

Р.І. Кратенко

Харківський державний  
медичний університет

## Вплив іонізуючого випромінювання та 12-краун-4 на L-аргінінзалежний синтез оксиду азоту і NO-синтазну активність

### Influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on L-arginine-dependent synthesis of nitrogen oxide and NO-synthase activity

**Цель работы:** Изучение L-аргининового синтеза оксида азота и NO-синтазной активности в организме теплокровных животных под влиянием 12-краун-4 и ионизирующего излучения (ИИ) в условиях подострого эксперимента.

**Материалы и методы:** Концентрацию метгемоглобина определяли при помощи спектрофотометра. Определение содержания аргинина и цитруллина проводили методом ионообменной хроматографии. Оценка содержания оксида азота осуществлялась по цветной реакции с реактивом Грисса. Состояние и активность аденилат- и гуанилатциклазной системы определяли радиолигандным методом в препаратах мембран гепатоцитов белых крыс по уровню аденилатциклазы, гуанилатциклазы, циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), фосфодиэстеразы (ФДЕ) и интенсивности поглощения  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  мембранными фракциями. Состояние микросомального окисления оценивали по дыхательной и ферментативной активности, содержанию цитохромов b5, P-450.

**Результаты:** Уровень содержания метгемоглобина в крови под влиянием 12-краун-4 и ИИ был повышен по сравнению с контрольными величинами. Действие обоих факторов приводило к статистически достоверному увеличению содержания L-цитруллина и уменьшению L-аргинина в плазме крови. Это, вполне вероятно, связано с активацией процесса окисления субстрата и превращением его в L-цитруллин. Исследования содержания нитритов и оксида азота (IV) установили увеличение их уровня по сравнению с контролем. Действие 12-краун-4 и ИИ снижало активность аденилатциклазы и содержание цАМФ, увеличивало активность гуанилатциклазы (ГЦ) и фосфодиэстеразы (ФДЭ). Вместе с тем, влияние факторов приводило к накоплению цГМФ и ионов  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в гепатоцитах, что может указывать на стимуляцию оксидом азота (II) гуанилатциклазного медиаторного механизма. Оба фактора активировали O-деметилазу, цитохром P-450, НАДФН и НАДН-цитохром-С-редуктазную активность, эндогенное дыхание микросом и перекисное окисление липидов, не влияя на активность цитохрома b5.

**Выводы:** Влияние ИИ и 12-краун-4 может быть расценено как модуляторное в отношении продукции оксида азота и NO-синтазной активности, которое имеет связь с функциональной активностью монооксигеназной системы. Практически одинаковый характер изменений под влиянием ионизирующей радиации и 12-краун-4 указывает на наличие радиомиметических свойств последнего.

**Ключевые слова:** краун-эфиры, ионизирующее излучение, метгемоглобин, L-цитруллин, L-аргинин, аденилатциклаза, гуанилатциклаза, циклические нуклеотиды, фосфодиэстераза, монооксигеназная система.

**Objective:** To investigate L-argininic synthesis of nitrogen oxide and NO-synthase activity of warm-blooded animal organism under the influence of 12-crown-4 and ionizing radiation at the conditions of subacute toxicologic experiment.

**Material and Methods:** Meth-hemoglobin concentration was determined by the aid of spectrophotometer. Arginine and citrulline contents determination was performed by ion-exchange chromatography. Nitrogen oxide content evaluation was carried out by the coloured reaction with Gryss reagent. Adenylate and guanylate cyclase systems state and activity were determined by radioligand method taking into account the levels of adenylate cyclase, guanylate cyclase, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), phosphodiesterase, and intensity of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  absorption by membrane fractions. Microsomal oxidation state was evaluated by respiratory and enzymic activities, cytochrome b5 and P-450 contents.

**Results:** Under the influence of 12-crown-4 and ionizing radiation, blood meth-hemoglobin level was increased compared with the control magnitudes. The action of both factors resulted in the statistically reliable elevation of citrulline, and diminution of arginine blood plasma contents. This might be connected with the activation of substrate oxidation process and conversion of the substrate to L-citrulline. The investigation of nitrite and nitrogen oxide (IV) contents established their level agmentation in comparison with the controls. The action of 12-crown-4 and ionizing radiation decreased adenylate cyclase activity and cAMP contents increasing guanylate cyclase and phosphodiesterase activities. Simultaneously, both factors influence led to the cGMP and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  accumulation in hepatocytes which may point out at the stimulation of guanylate cyclase mediatory mechanism by nitrogen oxide (II). Both factors activated O-demethylase, cytochrome P<sub>450</sub>, NADPH and NADH-cytochrome c-reductase activity, microsomal endogenic respiration and lipid peroxidation not influencing cytochrome b<sub>5</sub> activity.

**Conclusions:** The influence of ionizing radiation and 12-crown-4 may be considered as modulatory at the respect of nitrogen oxide production and NO-synthase activity which is connected with the functional activity of monooxygenase system. Similar character of the alterations caused by ionized radiation and 12-crown-4 suggests the presence of radiomimetic properties of the latter.

**Key words:** crown-ethers, ionizing radiation, meth-hemoglobin, L-arginine, L-citrulline, adenylate cyclase, guanylate cyclase, cyclic nucleotides, phosphodiesterase, micrisomal monooxygenase system.

Останнім часом у науковій літературі з'являється чимало праць, які свідчать про важливу роль оксиду азоту (NO) як поліфункціонального регулятора структурно-метаболических процесів [1–5]. Відомо, що в організмі NO синтезується клітинами з амінокислоти L-ар-

гініну. Цей процес становить комплексну окисно-відновну реакцію, яка відбувається внаслідок дії ферменту NO-синтази (NOS), що приєднує молекулярний кисень до кінцевого атома азоту в гуанідиновій групі L-аргініну [6–8].

Ідентифіковані три ізоформи NOS, які ката-лізують утворення NO [9, 10]. Механізм дії цих ізоформ ферментів схожий. Іони кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) під впливом нейромедіаторних стимулів надходять до клітини, де зв'язуються у цитозолі з кальмодуліном, утворюючи єдиний комплекс «Ca — кальмодулін». Останній активує NOS, дія якої приводить до появи оксиду азоту. Оксид азоту (NO), у свою чергу, активує клітинний фермент гуанілатциклазу (ГЦ), внаслідок цього утворюється циклічний гуанозинмонофосфат (цГМФ), який є медіатором усіх ефектів цього месенджера.

У наших попередніх повідомленнях проілюстровано синергічний вплив 12-краун-4 та іонізуючого випромінювання (ІВ) на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), активність антиоксидантної системи, фосfolіпідний склад мембран [11, 12].

Метою даної роботи стало вивчення L-аргінінового синтезу оксиду азоту та NO-синтазної активності в організмі теплокровних тварин під впливом 12-краун-4 та ІВ за умов підгострого експерименту.

## Методика дослідження

Білих щурів (масою 180–210 г), використаних в експерименті, утримували в стандартних умовах виварію. Першій дослідній групі тварин протягом 15 днів щодня за допомогою зонду вводили водну емульсію 12-краун-4 у 1/1000 ДЛ<sub>50</sub> (1,79 мг/кг). Друга дослідна група щурів щодня цілодобово (протягом того ж терміну) одержувала хронічне загальне опромінювання, генероване за допомогою приладу «Експеримент» (Росія, джерело гамма-випромінювання —  $^{60}\text{Co}$ ). Сумарна поглинута доза дорівнювала 1,8–1,9 Гр.

Дозиметричний контроль проводили клінічним дозиметром типу VA-J-18-N-830 з дозиметричною камерою VA-K-253 (Veb RFT Messelektronik «Otto Schon»). Довірчі похибки визначали безпосередньо в кожній клітці, де під час опромінювання утримували щурів. Потужність дози вимірювали у центрі парафінового фантома, який імітував щура і був розміщений у 10 різних точках клітки.

Потужність поглинутої дози в прямому пучку складала  $5,5 \pm 0,3$  мГр/год; у зоні опромінення, прилеглій до прямого пучка —  $0,050 \pm 0,003$  мГр/год.

У день завершення експерименту тварин декапітували гільйотинним ножом із попередньою анестезією натрію тіопенталом (50 мг/кг в/п) [13] і проводили біохемічні та гістохімічні дослідження внутрішніх органів.

Для оцінки накопичення оксиду азоту та активності NOS ми визначали динаміку вмісту метгемоглобіну в крові, цитруліну та аргініну у плазмі крові, нітритів у сироватці крові, активність аденілат- і гуанілатциклазного каскаду, НАДФН-діафоридази в печінці, а також моноксигеназної функції печінки.

Концентрацію метгемоглобіну визначали за Горном на спектрофотометрі СФ-46 [14]. Вміст амінокислот аргініну та цитруліну проводили методом іонообмінної хро-

матографії на автоматичному аналізаторі амінокислот ААА-339 (Чехія). Оскільки нестабільна молекула оксиду азоту легко трансформується в окис азоту  $\text{NO}_2$ , то оцінка вмісту оксиду азоту здійснювалась за кольоровою реакцією з реактивом Грісса, яка приводить до утворення діазозабарвлення. За величиною оптичної густини (визначеною на спектрофотометрі СФ-46) робили висновки про вміст  $\text{NO}_2$  і, відповідно, NO у сироватці крові. Стан і активність аденілат- та гуанілатциклазної системи визначали радіолігандним методом у препаратах мембран гепатоцитів білих щурів за рівнем аденілатциклази, гуанілатциклази, циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ), фосфодіестерази (ФДЕ) та інтенсивності поглинання  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  мембранними фракціями згідно з рекомендаціями Романенко [15]. Активність аденілатциклази (КФ 4.6.1.1) визначали за методикою, описаною Юдаєвим [16] з незначними модифікаціями, гуанілатциклази (КФ 4.6.1.2) — за методикою Чиркова [17]. Визначали базальний рівень активності ферментів. Активність фосфодіестерази (КФ 3.1.14.17) оцінювали за методом Kuo et al. [18].

Оцінку вмісту цАМФ та цГМФ у грубій мембранній фракції гепатоцитів щурів проводили з використанням стандартних наборів для визначення циклічних нуклеотидів фірми «Амершам» (Англія).

Щоб приготувати грубу мембранну фракцію, 200 мг тканини гомогенізували у 8 мл 50 мМ трис-НСІ буфера, рН 7,5 (5 мМ теофілін, 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ ) на холоді у скляному гомогенізаторі (80 up/down). Гомогенат центрифугували при 1500 г (0–4°C) протягом 5 хв. Супернатант центрифугували при 18000 г (0–4°C) протягом 30 хв. Кінцевий осад регомогенізували в 1,5 мл того ж буфера.

Загальновідомо, що NOS як поліфункціональна оксидоредуктаза за своїми властивостями та функціями близька до цитохрому P-450 та цитохрому P-450-редуктази [19]. Це дозволило нам вивчити стан монооксигеназної системи мікросом ендоплазматичного ретикулу гепатоцитів та екстраполювати дані результати на NO-синтазну активність. Стан мікросомального окиснення оцінювали за дихальною та ферментативною активністю, вмістом цитохромів b5, P-450, який визначали за методом T. Omura, R. Sato [20] на спектрофотометрі Specord UV Vis.

Статистично опрацьовували отримані результати за методом Стьюдента [21].

## Результати та їх обговорення

Було оцінено вплив ІВ та 12-краун-4 на організм білих щурів у підгострому експерименті та виявлено значні порушення утворення NO та NO-синтазної активності. Так, рівень вмісту метгемоглобіну в крові тварин обох експериментальних груп був підвищеним порівняно з контрольними величинами (табл. 1).

Аналіз вмісту L-цитруліну та L-аргініну у плазмі крові виявив негативний вплив дослідних чинників на концентрацію цих амінокислот. Дія 12-краун-4 та ІВ призводила до статистично вірогідного підвищення вмісту L-цитруліну та зниження рівня L-аргініну. Це, ймовірно, пов'язано з активацією процесу окиснення субстрату та перетворенням його у L-цитрулін (табл. 1). Отримана картина мета-

болізму у тварин експериментальних груп дозволяє констатувати підвищення активності NOS та вмісту оксиду азоту.

Наші дослідження вмісту нітритів та оксиду азоту (IV) показали збільшення їх рівня порівняно з контролем. Ці результати переконливо свідчать про підвищення синтезу їх попередника та NO-синтазної активності (табл. 1).

Експерименти з дослідження препаратів печінки щурів показали, що дія 12-краун-4 та ІВ знижувала активність аденілатциклази та вміст цАМФ, підвищувала активність ГЦ та ФДЕ. Водночас вплив цих чинників призводив до накопичення цГМФ та іонів  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  у гепатоцитах, що може вказувати на стимуляцію оксидом азоту гуанілатциклазного медіаторного механізму (табл. 2).

Широка різноманітність внутріклітинних ефектів NO базується на змінах редокс-форми молекул NO, а також додаткових реакціях із металами, тіолами та залишком тирозину у складі білків. Збільшення кількості активних форм кисню (АФК) у клітині може трансформувати ефекти NO із захисних у цитотоксичні. Останні можуть виникнути не тільки при індукуванні NOS ендотоксинами, але й при виснаженні у клітині резерву тіолів та підвищенні концентрації АФК, що призводить до зменшення швидкості нітролізування білків.

У зв'язку з цим ми вивчили стан монооксигеназної системи (МОС) мікросом гепатоцитів як основного генератора активних форм кисню.

Результати експериментів показали, що 12-краун-4 та йонізувальна радіація активували О-деметилазу, цитохром Р-450, НАДФН і НАДН-цитохром-С-редуктазну активність, ендогенне дихання мікросом та ПОЛ. Дослідні чинники не впливали на активність цитохрому b5 (табл. 3).

У результаті проведених експериментів з вивчення функціонального стану монооксигеназної системи було встановлено, що дія 12-краун-4 та ІВ стимулює утворення активних форм кисню, які здатні трансформувати ефекти впливу оксиду азоту в бік розвитку дистрофічних та деструктивних процесів у біологічних мембранах структурно-функціональних одиниць клітини.

Гістохімічні дослідження НАДФН-діафоридази або НАДФ-редуктази у печінці підтвердили високу активність NOS та дозволили зробити висновки про гіперпродукування оксиду азоту під впливом досліджуваних чинників.

Поеднуючи результати даних експериментів з нашими попередніми дослідженнями [11, 12], можна сказати що 12-краун-4 та ІВ, модулюючи утворення оксиду азоту та активних форм кисню, здатні ініціювати вільнорадикальні про-

Таблиця 1  
Вплив ІВ та 12-краун-4 на вміст метгемоглобіну у крові, %, концентрацію L-цитруліну і L-аргініну в плазмі та вміст нітритів і  $\text{NO}_2$  у сироватці крові  
The influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on blood methemoglobin content, blood plasma L — citrulline and L — arginine percentage and blood serum  $\text{NO}_2$  and nitrite concentration

Чинник	Вміст метгемоглобіну	Вміст L-цитруліну, мкМ	Вміст L-аргініну, мкМ	Вміст нітритів і $\text{NO}_2$ , мкМ
Контроль	1,25 ± 0,23	15,8 ± 0,8	26,3 ± 0,8	10,95 ± 0,74
12-краун-4	16,4 ± 1,3*	24,2 ± 1,2*	18,8 ± 0,6*	41,8 ± 2,2*
Іонізувальне випромінювання	15,2 ± 1,2*	23,5 ± 0,7*	17,4 ± 0,6*	36,5 ± 1,7*

Примітка. Тут і далі: \* — розбіжності вірогідні порівняно з контролем,  $p < 0,05$ , кількість тварин у кожній групі — 7.

Таблиця 2  
Вплив ІВ та 12-краун-4 на стан циклазного медіаторного каскаду гепатоцитів  
The influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on the state of hepatocyte mediator cascade

Чинник	M ± m, показники					
	цАМФ, нмоль/г	цГМФ, нмоль/г	АЦ, нмоль цАМФ · мг білка 1 хв	ГЦ, нмоль цГМФ · мг білка 1 хв	ФДЕ, фмоль/мг білка 1 хв	Поглинання $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , імпл/хв · мг білка
Контроль	170,2 ± 8,3	120,5 ± 6,2	1,9 ± 0,04	1,4 ± 0,04	1,3 ± 0,2	3206,5 ± 80,3
12-краун-4	96,6 ± 7,3*	168,4 ± 10,1*	0,3 ± 0,02*	2,6 ± 0,1*	2,7 ± 0,3*	5186,2 ± 70,4*
Іонізувальне випромінювання	102,3 ± 9,6*	180,6 ± 12,9*	0,2 ± 0,01*	2,5 ± 0,22*	2,8 ± 0,3	5627,4 ± 92,2*

Вплив ІВ та 12-краун-4 на стан монооксигеназної системи печінки білих щурів  
*The influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on the state of monoxygenase system white rat liver*

Показник	Чинник		
	контроль	12-краун-4	іонізувальне випромінювання
О-деметилаза (нмоль р-нітрофенолу/хв мг білка)	6,69 ± 0,64	15,20 ± 1,90*	13,56 ± 1,82*
НАДФН цитохром-С-редуктаза (нмоль цитохрому с/хв мг білка)	200,0 ± 24,3	270,7 ± 33,0	280,4 ± 24,0*
НАДН цитохром-С-редуктаза (нмоль цитохрому с/хв мг білка)	955,1 ± 92,2	1354,5 ± 102,1*	1365,0 ± 103,2*
Швидкість ендogenousного дихання, нмоль O <sub>2</sub> /хв	1,40 ± 0,35	3,05 ± 1,11	2,73 ± 0,40*
Швидкість окиснення НАДФН, нмоль O <sub>2</sub> /хв	3,32 ± 0,40	5,02 ± 1,22	7,16 ± 1,12*
Швидкість окиснення НАДФН у присутності ЕДТА, нмоль O <sub>2</sub> /хв	2,91 ± 0,52	4,95 ± 0,37*	5,42 ± 0,66*
Швидкість ПОЛ, нмоль O <sub>2</sub> /хв	0,42 ± 0,11	1,10 ± 0,06*	1,87 ± 0,35*
Цитохром Р-450, нмоль/мг білка	0,952 ± 0,21	1,45 ± 0,21*	1,47 ± 1,11*
Цитохром b5, нмоль/мг білка	0,620 ± 0,10	0,55 ± 0,11	0,58 ± 0,12

цеси, перекисне окиснення ліпідів та призводити до інгібування антиоксидантної системи.

Порівнюючи результати експериментів щодо впливу ІВ та 12-краун-4 на аргінінзалежний синтез оксиду азоту та NO-синтазу активність організму білих щурів, можна дійти висновку, що тенденція змін показників була головним чином однотипною, і це ще раз свідчить про радіоміметичні властивості класичного представника краун-ефірів.

## ВИСНОВКИ

1. За умов підгострого експерименту дія ІВ та 12-краун-4 приводить до підвищення у крові вмісту метгемоглобіну, порушення співвідношень у пулі вільних плазматичних амінокислот L-цитруліну та L-аргініну, активування гуанілат- та інгібування аденілатциклазного внутріклітинного медіаторного каскаду, підсилення генерування активних форм кисню у монооксигеназній системі печінки.

2. Вплив ІВ та 12-краун-4 можна розцінити як модуляторний відносно продукування оксиду азоту та NO-синтазної активності, що має зв'язок з активністю функції монооксигеназної системи.

3. Практично однаковий характер змін аргінінзалежного синтезу оксиду азоту та NO-синтазної активності під впливом ІВ і 12-краун-4 вказує на наявність радіоміметичних властивостей у останнього.

## Література

1. Moncada S., Paimier R.M.J., Higgs E.A. // *Pharmacol. Rev.* — 1991. — Vol. 43. — P. 109–142.
2. Snyder S.H. // *Nature.* — 1993. — Vol. 364. — P. 577.
3. Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H. // *Ann. Intern. Med.* — 1994. — Vol. 120. — P. 227–237.
4. Nakaki T. // *Keio J. Med.* — 1994. — Vol. 43. — P. 15–26.
5. Невзорова В.А., Зуга М.В., Гельцер Б.И. // *Тер. архив.* — 1997. — Т. 69, № 3. — С. 68–73.
6. Wang Y., Marsden P.A. // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* — 1995. — Vol. 4. — P. 12–22.
7. Hibbs J.D., Westenfelder C., Taintor R. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1992. — Vol. 89. — P. 867–877.
8. Moncada S., Higgs A. // *New Engl. J. Med.* — 1993. — Vol. 329. — P. 2002–2012.
9. Nathan C., Marsden P.A. // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* — 1995. — Vol. 4. — P. 12–22.
10. Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S. et al. // *Hypertension.* — 1994. — Vol. 23. — P. 1121–1131.
11. Жуков В.І., Мірняєв А.Б., Кратенко Р.І. // *УРЖ.* — 2002. — Т. X, вип. 1. — С. 37–40.
12. Кратенко Р.І., Мірняєв А.Б. // *Там же.* — Вип. 2. — С. 167–170.
13. Ланг С.М., Уилсон Р.П. // *Лаб. животные.* — 1993. — Т. 3, № 2. — С. 101–110.
14. Горн Л.Э. // *Фармакол. и токсикол. Лаб. дело.* — 1951. — Т. XIV, № 4. — С. 12–14.
15. Романенко В.Д. *Физиология кальциевого обмена.* — К.: Наук. думка, 1975. — 264 с.
16. Юдаев Н.А., Афиногенова С.А., Казеев К.Н., Жукова Т.В. // *Биохим.* — 1981. — Т. 46, № 1. — С. 55–61.
17. Чирков Ю.Ю., Тыщук И.А., Белушкина Н.Н., Северина И.С. // *Там же.* — 1987. — Т. 52, № 6. — С. 956–963.
18. Kuo J.F., Shoji M., Brackett N.L., Helfman D.M. // *J. of cycl. nucleot. res.* — 1978. — Vol. 4, № 3. — P. 463–474.
19. Nussler A.K., Di Silvio M., Billiar T.R. et al. // *J. Exp. Med.* — 1992. — Vol. 176. — P. 261–264.
20. Omura T., Sato R. // *J. Biol. Chem.* — 1964. — Vol. 239, № 7. — P. 2379–2385.
21. Лакин Г.Ф. *Биометрия.* — М.: Высш. шк., 1990. — 154 с.

Надходження до редакції 19.05.2006.

Прийнято 24.05.2006.

Адреса для листування:  
 Кратенко Роман Іванович,  
 пр-т 50-річчя ВЛКСМ, 86, кв. 111, Харків, 66112, Україна