

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА И ПРОЦЕССОВ НИТРОЗИЛИРОВАНИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

¹Н.М. Ёлкина, ²А.В. Коцюруба, ²В.Ф. Сагач, ²Ф.В. Добровольский, ³С.В. Коношенко, ⁴В.В. Казакова

¹Кафедра физической культуры, спорта и здоровья человека (зав. кафедрой – доц. Е.Г. Луцук), Крымский факультет Запорожского национального университета, г. Симферополь;

²Отдел физиологии кровообращения (зав. отделом – чл.-корр. НАН Украины В.Ф. Сагач) Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев;

³Кафедра биохимии (зав. кафедрой – проф. А.П. Симчук), Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, г. Симферополь;

⁴Кафедра медицинской биологии (зав. кафедрой – доц. С.А. Кутя), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь.

PECULIARITIES OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS SYSTEM AND PROCESSES OF NITROSYLATION IN ERYTHROCYTES UNDER ISCHEMIC HEART DISEASE

N.M. Yolkina, A.V. Kotsuruba, V.F. Sagach, F.V. Dobrovolski, S.V. Konoshenko, V.V. Kazakova

SUMMARY

It has been shown that in erythrocytes of patients with ischemia heart disease the system of nitric oxide synthesis is changed, the metabolism of L-arginine by arginase prevails over oxidative metabolism and accumulation of NO-anions is lowered. At the same time the content of high-molecular products of nitrosylation is raised and the content of low-molecular products of nitrosylation is lowered.

ОСОБЛИВОСТІ СИСТЕМИ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ І ПРОЦЕСІВ НІТРОЗИЛЮВАННЯ В ЕРИТРОЦИТАХ ЗА ІШЕМІЧНОЇ ХВОРОБИ СЕРЦЯ

Н.М. Йолкіна, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач, Ф.В. Добровольський, С.В. Коношенко, В.В. Казакова

РЕЗЮМЕ

Показано що в еритроцитах хворих на ішемічну хворобу серця відбуваються зміни у системі синтезу оксиду азоту, що веде до переваги неокисного, аргіназного метаболізму над окисним метаболізмом L-аргініну і до зниження рівня NO-аніонів. Разом із тим, спостерігається збільшення вмісту в еритроцитах високомолекулярних продуктів нітрозилування і зниження вмісту низькомолекулярних нітрозотолів.

Ключевые слова: эритроциты, система синтеза оксида азота, NO-синтазы, NO-анионы, аргиназа, низкомолекулярные и высокомолекулярные нитрозотиилы, ишемическая болезнь сердца.

Известно, что многие заболевания, в том числе сердечно-сосудистые, характеризуются развитием окислительного стресса в результате нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия и усиленного протекания свободно-радикальных реакций с участием активных форм кислорода [2, 4, 5].

Вместе с этим, за последние годы накопилось достаточно много данных, свидетельствующих о тесной взаимосвязи продукции свободных радикалов кислорода и оксида азота [7]. Имеются данные о том, что оксид азота (NO) является одним из универсальных регуляторов физиологических функций организма с достаточно широким спектром биологического действия [1]. Так, известно, что в оптимальных концентрациях NO улучшает эндотелиальную функцию периферических сосудов, положительно влияет на активность отдельных протеинкиназ, способен ингибировать каспазы, угнетать индукцию апоптоза [13, 14]. Однако, синтез оксида

азота в повышенных концентрациях, превышающих допустимый стационарный уровень, может быть причиной развития нитрозативного стресса, обусловленного образованием активных форм азота (АФА), прежде всего, пероксинитрита и продукта его деградации диоксида азота [7].

Одним из маркёров нитрозативного стресса рассматривается образование низкомолекулярных и высокомолекулярных нитрозотиилов, в частности, продуктов нитрозилирования протеинов [7].

Ранее было показано, что при ишемической болезни сердца (ИБС) в эритроцитах усиливаются реакции перекисного окисления липидов и окислительной модификации протеинов [3]. Учитывая это и то, что при ряде заболеваний в патологический процесс вовлекаются эритроциты [3, 6], представляло интерес изучить отдельные показатели системы синтеза оксида азота и процессов нитрозилирования в эритроцитах больных ИБС, что и составило

цель настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (25 доноров станции переливания крови) и больных ИБС (20 человек, средний возраст 50,0 лет). В каждой обследованной группе соотношение мужчин и женщин было приблизительно одинаковым. Кровь больных брали на базе Крымского кардиологического 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 [8]. 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 [9].

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^- [12].

Процессы нитрозилирования оценивали, определяя содержание низкомолекулярных и высокомолекулярных нитрозотиолов [11].

Использовали спектрофотометрические методы биохимического анализа.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, в эритроцитах больных ИБС существенно снижается интенсивность конститутивного синтеза оксида азота. Активность кальций-зависимой, конститутивной синтазы оксида азота была на 52,3% меньше по сравнению с контрольной группой доноров (таблица). Интенсивность индуцибельного синтеза оксида азота была значительно больше. Активность кальций-независимой NO-синтазы увеличивалась в 2,7 раза 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 ИБС наблюдалось выраженное снижение данного показателя – до 25,6%.

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 ИБС данный показатель возрастает в 1,7 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 1,45 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 существенно снижается по сравнению с контрольной группой доноров. Содержание нитрит-анионов NO_2^- снижалось в 3,0 раза, содержание нитрат-анионов NO_3^- – в 2,2 раза, что может свидетельствовать либо о торможении процессов окисления NO (на фоне достаточно высокой активности индуцибельной синтазы оксида азота), либо о более активном использовании NO в других реакция метаболизма оксида азота, в частности, в реакциях нитрозилирования органических субстратов.

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

Содержание низкомолекулярных нитрозотиолов (НМНТ), в отличие от ВМНТ, снижалось (в 3,36 раза по сравнению с контрольной группой).

Поскольку одним из основных представителей низкомолекулярных нитрозотиолов является нитрозоглутатион [7], можно предположить, что при ишемической болезни сердца 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 гемю как один из механиз-

мов регуляции его средства к кислороду, образования оксигенированной формы.

Öááëèòà 1

Показатели системы синтеза оксида азота и процессов нитрозилирования в эритроцитах больных ИБС (процентная доля относительно показателя контрольной группы); M±m

Показатели	Обследованные группы	
	Контрольная группа	Больные ИБС
cNOS	100 ± 15,0	47,7 ± 8,0**
iNOS	100 ± 16,4	265,0 ± 47,0**
% cNOS	66,3 ± 6,4	25,6 ± 3,6**
Аргиназа	100 ± 8,0	174,3 ± 30,0**
Arg/NOS	100 ± 17,0	145,0 ± 19,0**
NO ₂ ⁻	100 ± 18,0	32,6 ± 5,9**
NO ₃ ⁻	100 ± 16,0	46,0 ± 9,0**
HMHT	100 ± 11,3	29,8 ± 5,3**
BMHT	100 ± 13,5	294,6 ± 42,9**

Примечание *: – контроль – 100%; ** – достоверность отличия показателя относительно контрольной группы (p<0,05).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при ишемической болезни сердца 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 ИБС могут иметь определенное значение, влияя на генерирование АФА и уровень свободного глутатиона, а также на функциональное состояние эритроцитарных протеинов, участвующих в процессах нитрозилирования.

ВЫВОДЫ

1. В эритроцитах больных ишемической болезнью сердца осуществляются изменения в системе синтеза оксида азота, ведущие к преобладанию неокислительного, аргиназного метаболизма над окислительным, NO-синтазным метаболизмом L-аргинина, а также к снижению уровня NO-анионов.

2. При ишемической болезни сердца в эритроцитах изменяется соотношение низкомолекулярных и высокомолекулярных продуктов нитрозилирования: существенное увеличение содержания высокомолекулярных нитрозотиолов сочетается с уменьшением содержания низкомолекулярных нитрозотиолов.

3. Изменения в системе синтеза оксида азота в эритроцитах при ишемической болезни сердца могут иметь определенное значение, оказывая влияние на генерирование активных форм азота и поддержание уровня свободного глутатиона.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

2. 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.

3. Ёлкина Н.М. Энзиматическая активность эритроцитов человека при ишемической болезни сердца в условиях развития окислительного стресса / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко, Илиас Шашуа // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – Серия: Биология, химия. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 124-128.

4. Меньшиков Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-169.

5. Меньшиков Е.Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин // Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

6. 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.

7. Сагач В.Ф. Пригнічення оксидативного та нитрозативного 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 // Физиол. журн. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 46-54.

8. 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.

9. Chin S.Y. Increased activity and expression of Ca²⁺ – 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.

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. Gerdel D. Inhibition of the catalytic activity of alcoholdehydrogenase by NO is associated with S-

nitrosylation and the release of zinc / D. Gerdel, A.J. Cederbaum // Biochemistry. – 1996. – V. 35, N 50. – P. 16186-16194.

12. 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.

13. 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.

14. 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.