

МАРКЕРИ НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ ПРИ ІНГАЛЯЦІЙНІЙ ДІЇ ОКСИДІВ АЗОТУ В НОРМІ ТА ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ

¹В.М.Михайленко, ² П.М.Михайленко, ³І.С. Головіна

¹Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України

²ДУ "Український інститут стратегічних досліджень МОЗ України"

³Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України

РЕЗЮМЕ. Охарактеризовано порушення вільнорадикального гомеостазу при тривалому інгаляційному надходженні оксидів азоту (ОА) в організм щурів в нормі та при пухлинному рості. Показано, що циркуляція підвищеної кількості нітрозильних комплексів гемоглобіну, а також високо- та низькомолекулярних нітрозотіолів призводить до послаблення антиоксидантної системи крові. Екзогенні ОА впливають на процеси, пов'язані із продукцією ендogenous NO, шляхом гіперактивації макрофагів та зростання вмісту нітрозотіолів, особливо у тварин з прогресуючим пухлинним процесом, що призводить до виснаження резервних можливостей антиоксидантної системи організму. Зазначені зміни можуть бути використані в якості маркерів нітрозативного стресу.

Ключові слова: оксиди азоту, нітрозотіоли, нітрозативний стрес, нітрозильні комплекси гемоглобіну, метгемоглобін, трансферин, церулоплазмін, карцинома Герена.

РЕЗЮМЕ. Охарактеризовані порушення вільнорадикального гомеостазу при длительном ингаляционном поступлении оксидов азота (ОА) в организм крыс в норме и при опухолевом росте. Показано, что циркуляция повышенного количества нитрозильных комплексов гемоглобина, а также высоко- и низкомолекулярных нитрозотиолов приводит к ослаблению антиоксидантной системы крови. Экзогенные ОА влияют на процессы, связанные с продукцией эндогенного NO, путем гиперактивации макрофагов и увеличения содержания нитрозотиолов, особенно у животных с прогрессирующим опухолевым процессом, что приводит к истощению резервных возможностей антиоксидантной системы организма. Указанные изменения могут быть использованы в качестве маркеров нитрозативного стресса.

Ключевые слова: оксиды азота, нитрозотиолы, нитрозативный стресс, нитрозильные комплексы гемоглобина, метгемоглобин, трансферин, церулоплазмин, карцинома Герена.

SUMMARY. Violation of free-radical homeostasis is described at the prolonged inhalation of nitrogen oxides (OA) in intact rats and at the tumor growth. The circulation of elevated amounts of hemoglobin S-nitroso complexes and S-nitrosothiols resulted in depletion of the antioxidant system of blood. Exogenous OA influenced on processes, related to the production of endogenous NO, by hyperactivating of macrophage and causing growth of S-nitrosothiols level, especially in animals on the late stage of the tumor process which resulted in exhaustion of reserve potential of the organism's antioxidant system. The noted changes can be used as the markers of the nitrosative stress development.

Key words: nitric oxide, S-nitrosothiol, nitrosative stress, S-nitrosohaemoglobin, methhaemoglobin, transferrin, ceruloplasmin, Guerin carcinoma.

Оксид азоту (NO) — це простий двоатомний радикал, основне навантаження на організм якого протягом кількох десятиліть асоціювали із забрудненням атмосфери та тютюнопалінням [1]. Роль NO була описана у багатьох сферах, починаючи від забруднення атмосфери до регуляторних функцій в організмі, включаючи механізми серцево-судинних захворювань, канцерогенезу, пухлинної прогресії, генотоксичності та ангіогенезу. Молекула NO відносно інертна і вступає у взаємодію тільки з металами та високореактивними радикалами [2]. Однак за аеробних умов NO може реагувати з киснем, формуючи реактивні оксиди азоту (ОА), NO₂ та N₂O₃ [2]. Діоксид азоту (NO₂) — головний компонент смогу, що викликає легеневу токсичність вже при концентрації одна частина на мільйон частин повітря. Екзогенний NO потрапляє в організм переважно через легені, звідки надходить у кров. Там він зв'язується із гемоглобіном, альбуміном та іншими залізо- та SH-

вмісними білками і сполуками, транспортується по судинах до різних тканин і органів [3]. NO може окислюватись до нітритів та/або нітратів, які зазвичай виводяться з організму. Як і молекули кисню, молекула NO легко дифундує крізь клітинні мембрани, що забезпечує його дію без посередництва клітинних рецепторів. Частина NO може зворотньо зв'язуватись з біологічними молекулами, утворюючи S-нітрозотіоли (RS⁻-NO⁺) і динітрозовані комплекси негемового заліза ((RS⁻)₂Fe⁺(NO⁺)₂), що здійснюють його стабілізацію та перенесення від клітин-донорів до клітин-мішеней [4, 5]. Нітрозотіолам відводиться важлива роль у посттрансляційній модифікації сигнальних каскадів клітини і в модуляції біологічних процесів і патологічних станів [6, 7].

Різноманіття хімічних реакцій за участю ОА може бути умовно розділено на прямі та непрямі. До прямих реакцій відносять ті, в яких NO безпосередньо реагує з біологічними мішенями, включаючи молекули металів та високо-

реактивні радикали. А от, непрямі реакції відбуваються за участі O_2 або O_2^- , що призводить до генерації N_2O_3 , NO_2 , та $ONOO^-$, які можуть реагувати з різними біомакромолекулами та модифікувати їхні функції. Утворення таких реактивних форм азоту (РФА) є обов'язковою складовою розвитку нітрозативного та оксидативного стресу. Крім того, N_2O_3 бере участь у синтезі канцерогенних нітрозамінів. У той же час, $ONOO^-$ — потужний оксидант, який швидко перетворюється на NO_2 і може викликати окислення ліпідів та утворення токсичних похідних. До них відносять 4-гідроксиноненал, який може викликати пошкодження ДНК та впливає на роботу сигнальних каскадів [8, 9]. Таким чином, було показано, що високі рівні NO , які виникають в організмі при його інгаляційному надходженні або ж виділяються ендогенно активованими макрофагами та гепатоцитами, можуть призвести до нітрозативного або оксидативного стресу [10].

Біологічні ефекти NO різноманітні, частина з них опосередкована системою гуанідинциклаза/цГМФ. Завдяки ліпофільним властивостям NO , проникаючи в клітину, розчиняється в цитозолі та активує гуанідинциклазу шляхом зв'язування із гемовим залізом, виводячи залізо із порфіринового кільця у тканинах [11]. Надлишок NO інактивує й інші залізовмісні білки, до числа яких входять трансферин (ТФ), диальні ферменти мітохондрій, інгібуючи таким чином ріст і розмноження клітин.

Екзо- і ендогенний OA в організмі можуть взаємодіяти, що особливо проявляється за різних патологічних станів. Показано, що екзогенний NO може пригнічувати вивільнення ендогенного NO *in vitro* та *in vivo* [12] і відіграє важливу регуляторну роль за фізіологічних умов із залученням механізму зворотнього зв'язку щодо ендогенного NO . Так, інгібування синтезу NO у макрофагах знижувало протипухлинну резистентність організму. У ряді досліджень показано важливу роль NO в захисті організму від раку, однак деякі дослідження вказують на те, що NO може активізувати ріст пухлин [13]. Показано, що NO стимулює пухлинний ріст шляхом регулювання процесів життєдіяльності пухлини, зокрема шляхом підвищення проникності судин пухлин. Екзогенний монооксид азоту здатний стимулювати проліферацію ендотеліальних клітин, зокрема шляхом активації протеїнкіназного каскаду [14]. Вплив NO суттєво інгібує проліферацію Т-лімфоцитів, що обумовлює його негативну роль при онкологічних захворюваннях, а також стимулює синтез простагландинів, які пригнічують цитотоксичну активність макрофагів [13]. Відомо, що екзогенний NO відіграє важливу роль в апоп-

тозі [15], може як інгібувати апоптоз шляхом тіол-опосередкованої інактивації каспаз [16, 17], так й індукувати його через пошкодження ДНК та акумуляцію p53 [18, 19].

Монооксид азоту легко реагує з іншими вільними радикалами, що призводить до генерування нових надзвичайно токсичних форм, або до їх нейтралізації, що, в свою чергу, спричинює посилене пошкодження клітин або виконує захисну функцію. З'єднуючись з вільними кисневими радикалами, NO утворює токсичні пероксинітри, які разом з NO викликають пошкодження ДНК і мутації. Пероксинітри — сильний окислювач, здатний окислювати NH- і SH-групи білків, що призводить, зокрема до інактивації β -інгібітора протеїнази, тканинного інгібітора металопротеїнази й інших протеаз. Завдяки електрон-донорним властивостям, NO може також зменшувати наслідки оксидативного стресу шляхом гасіння ліпідних перекисів та інших радикалів [20].

Системна дія високих концентрацій OA , що можуть утворюватись в організмі як внаслідок ендогенного синтезу, так і при його надходженні інгаляційним шляхом, пов'язана з розвитком нітрозативного стресу. За цих умов відбувається нітрузування та зміна функціональної активності біологічних тіолів, пептидів та білків, інгібування репарації ДНК [13]. Можливим є утворення канцерогенних нітрозосполук *in vivo*. Надпродукція NO може бути причиною не тільки загибелі мікроорганізмів при запальному процесі, але й пошкодження клітин і тканин у місці продукції NO [21]. До цього часу залишається мало дослідженою роль саме екзогенного OA у формуванні нітрозативного стресу в організмі.

Оксидам азоту притаманна генотоксична, мутагенна і тератогенна активність, що пов'язано з характером взаємодії з ДНК. Численними дослідженнями показано, що ці сполуки та їх похідні, так само як і реактивні форми кисню, можуть ініціювати мутації та початкові стадії канцерогенезу [22]. Ці дані підтверджуються дослідженнями як *in vitro*, так і *in vivo* [23]. Оксид азоту та РФА можуть також модифікувати ДНК, спричинюючи деамінування шляхом нітрузування [2,24]. Routledge з колегами [25] з'ясували, що NO викликає переважно транзиційні порушення структури ДНК. Навпаки, виникнення трансверсій пов'язане з впливом оксидантів та алкілюючих агентів. При дії нітрозамінів спостерігаються як трансверсії, так і транзиції. З цих експериментів можна зробити висновок, що нітрозативний стрес викликає переважно транзиції, у той час як оксидативний — трансверсії.

Молекула NO впливає на ДНК не лише безпосередньо, але й модифікує білки, які беруть

участь у підтриманні цілісності цієї макромолекули. Специфічні білки репарації ДНК, такі як алкілтрансфераза, лігаза та Fpg виявляють диференціальну активність за умов нітрозативного стресу [26].

Надходження екзогенних ОА в організм інгаляційним шляхом запускає каскад фізіологічно важливих реакцій, пов'язаних із зв'язуванням з гемом гемоглобіну через утворення R- і T- конформерних нітрозильних комплексів гемоглобін-NO (ГБ-NO) та метгемоглобіну (метГБ). Останній нездатний оборотно функціонувати як переносник кисню. Підвищення його вмісту пов'язане зі зменшенням кількості та деструкцією оксигемоглобіну, що призводить до розвитку гемічної гіпоксії. Паралельно відбувається утворення нітрозильних комплексів з білками сироватки крові та низькомолекулярними лігандами [27, 28]. До цих комплексів включається лабільне залізо, яке є перехідною транспортною формою при обміні між ТФ і феритином. Зв'язуючись з циркулюючим гемоглобіном, NO може здійснювати свій вплив поза межами легенів, зокрема спричиняючи метгемоглобінемію, гіпоксію, блокування агрегації тромбоцитів тощо [29].

В організмі функціонують різні антиоксидантні системи захисту від надлишку продуктів вільнорадикальних реакцій, які активуються при розвитку нітрозативного стресу. Одним із елементів такої системи є церулоплазмін (ЦП) — головний зовнішньоклітинний антиоксидант, механізм дії якого відрізняється від природних та синтетичних антиоксидантів. ЦП є мідьвмісною оксидазою α_2 -глобулінової фракції плазми крові ссавців (феро- O_2 -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) мультифункціональний білок, що здійснює неспецифічний захист організму і є специфічним переносником і регулятором обміну міді в печінці, мозку та інших органах. Як фероксидаза, ЦП функціонально пов'язаний з кровотворною системою, каталізує перетворення Fe^{2+} в Fe^{3+} і включення його в апотрансферин. З одного боку, антиоксидантні властивості ЦП забезпечуються фероксидазною активністю, що дозволяє йому пригнічувати формування $\cdot OH$ з H_2O_2 у реакції Фентона та процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Існує також припущення, що ЦП здатний розкладати пероксиди ліпідів. З іншого боку, ЦП може діяти як антиоксидант за механізмом, не пов'язаним із фероксидазною активністю шляхом прямої взаємодії гідроксил-радикалу з амінокислотними залишками, а саме з тіоловими групами білків [30].

Трансферин — одноланцюговий залізовмісний глікопротеїн β -глобулінової фракції сироватки

крові ссавців. Його основна функція полягає в перенесенні та регуляції обміну заліза в органах і тканинах, він безпосередньо бере участь у процесах еритропоезу і гемопоезу. Оскільки ЦП каталізує окислення Fe^{2+} до Fe^{3+} , цей білок забезпечує насичення залізом молекули ТФ та мобілізацію заліза з ретикулоендотеліальної системи. У свою чергу, ТФ транспортує залізо до кісткового мозку, де відбувається синтез гемму. Таким чином, в клітині виникає можливість для взаємоперетворення динітрозильних комплексів заліза і нітрозотіолів (RS-NO), та їх взаємодії у системі, що включає NO, тіоли і залізо. Залізо відіграє роль каталізатора, який забезпечує як перетворення NO в NO^+ і тим самим можливість S-нітрузування тіолів, так і розпад RS-NO. Показано, що S-нітрузування гемоглобіну відбувається при контакті низькомолекулярних RS-NO з еритроцитами [31]. ЦП в комплексі з ТФ мають значний вплив на антиокислювальний потенціал крові. Сумарна антиокислювальна активність (АОА) системи ЦП-ТФ пропорційна величині їх відношення [32].

Метою даного дослідження є оцінка ролі екзогенних ОА і перитонеальних макрофагів (ПМФ) в розвитку нітрозативного стресу та його характеристика за вмістом нітрозотіолів і нітрозильних комплексів гемоглобіну, а також вивчення стану антиоксидантної системи організму щурів за рівнем ЦП і ТФ при інгаляційному надходженні ОА.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження виконано на неінбредних самцях щурів вагою 120-140 г з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України згідно з вимогами Державного комітету з етики [33]. Було сформовано 4 експериментальні групи: 1 — інтактний контроль (ІК); 2 — тварини, які зазнавали інгаляційного впливу ОА протягом 1 місяця по 16 годин на добу при середній концентрації ОА 150 мг/м³ повітря (ОА); 3 — тварини, яким перещеплювали суспензію клітин карциноми Герена (КГ); 4 — тварини, яким перещеплювали пухлинні клітини після зазначеного впливу ОА (ОА+КГ). Перещеплення КГ щурам здійснювали шляхом введення під шкіру стегна 0.5 мл 20% суспензії клітин (5×10^6 клітин/мл) солідної КГ у фізіологічному розчині.

Інгаляційний вплив ОА на щурів проводили у герметичній камері об'ємом 0,1 м³, до якої при інтенсивному перемішуванні з повітрям подавався очищений газоподібний NO. Подачу повітря здійснювали з швидкістю, що забезпечувала в камері 5-разовий газообмін за годину. При виході з камери частка NO становила 40%, NO₂ — 60%, а сумарна концентрація ОАх в камері — 150 мг/м³ повітря в перерахунку на

NO. Вміст NO визначали з використанням аналізатора термальної енергії (ТЕА)" [34].

Відбір зразків проводили одразу після дії ОА, а також на 12-ту (КГ₁₂) та 18-у (КГ₁₈) добу пухлинного росту. Зразки цільної крові для ЕПР-спектроскопії готували безпосередньо після взяття крові з використанням стандартної прес-форми, заморожували і зберігали в рідкому азоті. Спектри ЕПР реєстрували в умовах низькотемпературної стабілізації (77К) на радіоспектрометрах PE-1307 (СРСР) та E-109 (Varian, USA). Оцінку показників проводили, вимірюючи амплітуду сигналу ЕПР з певним g-фактором, з урахуванням сигналу внутрішнього стандарту, що дає сигнал ЕПР певної інтенсивності залежно від умов запису і резонансних властивостей досліджуваного зразка. Результати виражали у відносних одиницях (в.о.) як частку від величини сигналу ЕПР зразка і стандарту [35].

Вміст метГБ, ГБ-NO, ЦП та ТФ у цільній крові щурів визначали як величину, пропорційну амплітуді лінії поглинання ЕПР - сигналу з g-факторами, рівними 6,0; 2,01; 2,05 і 4,3 відповідно [32, 36, 37]. Концентрацію нітрозотіолів визначали у сироватці крові щурів і виражали в нМ [38]. Визначення активності ПМФ проводили за допомогою НСТ-тесту [39], результати виражали у %. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента [40].

Результати та їх обговорення. Тривале інгаляційне надходження в організм щурів екзогенних ОА супроводжувалось утворенням в еритроцитах значної кількості метГБ, нітрозильних комплексів гемоглобіну та підвищенням рівня нітрозотіолів у сироватці крові тварин. Утворення метГБ відбувається при перетворенні заліза гему із закисної форми на окисну, при цьому реєструється сигнал ЕПР з $g=6.0$.

Внаслідок реакцій ОА з гемоглобіном утворюється нітрозильний комплекс ГБ-NO з $g=2.01$ (рис. 1).

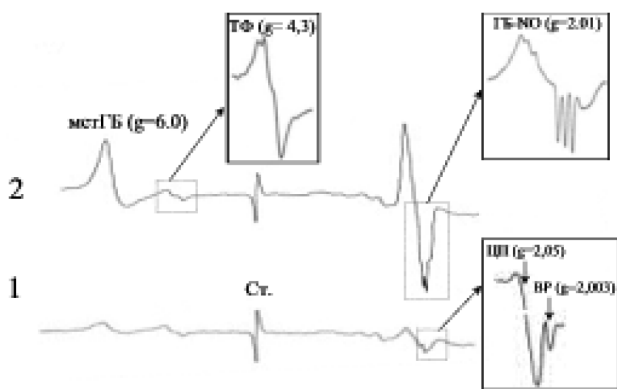


Рис. 1. Типові спектри ЕПР крові щурів контрольної групи (1) та тварин, що зазнали інгаляційного впливу екзогенних ОА (2).

Порівняння контрольних зразків з еритроцитами щурів, що знаходились в умовах тривалого інгаляційного впливу ОА, свідчить про утворення значної кількості метГБ та ГБ-NO. Кров експериментальних тварин досліджували менш ніж за 1 год. після припинення впливу ОА, чим пояснюється надзвичайно високий рівень метГБ, який у 67,7 раза перевищував значення у контрольній групі (рис. 2).

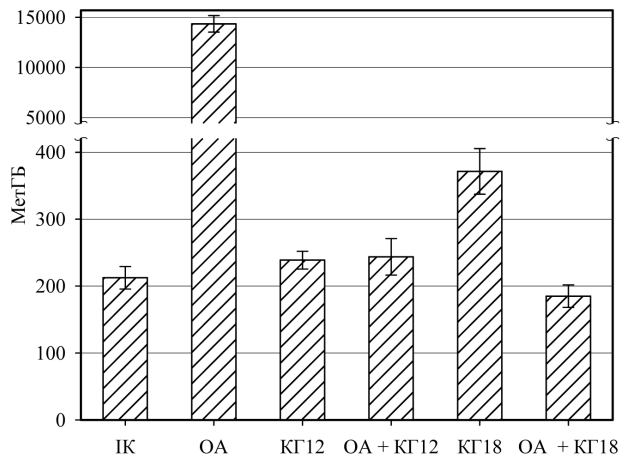


Рис. 2. Вміст метГБ в еритроцитах щурів при дії екзогенних ОА та пухлинному рості.

Вміст нітрозильних комплексів ГБ-NO у зразках цільної крові щурів при дії ОА зростав у 3,6 раза (рис. 3). Концентрацію нітрозотіолів визначали в сироватці крові щурів після інгаляційної дії ОА, а також на різних етапах розвитку КГ. Показано, що у крові інтактних тварин присутній певний рівень нітрозотіолів. Але у щурів, які протягом 1 місяця знаходились в умовах постійного інгаляційного навантаження ОА, рівень нітрозотіолів у 9,5 раза перевищував контрольний, що свідчить про виникнення в організмі тварин нітрозативного стресу (рис. 3).

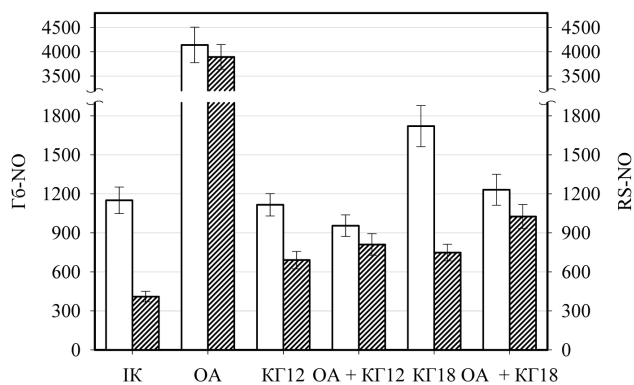


Рис. 3. Вміст ГБ-NO (□ – в.о.) в еритроцитах та RS-NO (▨ – нМ) в сироватці крові щурів при дії екзогенних ОА та пухлинному рості.

Розвиток КГ на ранній стадії (12 діб) не впливав на вміст нітрозильних комплексів ГБ-НО та рівень метГБ у крові щурів як у групах із дією ОА, так і без такої. Проте на пізньому етапі (18-та доба) розвитку пухлини спостерігалось статистично достовірне підвищення рівня метГБ в 1,8 раза і ГБ-НО у 1,5 раза у порівнянні як з контролем, так і з групою КГ₁₂ (рис. 2-3). Перещеплення та ріст КГ також супроводжувались зростанням концентрації нітрозотіолів у крові щурів у 1,7 раза на 12-у добу та в 1,8 раза на 18-у добу розвитку пухлин (рис. 3).

Необхідно зазначити, що у тварин, які попередньо знаходились в умовах інгаляційного навантаження ОА, вміст метГБ і ГБ-НО був меншим, ніж у відповідних групах щурів без впливу ОА, особливо на пізньому етапі росту КГ. Так, на 18-у добу розвитку пухлини рівень метГБ достовірно знижувався у 2 рази у порівнянні з тваринами без впливу ОА. Протилежна тенденція спостерігалась із вмістом ГБ-НО та нітрозотіолів. Показано, що в процесі росту пухлини вміст ГБ-НО у крові щурів групи ОА+КГ на 18-ту добу у 1,3 раза перевищував аналогічний показник на 12-у добу. Рівень нітрозотіолів у крові достовірно відрізнявся від значень у контрольній групі (у 2 та 2,5 раза на 12-у та 18-у добу росту КГ), а також на рівні тенденції від відповідних значень у щурів з КГ без впливу ОА (рис. 2-3).

Підвищення рівнів ГБ-НО та нітрозотіолів у процесі росту пухлини добре корелює із зміною метаболічної активності ПМФ (рис. 4). Так, тривала дія екзогенних ОА призводила до незначного підвищення активності ПМФ ($0,05 < p < 0,1$). На 12-у добу після прищеплення пухлинних клітин інтактним щурам спостерігали тенденцію до підвищення функціональної активності ПМФ на 72% порівняно з інтактним контролем. За умов прогресування пухлинного процесу (18-20 доба), активація ПМФ була статистично достовірною порівняно з інтактними тваринами.

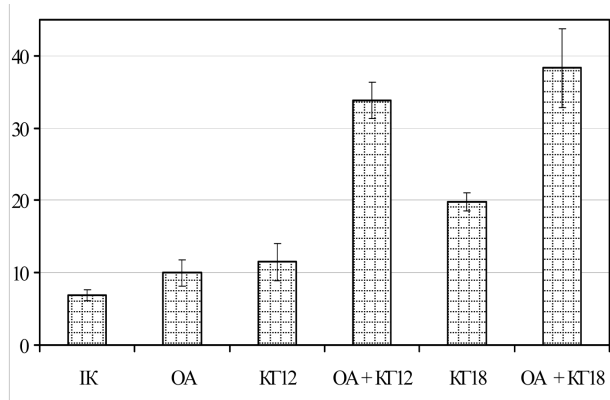


Рис. 4. Метаболічна активність ПМФ у щурів при дії екзогенних ОА та пухлинному рісті.

Розвиток КГ у тварин, що зазнали інгаляційного впливу ОА, супроводжувався значним ростом функціональної активності ПМФ, яка була в 4,9 раза більшою, ніж у інтактних тварин ($p < 0,001$) і в 3 рази ($p < 0,001$) більшою, ніж у щурів, які не зазнавали нітрозативного стресу. Таким чином, феномен посилення поглинальної та загальної окисно-відновної активності ПМФ щурів, які зазнавали інгаляційного впливу ОА, на тлі росту карциноми Герена не тільки зберігався, але й підсилювався. У тварин 4 групи на 18-у добу активність ПМФ в НСТ-тесті була найвищою серед експериментальних груп, що дає підставу говорити про тривалу гіперактивацію цієї популяції ефекторів природної резистентності.

Динаміка змін вмісту метГБ та ГБ-НО, корелює зі змінами рівня ЦП та ТФ у крові дослідних тварин (рис. 5). Так, інгаляційне надходження ОА призвело до стрімкого зростання рівня ЦП у 6,2 раза, а рівня ТФ у 7,4 раза в крові щурів. На ранньому етапі розвитку пухлини рівень ЦП та ТФ у крові не відрізнявся від контрольного. Однак на 18-у добу росту КГ вміст ТФ у 1,6 раза, а ЦП у 2,2 раза статистично достовірно перевищував їх значення у контрольних щурів. Для пізнього етапу росту КГ характерним виявилось перевищення вмісту ТФ і ЦП у 1,5 і 2,1 раза порівняно з раннім етапом росту пухлини.

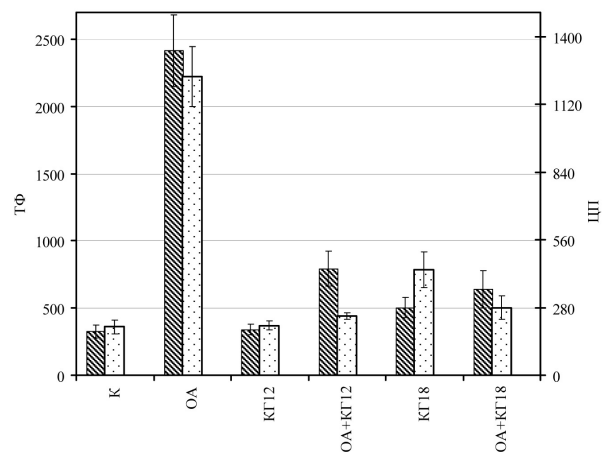


Рис. 5. Вміст ТФ (□ – в.о.) і ЦП (▨ – в.о.) в сироватці крові щурів при дії екзогенних ОА та пухлинному рісті.

Слід відзначити, що розвиток пухлини в організмі тварин з попереднім впливом ОА порізненому впливав на вміст ТФ та ЦП. Так, рівень ЦП в крові щурів групи ОА+КГ₁₂ лише на 20% перевищував його вміст у групах ІК та КГ₁₂.

На пізньому етапі росту КГ його вміст достовірно не змінювався порівняно з 12-ю добою, однак був в 1,6 раза нижчим, ніж у групі КГ₁₈. Більш значні зміни характерні для вмісту ТФ у крові щурів, які попередньо знаходились

в умовах інгаляційного навантаження ОА. Так, на 12-у добу росту КГ рівень ТФ у 2,4 раза перевищував його значення в групах ІК та КГ₁₂. Вміст ТФ залишався значно підвищеним (у 2 рази) і на 18-у добу росту пухлини порівняно з ІК, але він виявився на 20% нижчим за його рівень на ранньому етапі росту КГ (рис. 6).

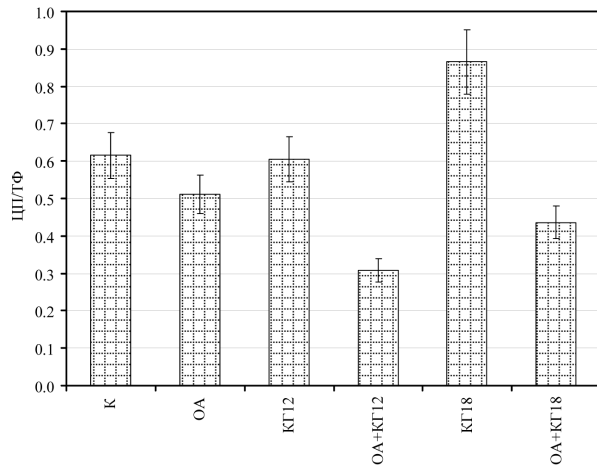


Рис. 6. Сумарна антиокислювальна активність системи ЦП-ТФ у щурів при дії екзогенних ОА та пухлинному рості.

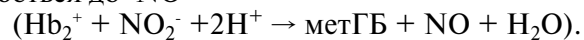
Вважається, що в сироватці крові ЦП спільно з ТФ утворює антиоксидантну систему, що регулює не тільки концентрацію відновлених іонів заліза, а й вільнорадикальний баланс в системі оксидант-антиоксидант. Сумарну АОА крові визначали за співвідношенням концентрацій активних центрів ЦП-ТФ у плазмі крові, яка є пропорційною величині їх відношення. Тривале інгаляційне надходження ОА супроводжувалось незначним (20%) зниженням співвідношення ЦП/ТФ, що вказує на зниження АОА плазми крові.

Перещеплення та ранні етапи росту КГ не впливали на вміст ТФ та ЦП, відповідно співвідношення ЦП/ТФ не відрізнялось від значення у контрольних тварин. Проте, на пізньому етапі росту КГ співвідношення ЦП-ТФ зростало на 40%, в основному за рахунок збільшення вмісту ЦП порівняно із ТФ, що свідчить про деяке посилення активності антиоксидантної системи у відповідь на патологічний процес. Така реакція з боку системи ЦП-ТФ вказує на збереження резервних можливостей антиоксидантної системи крові.

Протилежна картина спостерігається при рості КГ у тварин, які зазнали впливу ОА. Вже на 12 добу після перещеплення КГ співвідношення ЦП-ТФ зменшилось у 2 рази у порівнянні як з інтактними тваринами, так і групою КГ₁₂. Подібна тенденція зберігалась і на пізньому етапі росту пухлини, коли співвідношення ЦП/ТФ було в 1,4 раза меншим за значення в контролі та в 2 рази мен-

шим, ніж у щурів з пухлиною на 18 добу. Таке зниження АОА відбувалось за рахунок стабільного рівня ЦП при значному збільшенні рівня ТФ в плазмі крові. Ці дані вказують як на наявність оксидативного стресу, так і на виснаження резервних можливостей антиоксидантної системи організму при дії ОА.

Підсумовуючи одержані результати, спрямованість змін за їх характером можна розділити на два етапи. Перший — одразу після закінчення хронічної дії ОА за наявності токсичного впливу на організм. Тривале інгаляційне надходження екзогенних ОА супроводжувалось розвитком в організмі щурів нітрозативного стресу, який проявлявся в утворенні великої кількості метГБ, нітрозильних комплексів із гемоглобіном, альбуміном й іншими залізо- та SH-вмісними білками і сполуками та підвищенні рівня нітрозотіолів у крові тварин. Оскільки утворення комплексів ГБ-NO відбувається одночасно з окисненням гемоглобіну до метГБ, то при високих рівнях у крові ГБ-NO може виникати гемічна гіпоксія. В організмі NO може не тільки окислюватись до нітритів та/або нітратів, але і відновлюватись із цих сполук. У реакції відновлення іонів NO₂⁻ до NO основну роль відіграє сам гемоглобін крові, оскільки O₂ у крові взаємодіє в першу чергу з ним. При взаємодії іонів NO₂⁻ з дезоксигемоглобіном відбувається окисно-відновна реакція, в ході якої дезоксигемоглобін окислюється до метГБ, а NO₂⁻ відновлюється до NO



Другий етап характеризувався збільшенням рівня нітрозотіолів та активності ПМФ, особливо у тварин 4 групи (ОА + КГ) у порівнянні з щурами, що не зазнали попереднього впливу ОА. Завдяки зворотньому зв'язуванню NO з біологічними молекулами і утворенню більш стабільних S-нітрозотіолів (RS-NO⁺), а також комплексів негемового заліза ((RS)₂Fe⁺(NO⁺)₂) забезпечується перенесення NO до різних тканин і органів де, за певних умов, він може вивільнитись [4, 5]. Утворення комплексів ГБ-NO та нітрозотіолів у крові щурів було найвищим одразу після дії ОА, після чого їх вміст зменшувався і на 12-у добу майже не відрізнявся від контролю. Але, достовірно підвищення рівня ГБ-NO та нітрозотіолів також спостерігалось в організмі щурів і на пізніх етапах росту КГ. Малоімовірно, щоб це відбувалося за рахунок екзогенних ОА, оскільки від закінчення інгаляцій до часу проведення дослідження минуло 12 або 18 діб. Більш ймовірним є посилення ендogenous утворення NO, як результат впливу екзогенних ОА та пухлинного процесу на організм щурів. Це підтверджується гіперактивацією функціо-

нальної активності ПМФ на пізньому етапі росту КГ у тварин, що попередньо знаходились в умовах інгаляційного навантаження ОА. Так, тривала інгаляційна дія NO призводила до незначного підвищення активності ефektorів природної резистентності — ПМФ. Відомо, що за наявності токсичного впливу на організм чинників різної природи спостерігається компенсаторна активація моноцитарної ланки імунної системи [41]. Ріст КГ у інтактних щурів супроводжувався помірною активацією ПМФ, що відображає ранню відповідь організму на прищеплення пухлинних клітин. Така реакція імунної системи є типовою для щурів з прищепленою модельною пухлиною [39]. Проте у групі тварин, яким КГ перещепили після інгаляційної дії ОА, спостерігалась гіперактивація макрофагів у порівнянні з інтактними тваринами (показник НСТ-тесту зростав у 4,9-5,6 раза).

Виявлені зміни рівня метГБ, ГБ-NO і нітрозотіолів корелювали зі змінами рівня ТФ і ЦП у крові дослідних тварин. Так, тривала інгаляційна дія ОА призвела до зростання рівня ТФ більше, ніж у 7 разів. Таке значне зростання рівня ТФ у крові дослідних тварин може бути пов'язане з підсиленням обміну заліза, як компенсаторної реакції у відповідь на порушення, спричинені тривалою дією ОА, особливо у тварин з КГ.

Надзвичайно важливою є роль ЦП, який виступає в якості головного зовнішньоклітинного антиоксиданту. Значне підвищення його вмісту (у 6 разів) у крові тварин після дії ОА є реакцією на нітрозативний стрес, який характеризується значним порушенням вільнорадикального гомеостазу в організмі щурів. Паралельно знижувалась сумарна АОА, визначена за співвідношенням концентрацій активних центрів ЦП-ТФ у плазмі крові. Відомо, що фероксидазна активність ЦП дозволяє йому пригнічувати стимульоване іонами Fe^{2+} формування гідроксил радикалу ($\cdot OH$) з H_2O_2 , а також процеси ПОЛ, що в результаті зменшує утворення активних форм кисню. Крім того, ЦП здатен напряму змінювати взаємодію гідроксил-радикалу з амінокислотними залишками, де він може конкурувати з ОА [42]. Вміст ЦП

також підвищувався в організмі тварин з перещепленою КГ, особливо на пізньому етапі росту пухлини. Але, у тварин, які зазнали інгаляційного навантаження ОА, вміст ЦП знижувався на 60% з 12 по 18 у добу росту КГ, що супроводжувалось зменшенням співвідношення ЦП/ТФ і свідчить про зниження антиоксидного захисту організму. Таке зниження АОА відбувалось за рахунок збільшенні рівня ТФ у плазмі крові, що вказує як на наявність оксидативного стресу, так і на виснаження резервних можливостей антиоксидантної системи організму при дії ОА.

Значне зниження вмісту ЦП на фоні підвищених концентрацій екзогенних ОА і утворення значної кількості нітрозотіолів внаслідок надлишкового синтезу NO активованими макрофагами, мало призвести до пошкодження тканин вільнорадикальними формами і зниження імунного опору організму у відповідь на розвиток пухлин, що корелювало з більш інтенсивним ростом КГ у тварин цієї групи [43].

Таким чином, інгаляційне надходження ОА супроводжується порушенням вільнорадикального гомеостазу шляхом підвищення рівня ГБ-NO і метГБ, активації ПМФ і збільшення кількості нітрозотіолів, зміни вмісту ТФ і ЦП у крові щурів, що сприяє розвитку нітрозативного стресу в організмі тварин. Циркуляція підвищеної кількості нітрозильних комплексів гемоглобіну, а також високо- та низькомолекулярних нітрозотіолів призводить до зниження АОА в організмі завдяки впливу на ключові елементи антиоксидантної системи крові, що виражається, зокрема, у зменшенні співвідношення ЦП/ТФ. Крім того, екзогенні ОА впливають на процеси, пов'язані із продукцією ендogenous NO, шляхом гіперактивації макрофагів та зростання вмісту нітрозотіолів, особливо у тварин з прогресуючим пухлинним процесом, що призводить до виснаження резервних можливостей антиоксидантної системи організму. Зазначені зміни можуть бути використані в якості маркерів при розвитку нітрозативного стресу в організмі, що знаходиться в умовах тривалого впливу підвищених концентрацій екзогенних ОА.

ЛІТЕРАТУРА

1. Schwartz, S.E. Trace Atmospheric Constituents / S. E. Schwartz, W. H. White. Properties, Transformation and Fates — John Wiley and Sons, New York, 1983. — P. 1—117.
2. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species / D. A. Wink, I. Hanbauer, M. C. Krishna, [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — 90. — P. 9813—9817.
3. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide / R. Marley, R.P. Patel, N. Orie [et al.] // Free Radic Biol Med. — 2001, Sep 1. — 31(5) — P. 688—696.
4. Ванін А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы — две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А. Ф. Ванін // Биохимия. — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 924—938.
5. Ванін А.Ф. Оксид азота — регулятор клеточного метаболизма. / А. Ф. Ванін // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — Т. 7, № 11. — С. 7—12.
6. Jour'd'heuil D. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism / D. Jour'd'heuil, F. L. Jour'd'heuil, M. Feelisch //

- J. Biol. Chem. — 2003. — 278 (18). — P. 15720—15726.
7. Yang Y. S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells. / Y. Yang, J. Loscalzo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005, Jan 4. — 102(1). — P. 117—22.
 8. Malondialdehyde adducts in DNA arrest transcription by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II / S.D. Cline, J.N. Riggins, S. Tornaletti [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — 101. — P. 7275—7280.
 9. Induction of apoptosis in colorectal carcinoma cells treated with 4-hydroxy-2-nonenal and structurally related aldehydic products of lipid peroxidation [Text] / J. D. West, C. Ji, S. T. Duncan [et al.] // Chem. Res. Toxicol. — 2004. — 17. — P. 453—462.
 10. Nitric Oxide (NO) and Cancer. Prognosis, Prevention, and Therapy / Benjamin Bonavida Editor. — Springer. New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010. — 513 p.
 11. Arnold W. P. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations / W. P. Arnold, C. K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — 74. — P. 3203—3207.
 12. Exogenous NO inhibits basal NO release from vascular endothelium in vitro and in vivo. / X.L. Ma, B.L. Lopez, T.A. Christopher, [et al.] // Am J. Physiol Heart Circ. Physiol. — 1996. — Vol. 271. — P. 2045—2051.
 13. Значение химических свойств оксида азота для лечения онкологических заболеваний / [Д.А. Винк, Й. Водовоз, Дж.А. Кук и др.] — Биохимия. — 1998. — Т.63, вып.7. — С. 948—957.
 14. Zheng J. Exogenous nitric oxide stimulates cell proliferation via activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in ovine fetoplacental artery endothelial cells / J. Zheng, Y.X. Wen, J.L. Austin, D. Chen // Biology of Reproduction. — 2006. — Vol. 74. — P. 375—382.
 15. Brune B. Nitric oxide and its role in apoptosis / B. Brune, A. Knethen, K. B. Sandau // Eur. J. Pharmacol. — 1998. — Vol. 351. — P. 261—272.
 16. Potter C. L. Exogenous nitric oxide inhibits apoptosis in guinea pig gastric mucous cells / C.L. Potter, P.J. Hanson // Gut. — 2000. — Vol. 46. — P. 156—162.
 17. Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of the rabbit lung / H. Yamashita, S. Akamine, Y. Sumida [et al.] // Ann. Thorac. Surg. — 2004. — Vol. 78. — P. 292—297.
 18. Exogenous nitric oxide enhances neutrophil cell death and DNA fragmentation / J.D. Fortenberry, M.L. Owens, M.R. Brown [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 1998. — Vol. 18, № 3. — P. 421—428.
 19. Nitric oxide mediates apoptosis induction selectively in transformed fibroblasts compared to nontransformed fibroblasts / S. Heigold, C. Sers, W. Bechtel [et al.] // Carcinogenesis. — 2002. — Vol. 23, № 6. — P. 929—941.
 20. Nitric oxide dissociates lipid oxidation from apoptosis and phosphatidylserine externalization during oxidative stress / J.P. Fabisiac, V.A. Tyurin, Y.Y. Tyurina [et al.] // Biochemistry. — 2000. — Vol. 39, № 1. — P. 127—138.
 21. Tidball J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair / J.G. Tidball // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. — 2005, Feb. — 288(2). — P. 345—53.
 22. Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis / E. Felley-Bosco // Cancer Metastasis Rev. — 1998. — 17, №1. — P. 25—37.
 23. Study on DNA strand breaks induced by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, in vivo and in vitro / W. Lin, X. Wei, H. Xue [et al.] // Mutat. Res. — 2000. — 466, №2. — P. 187—95.
 24. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide / T. Nguyen, D. Brunson, C.L. Crespi [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — 89. — P. 3030—3034.
 25. Nitrite-induced mutations in a forward mutation assay: influence of nitrite concentration and pH / M.N. Routledge, F.J. Mirsky, D.A. Wink [et al.] // Mutat. Res. — 1994a. — 322. — P. 341—346.
 26. Laval F. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity. Implication of inhibition of DNA repair proteins / F. Laval, D. A. Wink, J. Laval // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. — 1996. — 131. — P. 175—191.
 27. Herold S. Reactions of deoxy-, oxy-, and methemoglobin with nitrogen monoxide. / Mechanistic studies of the S-nitrosothiol formation under different mixing conditions / S. Herold // J. Biol. Chem. — 2003, Feb. 28. — 278(9). — P. 6623—6634.
 28. Gow A.J. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions / S. Herold, G. Rock // Nature. 1998, Jan 8. — 391(6663). — P.169—73.
 29. Weinberger B. The toxicology of inhaled nitric oxide / B. Weinberger, D. L. Laskin, D.E. Eck, J.D. Laskin // Toxicological Sciences. — 2001. — Vol. 59. — P. 5—16.
 30. Соотношение церулоплазмин-трансферрин и трансферрин-метгемоглобин в прогнозировании послеоперационных осложнений у больных с внутрочерепными внемозговыми краниобазальными опухолями / Л.П. Чепкий, Е.П. Сидорик [и др.] // Український нейрохірургічний журнал. — 2001. — №3. — С. 65—73.
 31. Jia L. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control / L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, J.S. Stamler // Nature, 1996, Mar 21. ;-380(6571). — P. 221—226.
 32. Пулатова М. К. Электронный парамагнитный резонанс в радиобиологии / М.К. Пулатова, Г.Т. Рихирева, З.В. Куроптева. — М. : Энергоатомиздат, 1989. — 226 с.
 33. Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. — К.: Авіцена, 2002. — 156 с.
 34. Fine D. H. Analysis of volatile N-nitroso compounds by combined gas chromatography and thermal energy analysis / D.H. Fine, D.P. Rounbehler // Environmental N-nitroso compounds, analysis and formation. — IARC Sci. Publ., 1976. — 14. — P. 117—127.
 35. Ажипа Я. И. Медико-биологические аспекты применения метода ЭПР [Текст] / Я. И. Ажипа. — М. : Наука, 1983. — 528 с.
 36. Шинкаренко Л. И. Применение метода электронного парамагнитного резонанса в изучении регуляторной роли ЦП и ТФ сыворотки крови животных в условиях действия гипербарической оксигенации / Л. И. Шинкаренко, Н. И. Гольдштейн, А. В. Козлов, О. А. Азизова // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. — Рига: Зинатне, 1989. — С. 190—201.
 37. Mouithys-Mickalad A. An electron spin resonance (ESR) study on the mechanism of ascorbic radical production by metal-binding proteins / A. Mouithys-Mickalad, N. Debu, G. Deby-Dupont, M. Lamy // Biometals. — 1998. — 11, N2. — P. 81—88.
 38. Kostka P. Fluorometric detection of S-Nitrosothiols / P. Kostka, J.K.J. Park // Methods in Enzymology. — 1999. — 301. — P. 227—235.
 39. Изменение противоопухолевой резистентности крыс Вистар при длительном облучении в зоне отчуждения ЧАЭС / З.Д. Савцова, Н.И. Федосова, И.М. Воейкова [и др.] // Эксперим онкология. — 2001. — 23. — С. 183—188.
 40. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М. : Высшая школа, 1990. — 352 с.
 41. Савцова З. Д. Вплив радіоактивного випромінювання на імунну систему живих організмів / З.Д. Савцова, Н.І. Джаман // Чорнобиль. Зона Відчуження. : [зб. наук. пр.], — К. : Наукова думка. — с. 410—422.
 42. Direct evidence of ceruloplasmin antioxidant properties / R.L. Atansi, D. Stea, M.A. Mateescu [et al.] // Mol. and cellular biochem. — 1998. — 189. — P. 127—135.
 43. Effect of environmental nitric oxides on the antitumor resistance of rats / V.M. Mikhailenko, Z.D. Savtsova, O.A. Glavin [et al.] // Exp. Oncol. — 2005. — 27, №1. — P. 65—70.

Надійшла до редакції 29.09.2011 р.