mg / L. It is significantly higher than the concentration of transferrin associated iron. During blood labile iron pool formation, an increase of nitrosative stress indicators was observed. On the 4th day, total NO synthase concentration in the liver, as well as S-nitrosothiols and nitrosoprolin in plasma, was 2 times higher than in control. To test the hypothesis about labile iron involvement in nitrosative stress development iron acceptor – unithiol was applied. Unithiol application led to 3 time decrease in blood plasma labile iron concentration on the 4th day of pathology in comparison with animals with experimental rhabdomyolysis. Positive correlation between blood labile iron concentration and nitrosative stress indicators was detected: total NO synthase, nitrosoprolin and S-nitrosothiols concentrations decreased by 1.5 times after blood labile iron concentration lowering. Under glycerol-stimulated rhabdomyolysis development in rat, new pool of nonheme ferric iron is formed in plasma. It is not included in transferrin and therefore is capable for chemical interactions. So we can conclude that labile iron is one of nitrosative stress initiators under rhabdomyolysis.

Keywords: iron, transferrin, rhabdomyolysis, unithiol, NO.

ВЛИЯНИЕ ЛАБИЛЬНОГО ФЕРРУМА КРОВИ НА РАЗВИТИЕ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАБДОМИОЛИЗЕ У КРЫС

И. Н. Чумаченко, Л. Г. Капустяненко, С. Г. Шандренко

Институт биохимии им. О.В. Палладина НАН Украины

ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина

e-mail: chumak_ig@yahoo.com

На экспериментальной модели глицерин-индуцированного рабдомиолиза у крыс исследовано образование нового пула негемового феррума в плазме крови и определена его причастность к интенсификации образования NO. Уже на первый день после внутримышечного введения 50% глицерина в дозе 10 мл/кг регистрируется более, чем 10-кратное увеличение содержания свободного гема в плазме крови и 6-кратное повышение гемоксигеназной активности в печени. Методом ЕПР доказан факт образования в плазме крови опытных животных пула

лабільного трёхвалентного феррума, который полностью отсутствовал в образцах интактной группы. В период с первого по шестой день эксперимента содержание этой формы феррума было больше чем 2 мг/л, что существенно превышало концентрацию феррума, включенного в трансферрин. На фоне формирования пула лабільного феррума в крови наблюдалось увеличение показателей нитрозативного стресса. На четвертый день наблюдалось увеличение относительно контроля содержания общей NO синтазы в печени, а также S-нитрозотиолов и нитрозопролина в плазме крови в 2 раза. Для проверки гипотезы о причастности лабільного феррума к развитию нитрозативного стресса был применен акцептор феррума – унитиол. Применение унитиола привело к уменьшению концентрации лабільного феррума в плазме крови в 3 раза на 4-е сутки развития патологии по сравнению с животными с экспериментальным рабдомиолизом. Выявлена позитивная корреляция между содержанием лабільного феррума в крови и показателями нитрозативного стресса: содержание общей NO синтазы, нитрозопролина и S-нитрозотиолов уменьшилось в 1,5 раза на фоне падения концентрации лабільного феррума в крови. При развитии глицерин-стимулированного рабдомиолиза в плазме крови крыс происходит образование нового пула негемового трехвалентного феррума, которое не включено в трансферрин и потому способно к химическим взаимодействиям. Таким образом, лабільный феррум является одним из инициаторов нитрозативного стресса при рабдомиолизе.

Ключевые слова: феррум, трансферрин, рабдомиолиз, унитиол, NO.

Одержано: 16.07.2012