



УДК 612.014.481.1+577.112.385.2:611.018.53:577.152.6

ЕФЕКТ ВВЕДЕННЯ НЕСЕЛЕКТИВНОГО ІНГІБІТОРА NO-СИНТАЗИ ЗА УМОВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

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

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com.ua*

Досліджено сумарну активність NO-синтази та вміст нітритів і нітратів в імункомпетентних клітинах периферичної крові щурів за умов фракційного рентгенівського опромінення та на фоні перорального введення L-NAME. Встановлено, що введення L-NAME за умов дії низьких доз рентгенівського випромінювання призводить до пригнічення цитотоксичної дії оксиду азоту шляхом зниження рівня його продукції.

Ключові слова: L-NAME, NO-синтаза, нітрити, нітрати, лейкоцити, рентгенівське випромінювання.

Відомо, що імункомпетентні клітини крові у відповідь на радіаційний вплив генерують активні форми кисню (АФК) й азоту, зумовлюючи розвиток оксидативно-нітрозативного стресу. Утилізація та детоксикація АФК забезпечується, в основному, ензиматичною складовою системи антиоксидантного захисту, в якій визначальна роль належить супероксиддисмутазі (СОД), каталазі (К) та глутатіонпероксидазі (ГПО). Нашими попередніми дослідженнями [7, 8], встановлено зростання активності СОД у 2,5–3 рази за щодобового рентгенівського опромінення у дозі 1 сГр на 20-ту і 30-ту доби експерименту. Виявлено поступове зниження активності К більш ніж удвічі до 30-ї доби, що зумовлювало зростання вмісту пероксиду водню в мононуклеарних клітинах крові в 4 рази за сумарної дози опромінення 10 сГр і втричі за дози 20 сГр [3]. Активність ГПО до 20-ї доби опромінення становила 40% від норми. Зниження активності К та ГПО, за різкого зростання генерації супероксид аніону, супроводжувалося підвищенням удвічі рівня дієвих кон'югатів і семикратним зростанням вмісту ТБК-позитивних продуктів перекисного окиснення ліпідів на 30-ту добу низькоінтенсивного радіаційного впливу, посиленням окисної модифікації білків [2, 7], що, імовірно, зумовлене посиленням продукції пероксинітриту.

Встановлено, що іонізуюче випромінювання впливає на систему синтезу оксиду азоту (NO). Активація системи L-аргінін/NO супроводжується суттєвим підвищенням синтезу продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Посилення процесів ПОЛ у тканинах і клітинах сприяє посиленню гіпоксичних проявів на клітинному

рівні [9]. Як відомо, ефекти, що опосередковуються NO, блокуються N^G-похідними аргініну, які є конкурентними інгібіторами NO-синтази (NOS), представленої кількома ізоформами, що здійснюють синтез NO [16].

Метою даної роботи було дослідити вплив перорального введення L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester) – неселективного інгібітора NOS на активність даного ензиму та вміст стабільних продуктів метаболізму оксиду азоту (нітратів і нітритів) у лейкоцитах периферичної крові білих щурів за умов дії тривалого низькоінтенсивного рентгенівського випромінювання.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження були проведені на білих безпородних щурах масою 150–170 г згідно з етичним кодексом МОЗ України. Тварини перебували у стаціонарних умовах виварію 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-NAME („Sigma”, США) у концентрації 70 мг/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-NAME на фоні щодобового фракційного опромінення. Дозу опромінення контролювали клінічним дозиметром типу 27012 (Otto Shon, Німеччина). Сумарна доза на 10-, 20- і 30-ту доби опромінення становила відповідно 10, 20 і 30 сГр.

Визначення вмісту нітритів і нітратів та сумарної активності NOS проводили у лейкоцитах периферичної крові тварин після декапітації під ефірним наркозом на 10-, 20- і 30-ту доби експерименту.

Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові у градієнті густини фіколтриомбразу ($\rho=1,076-1,078$) [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. Для цього на чисте знежирене предметне скло наносили краплю лейкоконцентрату. Сухий мазок фіксували 100% метанолом і після повного висихання заливали 70% етанолом для запобігання змиву клітин, після чого фарбували за Романовським-Гімзою [11]. 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 бідистилляті, двічі лізували шляхом заморожування в рідкому азоті та відтавання на водяній бані при 37°C. Отриманий лізат використовували для визначення сумарної активності NOS та вмісту нітритів і нітратів.

Визначення активності NOS у лейкоцитах проводили в 3 мл інкубаційного середовища, що містило: 0,1 мл лізату лейкоцитів, трис-НСІ – 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 без додавання в інкубаційне середовище відповідно НАДФН(H⁺) і L-аргініну та з внесенням 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 HClO_4 (1,5 М) і реєстрували зниження екстинкції. Активність NOS виражали в нмолях НАДФН(H^+), окисленого протягом 1 хв у розрахунку на 1 мг білка в пробі [5, 13, 14].

Визначення вмісту нітритів проводили згідно з методом [17], а нітратів – згідно з методом [1, 6].

Концентрацію білка у зразках визначали методом Лоурі [20].

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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що вплив рентгенівського опромінення у щодобовій дозі 1 сГр зумовлює стійке зростання сумарної активності NOS та вмісту стабільних продуктів метаболізму NO впродовж 30-добового експерименту (рис. 1, табл. 1). За умов опромінення активність NOS достовірно зростала у 2 та 4 рази на 20-ту і 30-ту доби експерименту порівняно з контрольними показниками. Значне підвищення активності ензиму, однак, не призводило до вірогідних змін вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту на ранніх етапах радіаційного впливу, що, ймовірно, пов'язане з розвитком гіпоксії за тривалого рентгенівського опромінення. Лише на 30-ту добу опромінення виявлено тенденцію до зростання вмісту нітратів і вірогідне зростання вмісту нітритів (на 64%) порівняно з контролем.

За нормальних фізіологічних умов синтез NO здійснюється NOS за присутності кисню, оскільки саме він включається в гуанідинову групу аргініну [12]. При патологічних процесах, що перебігають на тлі гіпоксії, роль NO-синтазного механізму (окисного

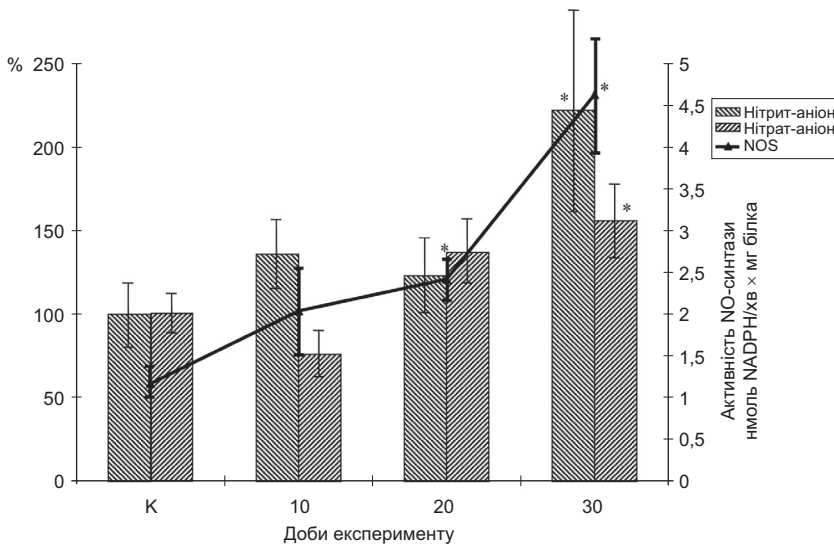


Рис.1. Динаміка змін вмісту нітритів і нітратів (діаграма, контроль прийнято за 100%) та активність NO-синтази (графік) у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов радіаційного впливу
Примітка: * – різниця між дослідом і контролем вірогідна, $p \leq 0,05$

Fig.1. The dynamic of nitrite and nitrate changes (diagram, control is taken as 100%) and NO-synthase activity (graph) in peripheral blood leukocytes of rats under X-ray radiation
Note: * – the difference between experiment and control is trustworthy, $p \leq 0,05$

шляху продукції NO) може знижуватися, зате може зростати активність нітритредуктазної ланки утворення оксиду [10, 15]. В організмі ссавців нітритредуктазну активність мають гемоглобін, міоглобін, цитохромоксидаза, цитохром P450 і ксантинооксидаза, які у дезоксиформі можуть відновлювати іони NO_2^- до NO [15, 18].

Високоспецифічні функції цих ензимів визначаються вмістом у складі гему порфіринового кільця, що має систему спряжених зв'язків і делокалізовану рухливу π -електрони. Завдяки цьому вони здатні легко віддавати і приймати електрони і ефективно вступають в окисно-відновні реакції. За відсутності кисню або за умов його дефіциту відновлені гемвімісні білки починають переносити електрони на іони NO_2^- , які, у свою чергу, відновлюються до NO. Незважаючи на суперечливі дані щодо тканинної локалізації нітритредуктази [19], можна припустити, що зниження вмісту нітритів і нітратів на перших етапах експерименту пов'язане з відновленням аніонів NO_2^- до NO за участю ферментів, що мають нітритредуктазну активність за умов кисневого голодування.

Таблиця 1. Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту (нмоль/мг білка) й активність NO-синтази (нмоль NADPH/хв мг білка) у лейкоцитах периферичної крові щурів ($M \pm m$, $n=6$)

Table 1. Content of stable nitric oxide metabolites (nmol/mg protein) and NO-synthase activity (nmol NADPH/min per mg protein) in the leukocytes of peripheral blood of rats ($M \pm m$, $n=6$)

Доба 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-NAME		
10	0,65±0,15	19,3±3,5*	0,64±0,23
20	0,28±0,06*	11,5±3,9*	0,34±0,16
30	0,47±0,11*	21,3±3,6*	0,28±0,08*
	Опромінення + L-NAME		
10	0,28±0,07*	16,2±1,4*	0,78±0,14
20	0,66±0,29	14,9±2,3*	0,45±0,09*
30	0,84±0,32	49,6±3,0	0,26±0,11*

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

Наявність NO-синтазного механізму забезпечує синтез NO та подальше утворення стабільних продуктів метаболізму оксиду азоту (NO_2^- та NO_3^-), а висока активність нітритредуктазних систем за умов гіпоксії створює умови для того, щоб ланка циклу оксиду азоту: L-аргінін \rightarrow NO \rightarrow $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, функціонувала безперервно. Таким чином, завдяки взаємоз'язку цих двох ланок системи L-аргінін/NO, що беруть участь в утворенні NO за присутності кисню і за умов гіпоксії досягається універсальна

цілісність циклу оксиду азоту, а перемикання на нітритно-нітратний шлях розглядається як фактор корекції, що підвищує виживання в умовах гострої гіпоксії [15].

Введення L-NAME неопроміненим тваринам зумовлювало зниження сумарної активності NOS у лейкоцитах периферичної крові щурів на всі досліджувані терміни, проте достовірне зниження, у 4 рази, порівняно з контрольними значеннями, спостерігалось лише на 30-ту добу експерименту. Істотне зниження синтезу оксиду азоту у лейкоцитах периферичної крові піддослідних тварин, внаслідок інгібування NOS, супроводжувалося зниженням вмісту в них нітритів і нітратів (рис. 2, табл. 1).

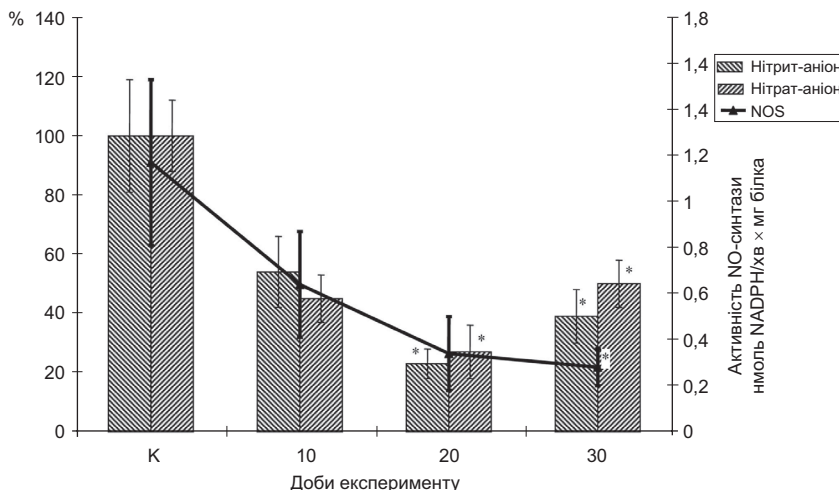


Рис. 2. Динаміка змін вмісту нітритів і нітратів (діаграма, контроль прийнято за 100%) та активність NO-синтази (графік) у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов перорального введення L-NAME

Примітка: * – різниця між дослідом і контролем вірогідна, $p \leq 0,05$

Fig. 2. The dynamics of nitrites and nitrates (diagram, control is taken as 100%) and NO-synthase activity (graph) in peripheral blood leukocytes of rats under *per os* L-NAME administration

Note: * – difference between experiment and control is trustworthy, $p \leq 0,05$

На 20-ту добу експерименту вміст NO_2^- та NO_3^- у лейкоцитах периферичної крові щурів становив відповідно лише 23% та 26% від рівня контролю. На 30-ту добу введення неселективного інгібітора NOS вміст стабільних метаболітів оксиду азоту дещо зростав, але залишався в межах 50% від норми.

У лейкоцитах периферичної крові щурів, яких піддавали 30-добовому рентгеновському опроміненню, на фоні перорального введення L-NAME, встановлено зниження активності NOS на всі терміни експерименту (рис. 3, табл. 1), на противагу групі тварин, які зазнавали впливу лише іонізуючого випромінювання. На 10-ту та 20-ту доби сукупного впливу обох факторів виявлене вірогідне зниження вмісту стабільних метаболітів NO. Однак зниження активності NOS до 20% від контролю на 30-ту добу експерименту не призводило до вірогідних змін вмісту NO_2^- та NO_3^- в імункомпетентних клітинах крові (рис. 3). Підвищення вмісту нітритів і нітратів до рівня контрольних показників на тлі зниження активності NOS, можливо, зумовлене посиленням процесів вивільнення NO з депо оксиду азоту, які були сформовані у результаті S-нітрозилювання білків з подальшим його окисненням до NO_2^- та NO_3^- .

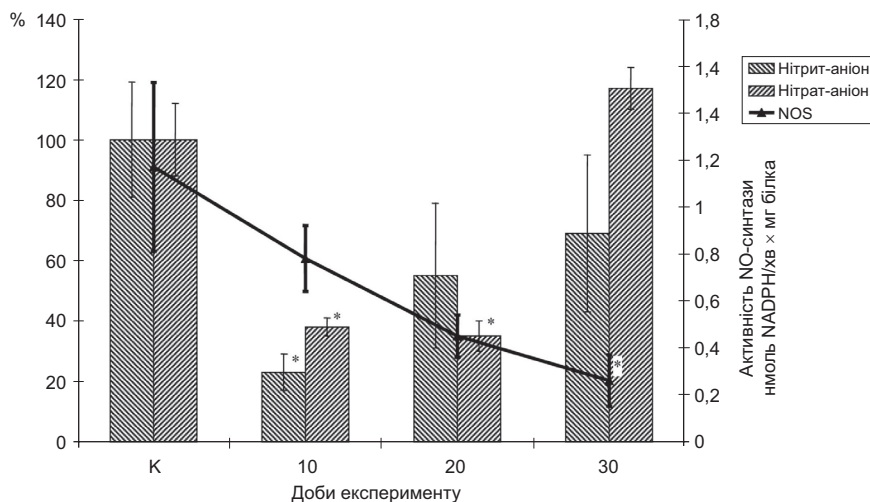


Рис. 3. Зміни вмісту нітритів і нітратів (діаграма, контроль прийнято за 100%) та активність NO-синтази (графік) у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов перорального введення L-NAME та іонізуючого випромінювання

Примітка: * – різниця між дослідом і контролем вірогідна, $p \leq 0,05$

Fig. 3. The dynamics of nitrites and nitrates (diagram, control is taken as 100%) and NO-synthase activity (graph) in peripheral blood leukocytes of rats under *per os* L-NAME administration and ionizing radiation

Note: * – difference between experiment and control is trustworthy, $p \leq 0,05$

Встановлено, що пероральне введення L-NAME призводить до стійкого зниження активності NOS у лейкоцитах периферичної крові щурів упродовж тривалого впливу фракційного рентгенівського випромінювання в добовій дозі 1 сГр та зниження вмісту нітритів і нітратів на ранніх стадіях експерименту. За умов досліду L-NAME виявляв цитопротекторний ефект шляхом зниження рівня продукції оксиду азоту і, тим самим, запобігав розвитку оксидативно-нітрозативного стресу.

1. 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. *Лабораторна діагностика*, 2001; 3: 43–45.
2. Климишин Н.І., Старикович Л.С., Клевета Г.Я. та ін. Окислювальна модифікація ліпідів та білків за дії низькоінтенсивного рентгенівського випромінювання. *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.*, 2007; 45: 63–70.
3. Клевета Г.Я., Чайка Я.П., Старанко У.В., Дацюк Л.О. Вплив низькоінтенсивного рентгенівського випромінювання на морфофункціональний стан імункомпетентних клітин крові. *Експериментальна фізіологія та біохімія*, 2006; 3: 29–33.
3. Лаповець Л., Луцик Б. *Лабораторна імунологія*. Київ: Арал, 2004. 173 с.
4. Сагач В., Присяжна О., Ткаченко М., Коцюрuba А. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету. *Фізіологічний журнал*, 2005; 2: 3–7.
5. Сибірна Н.О., Маєвська О.М., Барська М.Л. *Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу*. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. 60 с.

6. *Старикович Л.С., Дацюк Л.О., Климишин Н.І.* та ін. Радіоіндукована окисна модифікація білків та активність ферментів антиоксидантного захисту лімфоцитів щурів. Роль месенджерних систем у патогенезі патологічних процесів різної етіології. **Медицина хімія**, 2007; 9(4): 91.
7. *Старикович Л.С., Дацюк Л.О., Старанко У.В.* та ін. Дослідження прогностичної ролі активності ферментів антиоксидантного захисту в окисній модифікації білків після дії низькоінтенсивного іонізуючого випромінювання. **Лабораторна діагностика**, 2008; 43: 57–60.
8. *Звягина Т.В., Белик И.Е., Кривошей А.А., Гринь В.К.* Оксид азота как активная форма кислорода. **Украинский медицинский альманах**, 2001; 4(6): 203–205.
9. *Ивашкин В.Т., Драпкина О.М.* Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем. **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии**, 2000; 4: 16–21.
10. *Кондрахин И.П., Кудрин Н.В., Малахов А.Г.* **Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии**. Москва: Агропромиздат, 1985. 287 с.
11. *Кургалюк Н.Н.* Оксид азота как фактор адаптационной защиты при гипоксии. **Успехи физиологических наук**, 2002; 33(4): 65–79.
12. *Онуфриев М.В., Гуляева Н.В.* Регистрация окисления NADPH как подход к оценке активности NO-синтазы. **Бюл. эксп. биол. и мед.**, 1995; 120(8): 148–150.
13. *Сумбаев В.В., Ясинская И.М.* Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс. **Современные проблемы токсикологии**, 2000; 3: 3–7.
14. *Реутов В.П.* Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности. **Биохимия**, 2002; 67(3): 353–375.
15. *Bernatova I., Kopincova J., Puzserova A.* et al. Chronic Low-Dose L-NAME Treatment Increases Nitric Oxide Production and Vasorelaxation in Normotensive Rats. **Physiol. Res**, 2007; 2: 17–24.
16. *Green L., Wagner D., Glogowski J.* Analysis of nitrate, nitrite and 15N-nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem**, 1982; 126(1): 131–138.
17. *Haitao L., Hongmei C., Xiaoping L., Zweier J.* Xanthine Oxidase Catalyzes Anaerobic Transformation of Organic Nitrates to Nitric Oxide and Nitrosothiols. **The Journal of Biological Chemistry**, 2005; 280(17): 16594–16600.
18. *Jansson E., Huang L., Malkey R., Govoni M.* et al. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. **Nature Chemical Biology**, 2008; 4(7): 411–417.
19. *Lowri O.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Biol. Chem**, 1951; 193(1): 265–275.

THE EFFECTS OF ADMINISTRATION OF NONSELECTIVE INHIBITOR OF NO-SYNTASE UNDER X-RAY RADIATION

L. O. Datsyuk, Yu. V. Peretiakko, U. V. Staranko, N. O. Sybirna
Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine

Total activity of NO-synthetase and content of nitrates and nitrites in immunocompetent cells of rat peripheral blood under the influence of fraction x-ray radiation and peroral administration of L-NAME were studied. It was shown that administration of L-NAME leads to inhibition of nitric oxide cytotoxic effect by reducing its production under the influence of low doses of x-ray radiation.

Key words: L-NAME, NO-synthase, nitrates, nitrites, leukocytes, x-ray radiation.

**ЭФФЕКТ ВВЕДЕНИЯ НЕСЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА NO-СИНТАЗЫ
В УСЛОВИЯХ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ**

Л. О. Дацюк, Ю. В. Перетятко, У. В. Старанко, Н. А. Сибирная

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

Изучено общую активность NO-синтазы и содержание нитритов и нитратов в иммунокомпетентных клетках периферической крови крыс при воздействии фракционного рентгеновского облучения и на фоне перорального введения L-NAME. Установлено, что введение L-NAME при воздействии низких доз рентгеновского излучения приводит к угнетению цитотоксического влияния оксида азота путем снижения его продукции.

Ключевые слова: L-NAME, NO-синтаза, нитриты, нитраты, лейкоциты, рентгеновское излучение.

Одержано: 21.10.2009