

ВМІСТ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ В ПЕЧІНЦІ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

Б. О. Цудзевич, І. В. Калінін, В. В. Полякова, Ю. О. Омельченко, Н. А. Петрук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

У роботі наведено дані експериментальних досліджень вмісту метаболітів оксиду азоту печінки та сироватки крові інтоксикованих важкими металами (Cu, Zn, Cd, Pb) щурів. Встановлено, що отруєння тварин призводить до змін активності cNOS та iNOS, а також вмісту нітритів і нітратів.

Ключові слова: ЩУРИ, ПЕЧІНКА, СИРОВАТКА КРОВІ, ІНТОКСИКАЦІЯ, МІДІ СУЛЬФАТ, ЦИНКУ СУЛЬФАТ, КАДМІЮ СУЛЬФАТ, СВИНЕЦЬ АЗОТНОКИСЛИЙ, NO-СИНТАЗИ, НІТРИТИ, НІТРАТИ

Посилення антропогенного тиску на природу призвело до погіршення екологічного стану довкілля та негативного впливу різноманітних ксенобіотиків, до яких належать і важкі метали, на організм людини і тварин. Сполуки важких металів токсичні, негативно впливають на живі організми навіть в дуже низьких концентраціях, можуть кумулюватися різними представниками біоти, стійкі, і відносяться до глобальних забруднювачів біосфери. Важкі метали спричиняють порушення біохімічних процесів, що підтримують гомеостаз організму, здатні швидко мігрувати та ефективно зв'язуватись з функціональними групами білків і нуклеїнових кислот, що веде до порушення каталітичної активності ферментів [1, 2].

Для оксиду азоту (NO) та його метаболітів [3–7] характерна широка біологічна активність: регулювання тонусу судин, передача сигналів нейронами, медіатори внутрішньоклітинної та міжклітинної взаємодії, імунні реакції, репродуктивна функція, антиоксидантні властивості. Метали також приймають участь в реакціях з оксидом азоту і його похідними, можуть утворювати комплекси, сприяючи взаємоперетворенню редокс-форм, нітрозилувати SH-групи металотіонеїнів і білків, що приймають участь в метаболізмі міді. Іноді оксид азоту може підвищувати чутливість клітин до важких металів та інших ксенобіотиків [8–9].

Печінка є центральним органом у детоксикації важких металів та інших ксенобіотиків і саме тому є одним з основних органів, що піддаються впливу оксиду азоту при різних патологіях [10–12].

Метою нашої роботи було вивчення впливу важких металів (Cu, Zn, Cd, Pb) на метаболіти циклу оксиду азоту (NO-синтаз, нітратів, нітритів) у печінці та сироватці крові щурів за умов інтоксикації.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях одного віку, масою 180–200 г, яких утримували у звичайних умовах віварію, всього використано 40 тварин. Було утворено п'ять груп тварин: перша — інтактні (контроль), друга — тваринам перорально вводили розчин міді сульфату в дозі 3 мг/кг, що становить 1/10 від ЛД₅₀, третя — щурам перорально вводили розчин цинку сульфату в дозі 2 мг/кг, що становить 1/20 від ЛД₅₀, четверта — тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1,5 мг/кг, що становить 1/30 від ЛД₅₀, п'ята — тваринам перорально вводили розчин свинцю

азотнокислого в дозі 1,7 мг/кг, що становить 1/50 від ЛД₅₀. Інтوكсикацію проводили впродовж 14 діб, потім щурів декапітували під ефірним наркозом і відбирали кров і тканини печінки для подальших досліджень. Робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту тварин, яких використовують у наукових цілях.

Визначення активності NO-синтаз проводили згідно з методом Hevel J. M., 1991 [13]. Вміст нітритів та нітратів визначали за методом Гріса з модифікаціями [14–16]. Результати досліджень піддавали статистичному аналізу. Достовірність результатів визначали, використовуючи критерій Стюдента. Статистичні розрахунки проводили з використанням програми «Microsoft Excel 2007».

Результати й обговорення

Результати проведених досліджень (табл. 1) вказують, що активність конститутивної (cNOS) NO-синтази збільшувалась: у 2 і 3 групах — в 1,5 раза, у 4 групі — в 4 рази і в 5 групі — в 3 рази відносно до інтактних тварин. Активність індукцибельної (iNOS) NO-синтази в інтоксикованих щурів зменшувалась: у 1,5 раза — в 2 і 3 групах та в 4 рази — у 4 і 5 групах, порівняно з інтактними тваринами.

Таблиця 1.

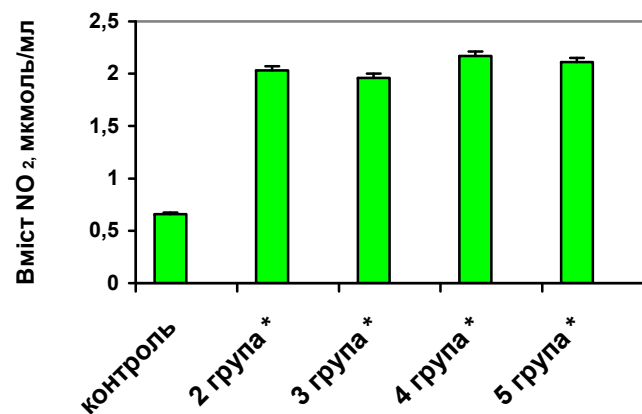
Активність NO-синтаз в тканинах печінки щурів, мкмоль/хв·мг білка (M±m, n=8)

Показники	Інтактні щури	Групи тварин			
		Інтоксиковані щури			
		CuSO ₄	ZnSO ₄	CdSO ₄	Pb(NO ₃) ₂
	1	2	3	4	5
cNOS	0,63±0,02	0,96±0,09*	1,03±0,17*	1,89±0,24*	2,51±0,32*
iNOS	6,29±0,53	3,98±0,24*	3,60±0,19*	1,54±0,21*	1,57±0,23*

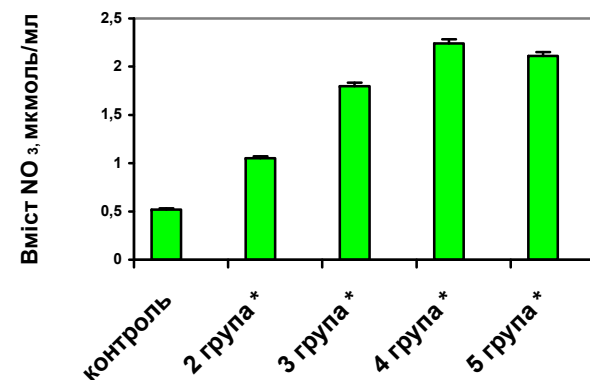
Примітка: * — дані вірогідні (p < 0,05) відносно до інтактних щурів

Зменшення активності iNOS, на наш погляд, може бути свідченням інгібуючої дії іонів важких металів та проявом цитотоксичної дії на структуру органа. Отримані дані узгоджуються із раніше показаними результатами щодо вмісту аргініну в тканинах печінки отруєних щурів, у гепатоцитах частина аргініну, ймовірно, використовується в якості субстрату iNOS.

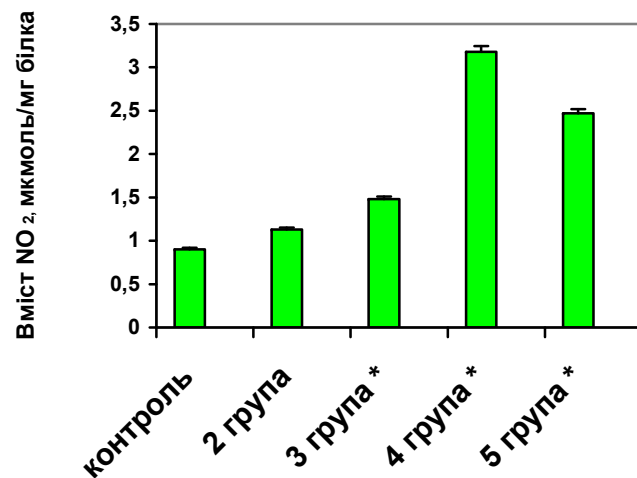
У крові та печінці інтоксикованих щурів встановлено зростання вмісту нітрит-іонів (NO₂⁻) та нітрат-іонів (NO₃⁻) у всіх дослідних групах (рис. 1).



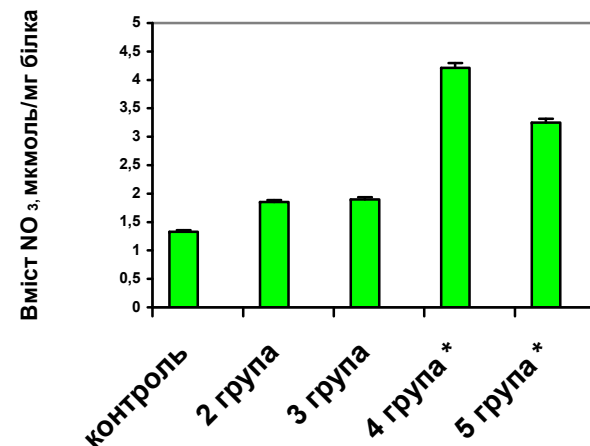
A



Б



В



Г

Рис. 1. Вміст нітрит-іонів у крові (А) і печінці (В) та нітрат-іонів у крові (Б) і печінці (Г) щурів ($M \pm m$, $n=8$)

Примітка: * — дані вірогідні ($p < 0,05$) відносно до контролю

Так, у крові інтоксикованих щурів всіх дослідних груп вміст нітритів зріс у три рази, відносно контролю. У печінці інтоксикованих тварин вміст нітритів збільшився: на 25 % — у другій групі, на 60 % — у третій, в 3,5 раза — в четвертій та у 2,7 раза — у п'ятій групі відносно до контрольної групи. Вміст нітратів у крові дослідних щурів збільшився: у 2 рази — в другій групі, у 3,5 — в третій, у 4 рази — в четвертій та п'ятій групах у порівнянні з контрольною групою тварин. У печінці дослідних тварин вміст нітратів збільшився: на 40 % — у другій і третій групах, у 3 рази — в четвертій групі та в 2,4 раза — у п'ятій групі відносно до контролю. На нашу думку, таке підвищення нітритів і нітратів можна пояснити стресовим чинником — інтоксикацією важкими металами. Підвищення продукування NO_2^- і NO_3^- , в свою чергу, може стимулювати синтез сечовини, що також узгоджується з результатами наших попередніх досліджень (у всіх дослідних групах відмічено зростання рівня сечовини у щурів).

Висновки

Отже, інтоксикація важкими металами призводить до підвищення активності cNOS та зменшення активності iNOS. Підвищення утворення нітритів і нітратів при інтоксикації можна розглядати як адаптивну відповідь на гостре запалення, оскільки оксид азоту сприяє підвищенню тканинної перфузії, нейтралізує реактивні радикальні форми кисню. Таким чином, оксид азоту (NO) чинить різнонаправлені модулюючі ефекти на метаболічні функції печінки.

Перспективи подальших досліджень. На основі патогенезу інтоксикації важкими металами будуть розроблені заходи елімінації та профілактики.

B. A. Tsudzevich, I. V. Kalinin, V. V. Poliakova, J. A. Omelchenko, N.A. Petruk

CONTENT OF METABOLITES OF NITRIC OXIDE IN LIVER AND BLOOD OF RATS INTOXICATED BY HEAVY METALS

S u m m a r y

In this article the data of experimental investigations of metabolites of nitric oxide content of liver and blood intoxicated with heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) rats. It was established that the poisoning of animals leads to changes in cNOS activity and iNOS, and content of nitrites and nitrates.

Б. А. Цудзевич, И. В. Калинин, В. В. Полякова, Ю. А. Омельченко, Н. А. Петрук

СОДЕРЖАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В ПЕЧЕНИ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ УСЛОВИИ ИНТОКСИКАЦИИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

А н н о т а ц и я

В работе приведены данные экспериментальных исследований содержания метаболитов оксида азота в печени и сыворотке крови при интоксикации тяжелыми металлами (Cu, Zn, Cd, Pb) крыс. Установлено, что отравление животных приводит к изменениям активности cNOS и iNOS, а также содержания нитритов и нитратов.

1. Профілактична токсикологія та медична екологія / за ред. І. М. Трахтенберга. — К. : Авіценна, 2010. — 248 с.
2. *Трахтенберг И. М.* Влияние тяжелых металлов на старение / И. М. Трахтенберг, Н. А. Утко, Т. К. Короленко и др. // Токсикологический вестник. — 2003. — № 3. — С. 9–14.
3. *Moncada S.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada, R. Palmer, E. Higgs // *Pharmac. Rev.* — 1991. — V. 43, № 2. — P. 109–142.
4. *Davis K. L.* Novel effects of nitric oxide / K. L. Davis, E. Martin, I. V. Turko, F. Murad // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2001. — V. 41. — P. 203.
5. *Feelisch M.* Nitroxyl gets to the heart of the matter / M. Feelisch // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — V. 100. — P. 4978–4980.
6. *Ford P. C.* Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes / P. C. Ford, I. M. Lorkovic // *Chem. Rev.* — 2002. — V. 102. — P. 993–1017.
7. *Гоженко А. И.* Влияние острой нитритной интоксикации на гемостаз / А. И. Гоженко, С. Г. Котюжинская, А. Л. Котюжинский // *Мед. хімія.* — 2000. — Т. 2. № 4. — С. 51–53.
8. *Меньшикова Е. Б.* Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков, В. П. Реутов // *Биохимия.* — 2000. — Т. 65. № 4. — С. 485–503.
9. *Журавлева И. А.* Роль окиси азота в кардиологии и гастроэнтерологии / И. А. Журавлева, И. А. Мелентьев, И. А. Виноградов // *Клин. мед.* — 1997. — Т. 75. № 4. — С. 18–21.
10. *Тэйлор Б. С.* Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции / Б. С. Тэйлор, Л. Ч. Аларсон, Т. Р. Биллиар // *Биохимия.* — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 905–923.
11. *Киричук В. Ф.* Оксид азота и микроциркуляторное звено системы гемостаза (обзор литературы) / В. Ф. Киричук, Е. А. Андронов, А. Н. Иванов, Н. В. Мамонтова // *Успехи физиол. наук.* — 2008. — Т. 39, № 4. — С. 83–91.
12. *Lu Ping.* Gender differences in hepatic ischemic reperfusion injury in rats are associated with endothelial cell nitric oxide synthase-derived nitric oxide / Lu Ping, Liu Fang, Wang Chun-You et al. // *World J. Gastroenterol.* — 2005. — Vol. 11, № 22. — P. 3441–3445.
13. *Hevel S. M.* Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein / S. M. Hevel, K. A. White, M. A. Marletta // *J. Biol. Chem.* — 1991. — 266. — P. 22789–22791.
14. *Salter M.* Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca^{2+} -depend and Ca^{2+} -independent nitric oxide synthases / M. Salter, R.G. Knowles, S. Moncada // *FEBS Lett.* — 1991. — Vol. 291, № 1. — P. 145–149.
15. *Chin S. Y.* Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent 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. — Vol. 227, № 5. — P. 797–804.
16. *Boyde J. R.* Optimization of conditions for the calorimetric determination of citrulline, using diacetylmonoxime / J. R. Boyde, M. Rahmatullah // *Anal. Biochem.* — 1980. — 107. — P. 424–431.

Рецензент: старший науковий співробітник лабораторії інтелектуальної власності та маркетингу інновацій, кандидат сільськогосподарських наук Пилипець А. З.