

ЗМІНИ В ОБМІНІ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ЗАЛІЗА У ЩУРІВ, СПРИЧИНЕНІ АЗБЕСТОМ

С. Г. ШАНДРЕНКО, Т. О. КІШКО, І. М. ЧУМАЧЕНКО, М. П. ДМИТРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;
e-mail: dmytrenko@biochem.kiev.ua

Метою роботи було порівняти інтенсивність процесів синтезу NO в тканині легень і печінки щурів лінії Wistar на моделі інтратрахеального введення азбестових волокон та дослідити зміни в обміні заліза. Азбест марки А6-45, просіяний через сито розміром 0,1 мм, вводили в дозі 5 мг/кг в 0,2 мл фізіологічного розчину. Для оцінки інтенсивності синтезу NO використали метод ЕПР та пастку NO: комплекс діетилдітіокарбамат – залізо (ДТК-Fe²⁺). Біохімічні та ЕПР-показники визначали на 3, 6 та 10 добу після інстиляції азбесту. Результати дослідження свідчать про те, що введені інтратрахеально азбестові волокна спричиняють активацію синтезу NO в тканині легень. Підвищена NO-синтазна активність зберігається принаймні 10 діб на рівні 2 мкмоль/(год·г тканини). Утворення нітрозильного комплексу негемового заліза (DNIC) у печінці на рівні 2 мкмоль/г тканини у разі відсутності нітрозильного комплексу гемоглобіну в зразках крові свідчить про те, що процес активації синтезу NO відбувається не тільки в місцях локалізації азбестових волокон (в легенях), але і в інших органах.

Гіперпродукція NO призводить як до зменшення кількості заліза в залізотранспортувальному протеїні крові – трансферині, так і до накопичення у крові окисленого негемового заліза, що не включене до трансферину. Накопичення неекранованого протеїном заліза може бути одним із пускових механізмів оксидативного стресу.

Ключові слова: азбест, оксид азоту, нітрозильні комплекси, ЕПР, залізо.

У патогенезі фіброзу легень під дією пилу мінеральних речовин ключове місце займають два процеси: розвиток нітрозативного та оксидативного стресів [1]. Механізми експресії індукцибельної NO-синтази (iNOS) у тканині легень під впливом азбестових волокон та її внесок у формування цілої низки азбестстимульованих пульмонологічних патологій достатньо широко досліджувалися, починаючи з кінця 90-х років минулого сторіччя [2, 3], проте науковий інтерес до цієї проблеми залишається і досі [4]. У клінічних дослідженнях показано, що пацієнти з азбестозом мають суттєво підвищені концентрації NO у зразках повітря, що видихається і цей показник можна використовувати для оцінки важкості цієї патології [5, 6]. Зрозуміло, що у разі інгаляційного ураження азбестовим пилом органом-мішенню, де розвиваються патологічні процеси, є легені, тому основна увага в дослідженнях приділена саме їм. Однак, запуск азбестстимульованих патологічних процесів у легенях може не носити суто локальний характер. Хоча основну роль в активації NO-синтазної системи організму, в даному разі, відводиться саме альвео-

лярним макрофагам [2, 7], які реагують на механічні частинки пилу, генеруючи активні форми кисню та азоту, і цей процес носить суто локальний характер, ми припускаємо, що гіперпродукція NO через сигнальні системи може генералізовано ініціалізуватися в організмі.

Здатність NO безпосередньо взаємодіяти з залізом, значною мірою, обумовлює його фізіологічні і токсичні ефекти, а також його регуляторну функцію по відношенню до метаболізму заліза [8]. NO оборотно зв'язується з гемовим залізом гуанілатциклази, циклооксигенази, каталази, сімейства ліпоксигеназ, NOS, цитохрому P-450 і пероксидаз, цитохромів електронтранспортного ланцюга мітохондрій, а також з гемовим залізом оксигемоглобіну [9]. NO в реакції з негемовим двовалентним залізом і парними тіоловими групами низькомолекулярних лігандів, пептидів і протеїнів утворює динітрозильний комплекс негемового заліза (DNIC), що сприяє депонуванню, транспортуванню на значні відстані і транснайтрозуванню NO [10]. Ендогенне утворення DNIC можливе внаслідок присутності в клітинному цитозолі, так званого, вільного

фонду відновленого заліза (ВФЗ) [11]. Це залізо через високі концентрації аскорбінової кислоти, глутатіону та інших відновників знаходиться у вигляді ферро-іону, слабо зв'язаного з різними низькомолекулярними органічними хелаторами (цитрат, ізоцитрат, піруват, фосфат, АТР, АDP), а також із SH-групами протеїнів, ліпідами мембран і вільним геміном. Концентрація ВФЗ складає 0,2–3,0% від його клітинного фонду і підтримується на нетоксичному рівні (3–10 мкМ). Через участь у метаболізмі NO ВФЗ може зазнавати суттєвих змін, тим самим, впливаючи на загальний метаболізм заліза в організмі. Крім того, іони заліза, що знаходяться на поверхні азбестового волокна, суттєво модифікують гомеостаз заліза в тканині легень [12].

Метою даної роботи було за допомогою ЕПР-спектроскопії порівняти інтенсивність азбестстимульованих процесів гіперпродукції NO у тканині легень та печінки, а також дослідити зміни обміну заліза у зразках сироватки крові на цій експериментальній моделі гіперпродукції NO.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на щурах самцях лінії Wistar масою 220–240 г, раціон харчування яких складався з концентрованого гранульованого комбікорму. З раціону були вилучені овочі для зменшення надходження до організму щурів нітритів та нітратів.

Тварини були розділені на 8 груп по 6 у кожній (табл. 1): щурам груп № 1, 2 ввели разово інтратрахеально 0,2 мл фізіологічного розчину; тваринам груп № 3–8 ввели разово інтратрахеально суспензію азбестового волокна в дозі 5 мг/кг в 0,2 мл фізіологічного розчину; тваринам із груп № 2, 6, 7, 8 за 40 хв до забою ввели екзогенну пастку NO: розчин діетилдитіокарбамату натрію (ДТК) у дозі 500 мг/кг в 2,5 мл фізіологічного розчину перитоніально та розчин цитрату двовалентного заліза (сульфат заліза 37,5 мг/кг + цитрат натрію 187,5 мг/кг) підшкірно для оцінки інтенсивності NO-продукції у тканині легень по розмаху сигналу ЕПР нітрозильного комп-

лексу ДТК-Fe-NO. Щурів виводили з експерименту декапітацією під ефірним наркозом по такій схемі: через 3 доби після інстиляції азбесту – групи № 3, 6; через 6 діб – групи № 4, 7; через 10 діб – групи № 5, 8; а також по 2 тварини із груп № 1, 2 забивали на кожному з етапів.

Після чого відбирали зразки крові, тканини легень, печінки для ЕПР-спектроскопічного та біохімічного аналізів.

ЕПР-спектри реєстрували на радіо-спектрометрі «Varian E-109» (США) з наступними параметрами: діапазон зміни магнітного поля для тканин органів – (2750–3750) Gs; для зразків крові – (0–4000) Gs; амплітуда модуляції магнітного поля – 8 Gs (2 Gs для вільних радикалів); частота модуляції магнітного поля – 100 кГц; потужність НВЧ коливань – 5 мВт (0,2 мВт для вільних радикалів); частота НВЧ коливань – (9,6–9,9) ГГц.

В ЕПР-спектрі зразків тканини печінки визначали розмах сигналів:

$g = 2,25$ – цитохром P-450 з гемовим залізом у низькоспіновій окисненій формі;

$g = 2,14$ – Mn²⁺-вміщуючі протеїни ендоплазматичного ретикулула;

$g = 2,05$ – Cu²⁺-вміщуючі протеїни: супероксиддисмутаза, цитохромоксидаза;

$g = 2,00$ – мітохондріальні убіхінони та флавопротеїни у вільнорадикальній формі (ВР);

$g = 1,97$ – мітохондріальний ензим сульфітоксидаза у відновленому стані з атомом Mo⁷⁺ в активному центрі, ксантинооксидаза;

$g = 1,94$ – залізоісичані протеїни мітохондріальних дихальних ланцюгів із негемовим залізом у відновленому стані (ЗСЦ);

В ЕПР-спектрі зразків крові визначали: $g = 6,0$ – метгемоглобін із гемовим залізом у окисненій високоспіновій формі;

$g = 4,2$ – трансферин, по вмісту Fe³⁺;

$g = 2,05$ – церулоплазмін, по вмісту Cu²⁺;

$g = 2,03$ – нітрозильний комплекс гемоглобіну Hb-NO;

$g = 2,0$ – вільні радикали з часом життя більше ніж 10⁻⁷ сек.

В ЕПР-спектрі зразків тканини легень щурів із груп № 2, 6, 7, 8 визначали

Таблиця 1. Схема використання тварин (№ груп) у дослідженні (n = 6)

Показники, що визначаються	Контрольні тварини	Піддослідні тварини з азбестом		
		3 дні	6 днів	10 днів
Пастка-NO: ДТК-Fe-NO	2	6	7	8
Інші ЕПР та біохімічні показники	1	3	4	5

інтенсивність сигналу нітрозильного комплексу ДТК-Fe-NO.

Кількість парамагнітних нітрозильних комплексів визначали шляхом подвійного інтегрування відповідного ЕПР-сигналу за допомогою програми Multicon, за стандарт використовували сигнал ДТК-Cu²⁺.

У зразках печінки визначали інтенсивність процесів ПОЛ за накопиченням тіобарбітурат-активних продуктів (малоновий діальдегід (МДА)); у сироватці крові визначали сумарну концентрацію метаболітів NO – нітритів та нітратів за допомогою реактиву Грісса після відновлення нітрату до нітриту на кадмієвій колонці [13].

Суспензію азбестових волокон марки А6-46 (1 г/20 мл води) пропустили через сито з розмірами отворів 0,1 мм, після центрифугування осад висушили при 50 °С та використовували для інстиляції тваринам.

Статистичну обробку проводили у програмі Statistica, достовірність змін оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Зміни в обміні NO. Для визначення кількості синтезованого NO у тканині легень використовували пастку NO – комплексу ДТК-Fe²⁺, яка в реакції з NO утворює парамагнітний мононітрозильний комплекс ДТК-Fe-NO з ха-

рактерним ЕПР-сигналом, що має триплетну структуру з наступними параметрами: $S = 1/2$, $I = 1$, $g_{\perp} = 2,038$, $g_{\parallel} = 2,012$, тонка структура триплету $A_{\perp} = 12$ Gs (рис. 1). Гідрофобний комплекс ДТК-Fe²⁺, накопичуючись у тканинах, акцептує вільний NO з утворенням стабільного парамагнітного мононітрозильного комплексу. Характерний сигнал нітрозильного комплексу за рахунок триплетного розщеплення чітко ідентифікується в ЕПР-спектрі тканини та є інтегральним показником кількості NO, синтезованого в тканинах за певний проміжок часу (комплекс вводиться за 40 хв до виведення тварин з експерименту). Результати дослідження представлені в табл. 2. Інтенсивність ЕПР сигналу «пастка-NO» у тканині легень на 3, 6 та 10 добу була відповідно в 12, 16 та 14 разів більшою за контроль ($P < 0,05$), що однозначно свідчить про активацію NO-синтазної системи в легенях під впливом азбестових волокон.

Різні дослідники [1, 2] вивчали зміни у NO-синтезуючих системах, в основному, протягом перших 5-ти діб після інстиляції азбесту. По нашим даним протягом 10 діб продукція NO в легенях залишається на високому рівні. Незначна кількість NO, що зареєстрована у зразках тканини легень контрольних тварин, пов'язана зі стимуляцією продукції NO великою кількістю заліза, яке вводилося щуром

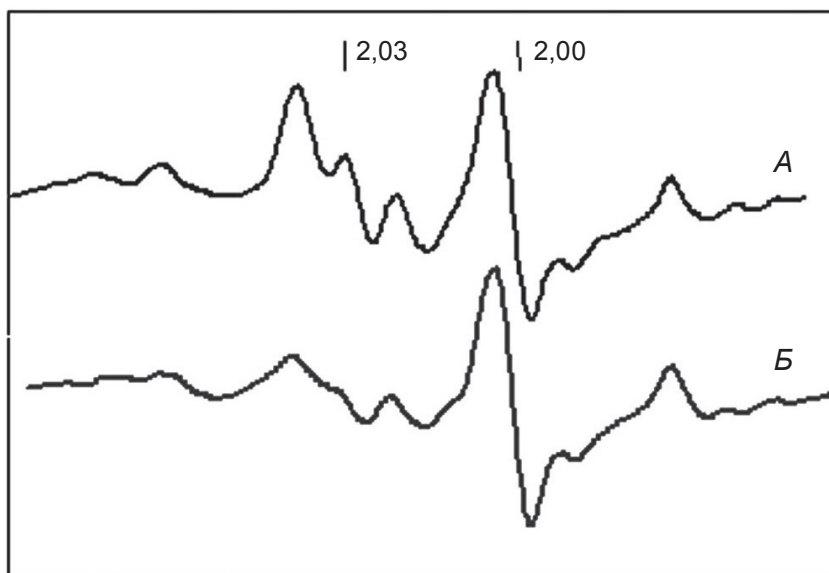


Рис. 1. Типові спектри ЕПР тканини легень щурів при введенні пастки NO – ДТК+Fe²⁺. Триплетний сигнал з $g = 2,03$ відповідає мононітрозильному комплексу ДТК+Fe²⁺-NO. А: щури з внутрішньотрахеальним введенням азбесту (групи 6–8). Б: контрольні тварини (група 1). Мононітрозильний комплекс ДТК+Fe²⁺-NO накопичується у тканині, стабільний в біологічному середовищі під час дії кисню та інших окислювачів. Використання парамагнітної пастки NO дозволяє визначити швидкість процесу синтезу NO

для утворення необхідної концентрації пастки у тканині легень.

У групах тварин № 1, 3, 5, 7, яким не вводили ДТК-Fe²⁺, були досліджені додаткові показники (рис. 2, табл. 2). Протеїни з парними тіоловими групами у тканинах органів у реакції з лабільним негемовим двовалентним залізом утворюють залізо-сірчаний комплекс, що здатен акцептувати NO. Утворений таким чином DNIC формує у тканинах депо NO, де ця високореакційна молекула (з «часом життя» всього кілька секунд) може зберігатися до години та більше. Тканинне депо NO пролонгує його дію, забезпечує внутрішньо- та міжклітинний транспорт. DNIC має парамагнітні властивості, при ЕПР-спектроскопії вони дають анізотропичний синглетний сигнал з $g_{\text{сер}} = 2,03$ ($g_{\text{II}} = 2,04$, $g_{\text{I}} = 2,01$), розмах якого прямо залежить від кількості NO у тканинах. Як видно з рис. 2, А, сигнал DNIC

чітко представлений в ЕПР-спектрі печінки піддослідної тварини. Максимального розмаху сигнал DNIC набуває на 6-ту добу після інстиляції азбесту (табл. 2). У спектрі печінки контрольних тварин (рис. 2, Б) цей сигнал відсутній. Коефіцієнт кореляції між сигналом «пастка-NO» в легенях та DNIC у печінці становив $-0,92$ ($P < 0,05$). Динаміка утворення NO в печінці співпадає з відповідною динамікою в легенях.

Існує можливість появи нітрозильних комплексів у печінці, що безпосередньо не пов'язана з активацією синтезу NO в печінці. Припустимо, що у відповідь на попадання азбесту у тканини легень, там активується система NO-синтаз. В організмі існує декілька лабільних акцепторів NO, які здатні транспортувати, зберігати та звільняти NO. Основний акцептор – гемоглобін крові, за рахунок якого NO, що синтезовано в легенях, може

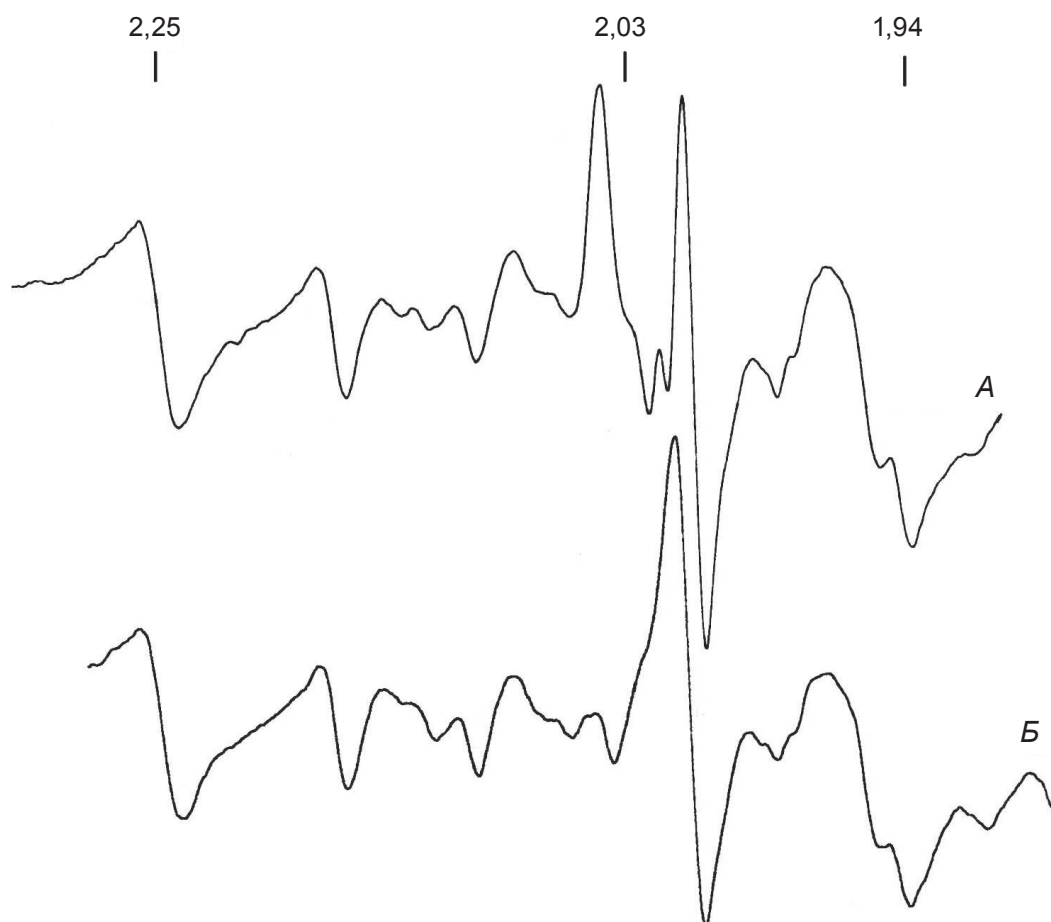


Рис. 2. Типові спектри ЕПР тканини печінки: А – шури піддослідних груп (№ 3–5) з інстиляцією азбесту; Б – контрольні тварини. Синглетний анізотропний сигнал із $g = 2,03$ – динітрозильний комплекс негемового заліза з SH-парними протеїнами (DNIC)

Таблиця 2. ЕПР та біохімічні показники зразків крові, тканини печінки та легень щурів у разі введення азбесту ($M \pm m, n_i = 6$)

Параметри	Контрольні тварини	Піддослідні тварини з азбестом		
		3 дні	6 днів	10 днів
<i>Легені</i>				
Вільні радикали, від. од.	1,00 ± 0,05	1,12 ± 0,07*	1,12 ± 0,06*	1,15 ± 0,10*
ДТК-Fe-NO, мкмоль/(г·год)	0,17 ± 0,08	2,04 ± 0,74*	2,61 ± 0,89*	2,37 ± 0,86*
ПОЛ, нмоль МДА/г	14 ± 4	39 ± 7*	43 ± 12*	50 ± 15*
<i>Печінка</i>				
Нітрозильний комплекс DNIC, мкмоль/г	0	1,83 ± 0,58	2,45 ± 0,87	2,23 ± 0,91
Цитохром P-450, від. од.	1,00 ± 0,12	0,93 ± 0,13	0,70 ± 0,09*	1,06 ± 0,14
Mn ²⁺ -центри, від. од.	1,00 ± 0,14	1,41 ± 0,25*	1,61 ± 0,29*	1,17 ± 0,11
Cu ²⁺ -центри, від. од.	1,00 ± 0,24	1,41 ± 0,22*	1,69 ± 0,33*	1,03 ± 0,11
Мітохондр. ВР, від. од.	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,20	0,79 ± 0,09*	0,92 ± 0,09
Мітохондр. ЗСЦ, від. од.	1,00 ± 0,05	1,06 ± 0,08	0,99 ± 0,06	0,98 ± 0,08
Mo ⁷⁺ -центри, від. од.	1,00 ± 0,29	1,42 ± 0,25*	0,97 ± 0,29	1,20 ± 0,28
<i>Кров</i>				
МетНв, г/л	0,77 ± 0,16	1,0 ± 0,2*	1,1 ± 0,2*	1,1 ± 0,2*
Hb-NO, мкМ	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.
<i>Плазма крові</i>				
Cu ²⁺ церулоплазм., мг/л	0,78 ± 0,15	0,84 ± 0,26	0,83 ± 0,22	0,81 ± 0,19
Вільні радик., ×10 ¹⁰ н.е./л	4,0 ± 1,2	6,2 ± 3,1	4,9 ± 1,7	5,6 ± 2,7
Залізо в трансферині Fe ³⁺ _{тран} , мг/л	0,96 ± 0,24	0,75 ± 0,23*	0,71 ± 0,19*	0,76 ± 0,21*
Лабільне залізо Fe ³⁺ _{нетран} , мг/л	0	0,45 ± 0,23*	0,51 ± 0,40*	0,54 ± 0,30*
Fe ³⁺ _{нетран} / Fe ³⁺ _{тран} , %	0	60	72	71
NO ₂ + NO ₃ , мМ	0,07 ± 0,03	0,24 ± 0,11*	0,28 ± 0,07*	0,26 ± 0,06*

Примітка. * Зміни вірогідні відносно групи контрольних тварин, $P < 0,05$; н.в. – відповідний сигнал був відсутнім у спектрі (не визначався); н.е. – неспарені електрони.

транспортуватися у тканини різних органів, звільнятися там та утворювати нітрозильні комплекси з протеїнами. Також транспорт NO здійснюється за рахунок переносу його окисленого продукту – нітриту, що доставляється кров'ю у тканини різних органів, де нітрити відновлюються до NO. Але і в такій схемі транспортування NO гемоглобін крові відіграє суттєве значення, оскільки за рахунок нітрит-редуктазної активності гемоглобіну будуть також утворюватися відповідні нітрозильні комплекси гемового заліза. Однак у даному експерименті не зафіксована присутність нітрозильних комплексів гемоглобіну у зразках

крові піддослідних тварин у кількостях, що є достатніми для реєстрації. Тому можливістю появи NO у тканинах печінки за рахунок його транспорту з легень можна знехтувати.

Враховуючи, що «час життя» NO в DNIC печінки складає декілька годин, а пастка NO в легенях вводиться на такий проміжок часу, який не перевищує 40 хв, можна стверджувати, що кількість NO в легенях, не перевищує кількість NO, синтезованого в печінці за аналогічний проміжок часу. Таким чином, експериментальні дані свідчать про те, що інтратрахеальне введення азбесту спричиняє активацію NO-синтази не тільки безпосеред-

ньо в легенях, але цей процес поширюється і на інші органи, зокрема печінку.

Сумарна концентрація нітритів та нітратів у сироватці крові в порівнянні з контрольною групою зросла в 3–4 рази (табл. 2). Коефіцієнт кореляції між змінами концентрації ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) у сироватці крові та tDNIC у печінці становив 0,95, комплексу ДТК-Fe-NO в легенях – 1,0. Цей результат свідчить, що джерелом зростання фонду ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) у крові є синтезований NO.

Азбестстимульований нітрозативний стрес призводить до розвитку оксидативного стресу. Зафіксовано активацію ПОЛ у легенях, спонтанний рівень продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою підвищився в 2,5–3 рази (табл. 2). Розмах сигналу ЕПР вільних радикалів з тривалим часом життя збільшився в зразках тканини легень на 12–15% ($P < 0,05$). На 6-ту добу зареєстровано зменшення ЕПР сигналу цитохромів P-450 у печінці на 30%, що свідчить про пригнічення активності детоксуючої системи організму. Як відомо, гіперпродукція NO в гепатоцитах призводить до зниження вмісту цитохромів P-450 за рахунок дисоціації гему від апоензиму [14]. Відбулося підвищення рівня сигналу Cu^{2+} в печінці: на 41% на 3-ю добу, на 69% на 6-ту добу ($P < 0,05$), що вказує на інтенсифікацію системи антирадикального захисту – супероксиддисмутази. Зареєстровано зменшення сигналу мітохондріальних вільних радикалів убіхінону у зразках тканини печінки на 6 добу на 21% ($P < 0,05$), що свідчить про порушення процесів транспортування електронів у мітохондріях.

Зміни в обміні заліза. Окислене залізо (Fe^{3+}), на відміну від відновленого заліза (Fe^{2+}), має парамагнітні властивості, тому його сигнал реєструється у спектрі ЕПР. Сигнал Fe^{3+} у спектрі зразків сироватки крові має характерний анізотропічний синглетний сигнал $g = 4,3$ із триплетною тонкою структурою (рис. 3, *a*). Однак, у даному дослідженні у відповідних зразках піддослідних тварин реєструється зміна форми сигналу $g = 4,3$ (рис. 3, *e*). Для того щоб пояснити цей феномен, розглянемо спрощену схему обміну заліза у крові.

У плазму крові залізо поступає з кишечника у відновленому стані та утворює нестійкі залізо-сірчані комплекси з альбуміном. Церулоплазмін (ЦП) окислює це залізо та сприяє його зв'язуванню у трансферині (ТР): $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{ЦП} \rightarrow \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{ТР}$, де воно надійно екранується від хімічної взаємодії. Важливо, що до ТР можливе включення тільки дво-валентного заліза за безпосередньої участі ЦП.

Відомо, що пул лабільного Fe^{2+} є важливим елементом транспортування NO, який разом із низькомолекулярними тіолвміщуючими сполуками (цистеїн, глутатіон, тіосульфат) утворює залізо-сірчаній комплекс, що здатен акцептувати NO з формуванням лабільного (транспортного) нітрозильного комплексу (tDNIC). Факт утворення та функціонування tDNIC експериментально доведено [10]. «Час життя» tDNIC у біологічному середовищі становить кілька хвилин. Відомо, що в реакції з різними формами кисню tDNIC розпадається, а NO окислюється до нітрит-іону. Однак, у такій ситуації залізо не може залишатися у відновленому стані, воно повинно переходити в окислену форму. Таким чином, за рахунок інтенсифікації метаболізму NO пул лабільного Fe^{2+} у крові має зменшуватися, з переходом до Fe^{3+} . Така форма заліза не взаємодіє з ЦП і не може бути зв'язана у ТР, тому вона вилучається зі стандартної схеми метаболізму заліза в організмі та накопичується у крові з подальшим виведенням із організму.

На рис. 3, *a* наведено сигнал $g = 4,3$, що характеризує Fe^{3+} у трансферині ($\text{Fe}^{3+}_{\text{тран}}$). Поза трансферину Fe^{3+} має синглетний сигнал із тим же g -фактором (рис 3, *b*, *c*). Під час суперпозиції двох сигналів відбувається зміна форми «еталонного» сигналу $\text{Fe}^{3+}_{\text{тран}}$ (рис. 3, *d*). У зразках сироватки крові піддослідних тварин із гіперпродукцією NO якраз і реєструється аналогічна «зсунута» форма сигналу ТР. Щоб експериментально довести можливість утворення пулу лабільного Fe^{3+} , який не включено у ТР, був використаний хелатор заліза – ДТК. Досліди показали: 1) ДТК по відношенню до Fe^{3+} виступає відновником, утворюючи залізо-сірчаній комплекс, в якому $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$; тому при додаванні ДТК сигнал Fe^{3+} зникає; 2) ДТК не взаємодіє із $\text{Fe}^{3+}_{\text{тран}}$, ТР екранує включене залізо від хімічних взаємодій з ним. У разі додавання розчину ДТК до сироватки крові інтактних тварин сигнал із $g = 4,3$ не змінюється.

У випадку зразків із «зсунутою» формою сигналу $g = 4,3$ внаслідок додавання розчину ДТК відбувається «нормалізація» форми сигналу. Ми пропонуємо ввести параметр зсуву сигналу $[(\text{AC}-\text{BC})/\text{BC}]$ від «еталонної» форми (рис. 3, *e*), величина якого залежить від співвідношення між лабільним та трансферинним Fe^{3+} ($\text{Fe}^{3+}_{\text{нетран}}/\text{Fe}^{3+}_{\text{тран}}$).

Під час внутрішньотрахеального введення азбесту рівень лабільного $\text{Fe}^{3+}_{\text{нетран}}$ постійно зростає на протязі всього досліду і на 6-ту та 10-ту добу складає більш ніж 70% від кількості заліза у трансферині. У той же

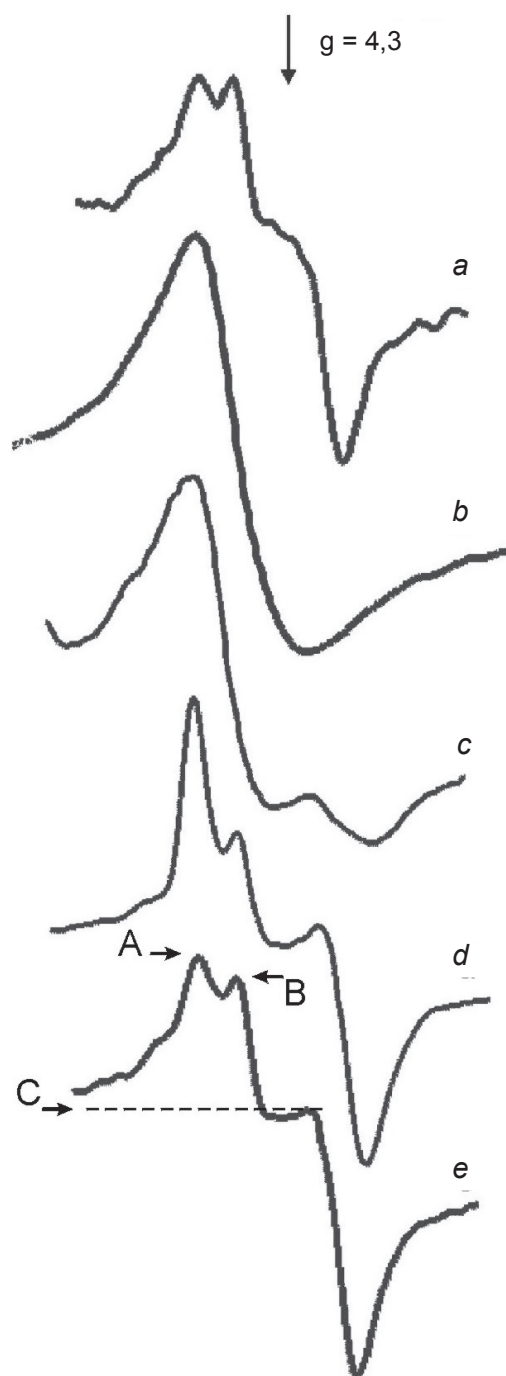


Рис. 3. Сигнали ЕПР $g = 4,3$ окисленого заліза: *a* – зразок сироватки крові контрольних тварин, «еталонний» сигнал – все тривалентне залізо включено до трансферину ($Fe^{3+}_{\text{тран}}$); *b* – водний розчин $FeCl_3$; *c* – розчин $FeCl_3$ з альбуміном при рН 7,4; *d* – розчин $FeCl_3$ з альбуміном при рН 7,4 з додаванням сироватки крові контрольних тварин; *e* – зразок сироватки крові піддослідних тварин з інстиляцією азбесту. Інтенсивність сигналу ЕПР на рівні А, В, С та Е використовується для розрахунку параметру зсуву сигналу від «еталонної» форми

час спостерігається зменшення $Fe^{3+}_{\text{тран}}$ на 35% (табл. 2). Такий перерозподіл форм заліза свідчить про суттєві зміни у метаболізмі цього важливого для біосинтезу протеїнів металу.

Наведені результати експериментально доводять факт утворення пулу лабільного окисленого заліза поза трансферину $Fe^{3+}_{\text{нетран}}$ у разі гіперпродукції NO. Значна концентрація $Fe^{3+}_{\text{нетран}}$ свідчить про можливість його накопичення у крові, оскільки воно вибуває із стандартної схеми обміну заліза. Відомо, що активація обміну NO супроводжується гіперпродукцією високореакційних вільних радикалів та активних форм кисню – оксидативним стресом. Одержані нами дані вказують на те, що один із механізмів ініціалізації останнього реалізується через накопичення $Fe^{3+}_{\text{нетран}}$, що, як відомо, призводить до активації реакції Хабера-Вейса, в результаті якої утворюється високореактивний гідроксильний радикал, здатний окислювати протеїни, руйнувати ліпіди клітинних мембран, структуру ДНК [15].

Таким чином, введені інтратрахеально азбестові волокна спричиняють активацію синтезу NO у тканині легень. Підвищена NO-синтазна активність зберігається принаймні 10 діб на рівні 2 мкмоль/(год·г тканини). Утворення DNIC у печінці на рівні 2 мкмоль/г тканини за відсутності нітрозильного комплексу гемоглобіну у зразках крові свідчить про те, що процес активації синтезу NO відбувається не тільки в місцях локалізації азбестових волокон (легенях), але і в інших органах. Гіперпродукція NO призводить як до зменшення кількості заліза в залізотранспортувальному протеїні крові – трансферині, так і до накопичення у крові окисленого негемового заліза, що не включене до трансферину. Накопичення неекранованого протеїном заліза може бути одним із пускових механізмів оксидативного стресу.

ИЗМЕНЕНИЯ В ОБМЕНЕ ОКСИДА АЗОТА И ЖЕЛЕЗА У КРЫС, ВЫЗВАННЫЕ ВВЕДЕНИЕМ АСБЕСТА

С. Г. Шандренко, Т. О. Кишко,
И. Н. Чумаченко, Н. П. Дмитренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: dmytrenko@biochem.kiev.ua

Целью работы было сравнить интенсивность процессов синтеза NO в тканях легких и печени крыс линии Wistar на модели интра-

трахеального введення асбестових волокон, а також вивчити зміни в обміні заліза. Асбест марки А6-45, просіяний через сито розміром 0,1 мм, вводили в дозу 5 мг/кг в 0,2 мл фізіологічного розчину. Для оцінки інтенсивності синтезу NO використовували метод ЕПР і ловушку NO: комплекс діетилдитіокарбамат – залізо (ДТК-Fe²⁺). Біохімічні та ЕПР-показателі визначали на 3-, 6- і 10-і доби після інстиляції асбеста. Результати дослідження показали, що введені інтратрахеально асбестові волокна викликають активацію синтезу NO в тканинах легких. Покращена NO-синтазна активність зберегалася, по крайній мірі, 10 днів на рівні 2 мкмоль/(час·г ткани). Утворення нітрозильного комплексу негемового заліза (DNIC) в печінці на рівні 2 мкмоль/г ткани при відсутності нітрозильного комплексу гемоглобіна в зразках крові свідчить про те, що процес активації синтезу NO відбувається не тільки в місцях локалізації асбестових волокон (в легких), але і в інших органах.

Гіперпродукція NO призводить як до зменшення кількості заліза в залізотранспортному протеїні крові – трансферині, так і до накопичення в крові окисленого негемового заліза, не включеного в трансферин. Накопичення неекранованого протеїном заліза є одним з пускових механізмів окислювального стресу.

Ключові слова: асбест, оксид азота, нітрозильні комплекси, ЕПР, залізо.

ASBESTOS-STIMULATED CHANGES IN NITRIC OXIDE AND IRON METABOLISM IN RATS

S. G. Shandrenko, T. O. Kishko,
I. N. Chumachenko, N. P. Dmitrenko

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: dmytrenko@biochem.kiev.ua

Summary

Under intratracheal asbestos fibers installation it has been investigated NO synthesis in the lung and liver tissues of Wistar rats by EPR method. Asbestos A6-45, sifted through the sieve with size 0.1 mm, has been administered in a dose of 5 mg/kg. To evaluate the NO synthesis EPR and NO-trap methods have been used. The amplitude of EPR signal “trap-NO” in the lung samples was 12, 16 and 14 times greater than in controls on the 3th, 6th and 10th days after as-

bestos installation and was corresponding to NO rate of about 2 mkmol/(g·h). In the liver samples of asbestos-stimulated animals the NO level contained in the non-heme iron nitrosyl complexes was about 2 mkmol/g. Thus, the asbestos fibers stimulate NO synthesis not only in the lung tissue, but also in other organs. The obtained data shows that under NO hyperproduction certain changes in iron metabolism take place, such as: the decrease of transferrin iron and the accumulation of ferric iron not bound with transferrin. The accumulation of ferric iron not shielded by proteins is one of the oxidative stress triggers.

Key words: asbestos, nitrogen oxide, nitrosyl complex, EPR, iron, transferrin.

1. Dorger M., A. Allmeling, Kiefmann R. et al. // Free Radi. Biol. Med. – 2002. – 33, N 4. – P. 491–501.
2. Quinlan T. R., Berube K. A., Hacker M. P. et al. // Ibid. – 1998. – 24, N 5. – P. 778–788.
3. Sun-Hee Park, Ann E. Aust // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – 360, N 1. – P. 47–52.
4. Hiraku Y., Kawanishi S., Ichinose T., Murata M. // Ann. NY Acad. Sci. – 2010. – 1203. – P. 15–22.
5. Lehtonen H., Oksa P., Lehtimäki L. et al. // Thorax. – 2007. – 62, N 7. – P. 602–607.
6. Sandrini A., Johnson A. R., Tomas P. S., Yates D. H. // Respirology. – 2006. – 11, N 3. – P. 325–329.
7. Baur X., Wilken D. // Pneumologie. – 2010. – 64, N 2. – P. 81–110.
8. Kim S., Ponka P. // Biometals. – 2003. – 16, N 1. – P. 125–135.
9. Cooper C. E. // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – 1411, N 2–3. – P. 290–309.
10. Mulsch A., Mordvintsev P. I., Vanin A. F., Busse R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. – 196, N 3. – P. 1303–1308.
11. Cooper C. E., Porter J. B. // Biochem. Soc. Trans. – 1997. – 25, N 1. – P. 75–80.
12. Ghio A. J., Stonehuerner J., Richards J., Devlin R. B. // Antioxid. Redox Signal. – 2008. – 10, N 2. – P. 371–377.
13. Кишко Т. О., Шандренко С. Г., Дмитренко Н. П. // Журн. АМН України. – 2008. – 14, № 1. – С. 150–158.
14. Kim Y.-M., Bergonia H. A., Muller C. et al. // J. Biol. Chem. – 1995. – 270, N 11. – P. 5710–5713.
15. Gutteridge J. M. // Ann. NY Acad. Sci. – 1994. – 738. – P. 201–213.

Отримано 09.02.2011