



Yoshino T., Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells // Mol. Cell. Biol. — 2002. — 22, № 6. — P. 1693-1703.

30. Gao Z.H., Seeling J.M., Hill V. et al. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2002. — 99, № 3. — P. 1182-1187.

31. Rubinfeld B., Tice D.A., Polakis P. Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon // J. Biol. Chem. — 2001. — 276, № 42. — P. 39037-39045.

32. Desagher S., Osen-Sand A., Montessuit S. et al. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8 // Mol. Cell. — 2001. — 8, № 3. — P. 601-611.

33. Knippschild U., Milne D.M., Campbell L.E. et al. p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase1 delta in response to topoisomerase-directed drugs // Oncogene. — 1997. — 15, № 14. — P. 1727-1736.

34. Miyazaki K., Nagase T., Masaki M. et al. Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts // Biochem. J. — 2004. — 380, PT 1. — P. 95-103.

35. Sato T.K., Yamada R.G., Ukai H. et al. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function // Nat. Genet. — 2006. — 38, № 3. — P. 312-319.

36. Motzkus D., Loumi S., Cadenas C. et al. Activation of human period-1 by PKA or CLOCK/BMAL1 is conferred by separate signal transduction pathways // Chronobiol. Int. — 2007. — 24, № 5. — P. 783-792.

37. Яворовський О.П., Зенкіна В.І. Метил-третбутиловий ефір як глобальний забруднювач довкілля. Токсикологічні та екологічні аспекти ризику впливу в Україні // Довкілля та здоров'я. — 2005. — 35, № 4. — P. 75-80.

38. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O., Oguira T., Esumi H. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // FEBS Lett. — 2004. — 576, № 1. — P. 14-20.

Надійшла до редакції 10.03.2010.

EXOGENOUS NITRIC OXIDES IMPACT ON THE LEVEL OF S-NITROSO COMPLEXES IN BLOOD OF RATS IN A NORM AND AT TUMOUR GROWTH

Mikhailenko V.M.

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ ОКСИДІВ АЗОТУ НА РІВЕНЬ НІТРОЗИЛЬНИХ КОМПЛЕКСІВ У КРОВІ ЩУРІВ У НОРМІ ТА ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ



МИХАЙЛЕНКО В.М.

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

УДК: 616-006.04:661.98:616.155.16

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

Оксиди азоту (ОА) є одними з основних забруднювачів повітря з високим нітрузуючим потенціалом. Внаслідок техногенної діяльності людини щорічно в атмосферу надходять понад 50 млн. тонн ОА з продуктами згоряння і 25 млн. тонн — з промисловими викидами [1]. Екзогенний монооксид азоту (NO) в атмосфері окислюється до діоксиду азоту, що справляє токсичну дію на живі організми.

Екзогенний NO потрапляє до організму переважно через легені, звідки надходить у кров. Там він зв'язується з гемоглобіном, альбуміном та іншими залізо- та SH-вмісними білками і сполуками, транспортується судинами до різних тканин і органів [2]. NO може окислюватися до нітритів та/або нітратів, які зазвичай виводяться з організму. Як і молекули кисню, молекула NO легко дифундує крізь клітинні мембрани, що і забезпечує його дію без посередництва клітинних рецепторів. Частина NO може зворотньо зв'язуватися з біологічними молекулами, утворюючи S-нітрозотиоли

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ОКСИДОВ АЗОТА НА УРОВЕНЬ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КРОВИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

Михайленко В.М.

Изучали влияние экзогенных оксидов азота (ОА) на образование и изменение содержания нитрозильных комплексов гемоглобина, метгемоглобина, нитрозотиолов, трансферина и церулоплазмينا в сыворотке крови крыс в норме и при опухолевом росте. Показана взаимосвязь между развитием нитрозативного стресса и нарушениями свободнорадикального гомеостаза в организме. Длительное воздействие экзогенных ОА у крыс с карциномой Герена вызывало снижение содержания церулоплазмينا, что негативно влияет на антиоксидантные процессы.

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

© Михайленко В.М. СТАТТЯ, 2010.



(RS--NO⁺) і динітрозовані комплекси негемового заліза (RS)₂Fe⁺(NO⁺)₂, що здійснюють його стабілізацію та перенесення від клітин-донорів до клітин-мішеней [3, 4]. Останнім часом нітрозотіолам відводиться важлива роль у посттрансляційній модифікації сигнальних каскадів клітини та у модуляції біологічних процесів і патологічних станів [5, 6].

Механізми дії NO на біологічні системи можна поділити на прямі та непрямі його ефекти. Прямі ефекти зумовлені хімічними реакціями, у ході яких NO безпосередньо взаємодіє з біологічними мішенями. Непрямі ефекти NO переважно опосередковані активними формами оксиду азоту, що утворюються при взаємодії NO з супероксидом або киснем [4, 7]. Функції і роль молекули NO в організмі багатогранні і активно досліджуються. В організмі NO синтезується при окисленні азоту L-аргініну, і ця реакція каталізується ферментом NO-синтазою. У результаті п'ятиелектронного окислення утворюються NO і L-цитрулін [8]. Ендогенний NO відіграє важливу роль у багатьох життєво важливих процесах, зокрема у регуляції тонуусу кровоносних судин, розслаблення гладких м'язів, гальмування агрегації тромбоцитів, виділення нейромедіаторів у центральній нервовій системі, є одним з ефektorів системи клітинного імунітету [9, 4, 7].

Екзогенний NO надходить до організму інгаляційним шляхом і є легеневиим вазодилататором. Разом з корисною дією NO може справляти токсичний ефект. Так, екзогенний NO може реагувати з киснем у легенях та утворювати NO₂, який є сильним легеневиим подразником. NO також може реагувати з супероксидом аніоном, утворюючи пероксинітрит, який перешкоджає нормальному функціонуванню сурфактанту. Зв'язуючись з циркулюючим гемоглобіном, NO може здійснювати свій вплив поза межами легенів, зокрема спричиняючи метгемоглобінемію, блокування агрегації тромбоцитів тощо [10].

Надзвичайно важливим напрямком досліджень є вивчення взаємодії екзо- і ендогенного OA в організмі, особливо за різних патологічних станів. Показано, що екзогенний NO суттє-

во пригнічує вивільнення ендогенного NO в аортальних кільцях щурів *in vitro* та *in vivo* [11]. Дослідники припустили, що екзогенний монооксид азоту відіграє важливу регуляторну роль за фізіологічних умов з залученням механізму зворотного зв'язку щодо ендогенного NO. Так, інгібування синтезу NO у макрофагах знижувало протипухлинну резистентність організму. Низкою досліджень показано важливу роль NO у захисті організму від раку, однак деякі дослідження вказують на те, що NO може активувати ріст пухлин [12]. 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 через активацію MAP2K1/2/MARK3/1 каскаду [13]. Також було показано, що під дією NO суттєво інгібується проліферація T-лімфоцитів, що зумовлює його негативну роль при онкологічних захворюваннях. NO також стимулює синтез простагландинів, які пригнічують цитотоксичну активність макрофагів [12].

Монооксид азоту може посилювати пошкодження клітини при оксидативному стресі, а також виконувати захисну функцію. NO легко реагує з іншими вільними радикалами, що призводить до генерування нових надзвичайно токсичних форм або до їх нейтралізації. Завдяки електрон-донорним властивостям NO може зменшувати наслідки оксидативного стресу шляхом гасіння ліпідних перекисів, а також інших радикалів [14].

Відомо, що NO може інгібувати апоптоз шляхом тіол-опосередкованої інактивації каспаз [15, 16] та індукувати його. Екзогенний NO індукує апоптоз у макрофагах, нейтрофілах [17], фібробластих [18] та деяких інших клітинах. У культурах гепатоцитів OA демонстрував лише протекторні ефекти та знижував активність каспаз, які відіграють важливу роль при апоптозі [19]. Проапоптичні ефекти NO можуть бути пов'язаними з пошкодженням ДНК та акумуляцією р53, антиапоптичні ефекти — з залученням цГМФ [20].

Системна дія високих концентрацій OA, що можуть утворю-

ватися в організмі внаслідок ендогенного синтезу та при його надходженні інгаляційним шляхом, пов'язана з розвитком нітрозативного стресу. За цих умов відбувається нітрузування біологічних тіолів, пептидів та білків, інгібування репарації ДНК [12]. Внаслідок нітрузування змінюється їхня функціональна активність, а також можливе утворення канцерогенних нітрозосполук *in vivo*. До цього часу залишається малодослідженою роль саме екзогенного OA у формуванні нітрозативного стресу в організмі.

Переважаючо NO виступає як фактор захисту проти інфекційних агентів у клітинній ланці імунної відповіді, проте його ефекти неспецифічні. Надпродукція NO може бути причиною не тільки загибелі мікроорганізмів, але й пошкодження клітин і тканин у місці продукції NO [21]. За високих концентрацій NO інактивує ферменти, взаємодіючи з їхніми залізо-сірчаними центрами, викликає одониткові розриви (ОНР) у ДНК, що призводить до активації ядерного ферменту поліАДФ-рибозил трансферази та інгібує синтез ДНК і білка [22].

Надходження екзогенних OA до організму супроводжується зв'язуванням NO з гемом гемоглобіну і утворенням метгемоглобіну (метГБ), що призводить до гемічної гіпоксії. Паралельно відбувається утворення нітрозильних комплексів з гемоглобіном, білками сироватки крові та з низькомолекулярними лігандами [23, 24]. До цих комплексів належить лабільне залізо, яке є перехідною транспортною формою при обміні між трансферином (ТФ) і феритином.

Таким чином, нині відомо, що вільнорадикальні продукти монооксиду і діоксиду азоту мають властивість пошкоджувати білки і ненасичені жирні кислоти, змінювати активність низки ферментативних систем, порушувати цілісність клітинних і субклітинних мембранних структур, інгібувати транспорт електронів дихальним ланцюгом мітохондрій, знижувати рівень АТФ у крові і у клітинах тканин ссавців, окислювати гемоглобін крові і брати участь в утворенні R- і T-конформерних комплексів гемоглобін-NO (ГБ-NO). Крім того, OA притаманна мутагенна і тератогенна актив-

EXOGENOUS NITRIC OXIDES IMPACT ON THE LEVEL OF S-NITROSO COMPLEXES IN BLOOD OF RATS IN A NORM AND AT TUMOUR GROWTH
Mikhailenko V.M.

The exogenous nitric oxides (NO) effects on formation and alteration of hemoglobin S-nitroso complexes content as well as methemoglobin, transferrin and ceruloplasmin levels in the blood serum of intact rats and at tumor growth were studied. The correlation between nitrosative

stress development and violation of free-radical homeostasis in an organism was shown. The prolonged effect of exogenous NO on rats bearing the Guerin carcinoma resulted in a decrease of ceruloplasmin level and negatively influenced on antioxidant processes.

Keywords: nitric oxide, S-nitrosothiol, S-nitrosohaemoglobin, methemoglobin, transferrin, ceruloplasmin, nitrosative stress, Guerin carcinoma.

ність, що пов'язано з характером взаємодії з ДНК. Численними дослідженнями показано, що ці сполуки та їхні похідні можуть так само, як і реактивні форми кисню ініціювати мутації та початкові стадії канцерогенезу [25]. Ці дані підтверджуються дослідженнями *in vitro* та *in vivo* [26].

Водночас в організмі функціонують різні антиоксидантні системи захисту від шкідливих наслідків вільнорадикальних реакцій, які активуються при розвитку нітрозативного стресу. Одним з елементів такої системи є церулоплазмін (ЦП) — головний зовнішньоклітинний антиоксидант, механізм дії якого відрізняється від природних та синтетичних антиоксидантів. З одного боку, антиоксидантні властивості ЦП забезпечуються фероксидазною активністю, що дозволяє йому пригнічувати формування $\cdot\text{OH}$ з H_2O_2 у реакції Фентона та процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Існує також припущення, що ЦП здатний розкласти пероксиди ліпідів. З іншого боку, ЦП може діяти як антиоксидант за механізмом, не пов'язаним з фероксидазною активністю шляхом прямої взаємодії гідроксил-радикалу з амінокислотними залишками, а саме з тіоловими групами білків.

Оскільки ЦП каталізує окислення Fe^{2+} до Fe^{3+} , цей білок забезпечує насичення залізом молекули трансферину (ТФ) та мобілізацію заліза з ретикулоендотеліальної системи. ТФ, у свою чергу, транспортує залізо до кісткового мозку, де відбувається синтез гему. Таким чином, ЦП також бере участь в утилізації заліза та кровотворенні. У клітині виникає можливість для взаємоперетворення динітрозильних комплексів заліза і нітрозотіолів (RS-NO) та їхнє співіснування у системі, до якої входять NO, тіоли і залізо.

Залізу належить особлива роль у цій системі: воно відіграє роль каталізатора, який забезпечує, з одного боку, перетворення NO і NO^+ і тим самим можливість S-нітразування тіолів, а з іншого, — розпад RS-NO. Показано, що відбувається S-нітразування гемоглобіну при контакті низькомолекулярних RS-NO з еритроцитами [27]

Метою даного дослідження є оцінка впливу екзогенних ОА на рівень нітрозотіолів, зокрема нітрозильних комплексів крові щурів у нормі та при пухлинному стресу. Визначення нітразування гемоглобіну, рівнів ЦП і ТФ є важливим для характеристики змін, що виникають при розвитку нітрозативного стресу в організмі щурів внаслідок тривалого інгаляційного впливу ОА.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження виконано на неінбредних самцях щурів вагою 120-140 г з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Проведення процедур з експериментальними тваринами здійснювалося згідно з вимогами Державного комітету з етики. Тварини утримувались у стаціонарних умовах віварію за постійної температури та природного освітлення. Забій тварин проводили методом декапітації під ефірним наркозом [28]. Інгаляційну затравку щурів ОА здійснювали у герметичній камері об'ємом 100 л, до якої подавався очищений газоподібний NO при інтенсивному перемішуванні з повітрям при вході до камери. Повітря подавалося з швидкістю, що забезпечувала у камері 5-разовий газообмін на годину. При виході з камери частка NO становила 40%, NO_2 — 60%, а сумарна концентрація O_2 у камері — 150 mg/m^3 повітря у перерахун-

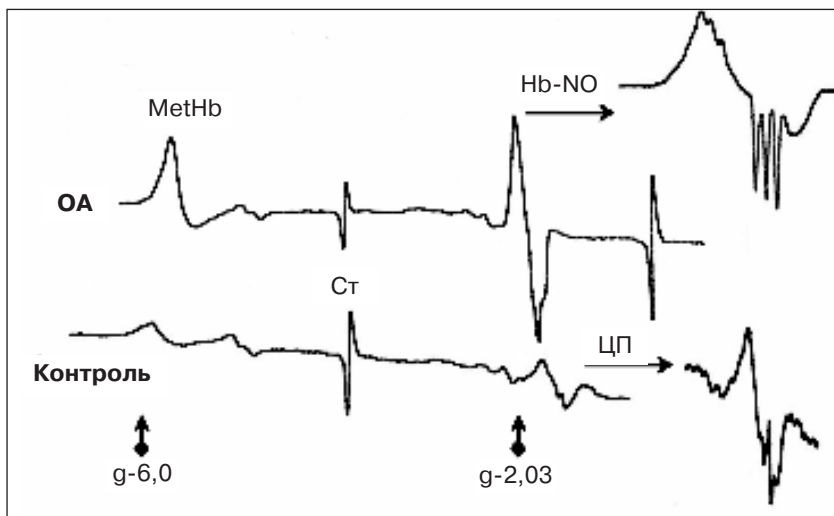
ку на NO. Контроль вмісту ОА в інгаляційній камері проводили пропусканням газового потоку через систему пасток з розчинними йодиду калію та перманганату калію з подальшим визначенням у них нітритів [29] і нітратів [30]. Монооксид азоту отримували у реакції 20% розчину сірчанокислого заліза з сумішшю концентрованої соляної кислоти та 40% нітриту натрію [31], вміст NO визначали з використанням системи "газовий хроматограф — аналізатор термальної енергії (TEA)" [32].

Було сформовано 4 групи тварин: 1 — інтактний контроль (ІК); 2 — тварини, які зазнавали інгаляційного впливу ОА протягом 1 місяця по 16 годин на добу при середній концентрації ОА 150 mg/m^3 повітря (ОА); 3 — щурам перещеплювали суспензію клітин карциноми Герена ($2,2 \times 10^6$ клітин на тварину) (КГ); 4 — тварини, яким прищеплювали 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.

Відбирали зразки одразу після дії ОА, а також на 12-ту (КГ₁₂) та 18-ту (КГ₁₈) добу пухлинного росту. Зразки цільної крові для ЕПР-спектроскопії готували безпосередньо після взяття крові з використанням стандартної прес-форми, заморозували і зберігали у рідкому азоті. Вимірювання проводили на радіоспектрометрі PE-1307 (СРСР) у сантиметровому діапазоні хвиль за $T=77\text{K}$. Результати виражали у відносних одиницях, які характеризують інтенсивність ЕПР-сигналу. Методом ЕПР визначали вміст метГБ, ГБ-NO, ЦП та ТФ у цільній крові щурів [33]. Кількісне визначення нітрозотіолів у сироватці крові щурів проводили



Рисунок
Спектр ЕПР еритроцитів щурів контрольної групи порівняно з тваринами, що зазнали впливу ОА



шляхом флуориметричного визначення 2,3-нафтотріазолу, який утворюється при реакції окисленого 2,3-діамінонафталену з NO, що виділяється при розпаді S-NO зв'язку завдяки реакції з HgCl₂ [34]. Концентрацію нітрозотіолів визначали за різницею флуоресцентних сигналів (збудження 365 нм та флуоресценція 450 нм) за присутності чи відсутності 0,18 мМ HgCl₂ і виражали у нМ. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Ст'юдента [35].

Результати та їх обговорення. Тривале інгаляційне надходження до організму щурів значних концентрацій 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 з закисної форми на окисну, через що гемоглобін втрачає свою основну функцію з транспорту кисню. При цьому реєструється сигнал ЕПР з $g=6.0$. Внаслідок

реакції ОА з гемоглобіном утворюється також нітрозильний комплекс ГБ-NO ($g=2.03$). Спектр ЕПР еритроцитів крові щурів показано на рисунку. Порівняння контрольних зразків з еритроцитами щурів, що перебували в умовах тривалого інгаляційного впливу ОА, свідчить про утворення значної кількості метГБ та ГБ-NO (табл. 1).

Кров експериментальних тварин досліджували менш ніж за 2 год. після припинення впливу ОА, чим пояснюється надзвичайно високий рівень метГБ, який у 67,7 разів перевищував значення у контрольній групі. Вміст нітрозильних комплексів ГБ-NO у зразках цільної крові щурів за дії ОА зростає у 3,6 рази.

Концентрацію нітрозотіолів визначали у сироватці крові щурів після інгаляційної дії ОА, а також на різних етапах розвитку КГ (табл. 2). Показано, що певний рівень нітрозотіолів присутній у крові нормальних тварин. Однак у щурів, які протягом 1 місяця перебували в умовах постійного інгаляційного навантаження ОА, рівень ні-

трозотіолів у 9,5 разів перевищував його контрольний рівень, що свідчить про розвиток у тварин нітрозативного стресу.

Розвиток КГ на ранній стадії (12 діб) не впливав на вміст нітрозильних комплексів ГБ-NO та рівень метГБ у крові щурів у групах з дією ОА та без такої. Проте на пізньому етапі (18-та доба) розвитку пухлини спостерігалось статистично достовірне підвищення рівня метГБ в 1,8 рази і ГБ-NO у 1,5 рази порівняно з контролем і з групою КГ12 (табл. 1). Перещеплення та ріст КГ також супроводжувалися збільшенням концентрації нітрозотіолів у крові щурів в 1,7 рази на 12-ту добу та в 1,8 рази — на 18-ту добу розвитку пухлин (табл. 2).

Необхідно зазначити, що у тварин, які попередньо знаходились в умовах інгаляційного навантаження ОА, вміст метГБ і ГБ-NO був меншим, ніж у відповідних групах щурів без впливу ОА, особливо на пізньому етапі росту КГ. Так, на 18-ту добу розвитку пухлини рівень метГБ достовірно знижувався вдвічі порівняно з тваринами без впливу ОА. Протилежна тенденція спостерігалась з вмістом ГБ-NO та нітрозотіолів. Показано, що у процесі росту пухлини вміст ГБ-NO у крові щурів групи ОА+КГ на 18-ту добу в 1,3 рази перевищував аналогічний показник на 12-ту добу. Рівень нітрозотіолів у крові достовірно відрізнявся від значень у контрольній групі (у 2 та 2,5 рази на 12-ту та 18-ту добу росту КГ), а також на рівні тенденції від відповідних значень у щурів з КГ без впливу ОА.

Динаміка змін вмісту метГБ та ГБ-NO корелює зі змінами рівня ЦП та ТФ у крові дослідних тварин. Так, інгаляційне надходження ОА призвело до стрімкого зростання рівня ЦП у 6,2 рази, а рівня ТФ — у 7,4 разів у крові щурів. На ранньому

Таблиця 1

Рівні метГБ, ГБ-NO, ТФ та ЦП у цільній крові щурів за дії ОА та росту КГ

| Група | МетГБ | ГБ-NO | ТФ | ЦП |
|-----------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|
| ІК | 212.5±16.8 | 1150.0±102.3 | 325.0±50.0 | 200.0±28.9 |
| ОА | 14347.2*±1822.9 | 4140.6*±365.5 | 2416.7*±366.2 | 1234.9*±195.4 |
| КГ, 12 діб | 238.9±13.3 | 1115.6±86.6 | 340.6±39.8 | 206.3±18.1 |
| ОА + КГ, 12 діб | 243.8±77.3 | 955.0±83.8 | 793.8±130.7 | 245.0±12.2 |
| КГ, 18 діб | 371.4*±44.1 | 1720.7*±257.8 | 503.6±75.7 | 435.7*±73.2 |
| ОА + КГ, 18 діб | 185.0**±16.9 | 1231.3**±118.8 | 641.7±138.7 | 280.0**±48.9 |

Примітка: * — відмінності від ІК, $P \leq 0,05$; ** — відмінності від відповідної групи без дії ОА, $P \leq 0,05$.





етапі розвитку пухлини рівень ЦП та ТФ у крові не відрізнявся від контрольного. Однак на 18-ту добу росту КГ вміст ТФ в 1,6 рази, а ЦП у 2,2 рази статистично достовірно перевищував їхнє значення у контрольних щурів. Для пізнього етапу росту КГ характерним виявилось перевищення вмісту ТФ і ЦП в 1,5 і 2,1 рази порівняно з раннім етапом росту пухлини.

Слід зазначити, що розвиток пухлини в організмі тварин з попереднім впливом ОА по-різному впливав на вміст ТФ та ЦП. Так, рівень ЦП у 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-тою добою, однак був в 1,6 рази нижчим, ніж у групі КГ₁₈. Більш значні зміни характерні для вмісту ТФ у крові щурів, які попередньо знаходилися в умовах інгаляційного навантаження ОА. Так, на 12-ту добу росту КГ рівень ТФ у 2,4 рази перевищував його значення у групах ІК та КГ₁₂. Вміст ТФ залишався значно підвищеним (у 2 рази) і на 18-ту добу росту пухлини порівняно з ІК, однак він виявився на 20% нижчим за його рівень на ранньому етапі росту КГ.

Таким чином, інгаляційне надходження екзогенних ОА до організму призводить до утворення комплексів з гемоглобіном, альбуміном та іншими залізо- та SH-вмісними білками і сполуками. Оскільки утворення комплексів ГБ-NO відбувається одночасно з окисненням гемоглобіну до метГБ, то за високих рівнів 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 насамперед з ним. За взаємодії іонів NO₂⁻ з дезоксигемоглобіном відбувається окисно-відновна реакція, у ході якої дезоксигемоглобін окислюється до метГБ, а NO₂⁻ відновлюється до NO: $Hb^{2+} + NO_2^- + 2H^+ > метГБ + NO + H_2O$. Взаємодіючи з відновленим гемоглобіном, NO утворює стабільні ГБ-NO комплекси. Завдяки зворотному 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 вивільнитися [3, 4]. Нами було показано, що тривале інгаляційне надходження значних концентрацій екзогенних ОА супроводжувалося розвитком в організмі щурів нітрозативного стресу, який проявлявся в утворенні великої кількості метГБ, нітрозильних комплексів гемоглобіну та у підвищенні рівня нітрозотіолів у крові тварин. Особливий інтерес викликало утворення комплексів ГБ-NO та нітрозотіолів, зважаючи на можливість зворотного вивільнення NO. Як і очікувалось, утворення цих сполук у крові щурів було найвищим одразу після дії ОА, після чого їх вміст зменшувався і на 12-ту добу майже не відрізнявся від контролю. Достовірно підвищення рівня ГБ-NO та нітрозотіолів також спостерігалося в організмі щурів на пізніх етапах росту КГ. Найбільш характерні зміни стосувалися рівня нітрозотіолів у тварин з КГ, що попередньо зазнали дії ОА. Однак малоімовірно, щоб це відбувалося за рахунок екзогенних ОА, оскільки від закінчення інгаляції до часу проведення дослідження минуло 12 або 18 діб. Найбільш ймовірними є зміни в ендogenous продукуванні NO, які виникли через вплив на організм щурів екзогенних ОА та пухлинний процес. Це підтверджується даними наших попередніх досліджень, в яких виявлено гіперактивацію функціональної активності МФ на пізньому етапі росту КГ у тварин, що попередньо знаходилися в умовах інгаляційного навантаження ОА [36].

Виявлені зміни рівня метГБ, ГБ-NO і нітрозотіолів корелюють зі змінами рівня ТФ і ЦП у

Таблиця 2
Рівень нітрозотіолів у сироватці крові щурів за інгаляційного надходження ОА та пухлинного росту

| Група | Концентрація нітрозотіолів (нМ) |
|---------------|---------------------------------|
| ІК | 410,5 + 40,5 |
| ОА | 3892,3 + 256,3 |
| КГ, 12 діб | 690,3 + 86,9 |
| ОА+КГ, 12 діб | 810,2 + 103,1 |
| КГ, 18 діб | 748,3 + 63,9 |
| ОА+КГ, 18 діб | 1025,7 + 92,5 |

крові дослідних тварин. Так, тривала інгаляційна дія ОА призвела до зростання рівня ТФ більш ніж у 7 разів. Таке значне зростання рівня ТФ у крові дослідних тварин може бути зв'язаним з підсиленням обміну заліза як компенсаторної реакції у відповідь на порушення, спричинені тривалою дією ОА, особливо у тварин з КГ. Відомо, що екзогенний NO з високою спорідненістю може взаємодіяти з залізом гемової і негемової природи, міцно зв'язуючись з гемовим залізом (III) і відновлюючи його до гемового заліза (II). Зв'язування NO з гемовим і негемовим залізом переважно призводить до інгібування активності залізовмісних ферментів. Гальмівна дія пояснюється його здатністю відновлювати фериформу фермента до неактивної фериформи, конкуренцією з ендogenous або екзогенними лігандами за зв'язування з залізом і здатністю NO виступати у ролі перехоплювача супероксидного радикала з утворенням пероксинітриду [37].

Надзвичайно важливою є роль ЦП, який виступає в якості головного зовнішньоклітинного антиоксиданту, механізм дії якого відрізняється від природних та синтетичних антиоксидантів. Значне підвищення його вмісту (у 6 разів) у крові тварин після дії ОА характеризує реакцію на нітрозативний стрес, прояв якого є значним порушенням вільнорадикального гомеостазу в організмі щурів. Відомо, що фероксидазна активність ЦП дозволяє йому пригнічувати стимульоване іонами Fe²⁺ формування гідроксил радикалу (-OH) з H₂O, а також процеси перекисного окислення ліпідів, що у результаті зменшує утворення активних форм кисню. Крім того, ЦП здатен напряду змінювати взаємодію гідроксил-радикалу з амінокислотними залишками, де він може конкурувати з ОА [38]. Вміст ЦП також підвищувався в організмі тварин з перещепленою КГ, особливо на пізньому етапі росту пухлини. Однак у тварин, що зазнали інгаляційного навантаження ОА, вміст ЦП знижувався на 60% на 18-ту добу росту КГ, що свідчить про зниження антиоксидного захисту організму і корелює з посиленням росту КГ [36].



Таким чином, зареєстровано зміни вмісту нітрозильних комплексів, ТФ і ЦП у крові щурів, що характеризують вплив екзогенних ОА на організм у нормі та при пухлинному рості. Інгаляційне надходження ОА призводить до значного зростання рівня ГБ-NO, МетГБ і нітрозотіолів у крові, що сприяє розвитку нітрозативного стресу в організмі тварин. Циркуляція підвищеної кількості нітрозильних комплексів гемоглобіну, а також високо- та низькомолекулярних нітрозотіолів супроводжується порушенням вільнорадикального гомеостазу не тільки шляхом посилення вільнорадикальних реакцій, а і завдяки впливу на ключові елементи антиоксидантної системи крові, що виражається, зокрема, у зменшенні вмісту ЦП. Крім того, екзогенні ОА впливають на процеси, пов'язані з продукцією ендогенного NO, шляхом гіперактивації макрофагів та зростання вмісту нітрозотіолів, особливо у тварин з прогресуючим пухлинним процесом в організмі. Зазначені зміни корелюють з прискоренням росту пухлин [36].

ЛІТЕРАТУРА

1. Огляд результативності природоохоронної діяльності. Україна. — Нью-Йорк, Женева, 2000. — 232 с.
2. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide / R. Marley, R.P. Patel, N. Orié [et al.] // *Free radical biology & medicine* — 2001. — Vol. 31, № 5. — P. 688-696.
3. 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.
4. Ванін А.Ф. Оксид азота — регулятор клеточного метаболизма / А.Ф. Ванін // *Соросовский образовательный журнал*. — 2001. — Т. 7, № 11. — С. 7-12.
5. Jourd'heuil D. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism / D. Jourd'heuil, F.L. Jourd'heuil, M. Feilsch // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2003. — Vol. 278, № 18. — P. 15720-15726.
6. Yang Y. S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells / Y. Yang, J. Loscalzo // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 2005. — Vol. 102, № 1. — P. 117-122.
7. Stuart-Smith K. Demystified nitric oxide / K. Stuart-Smith // *Molecular Pathology*. — 2002. — Vol. 55. — P. 360-366.
8. Marletta M.A. Catalysis by nitric oxide synthase / M.A. Marletta, A.R. Hurshman, K.M. Rusche // *Current Opinion in Chemical Biology*. — 1998. — Vol. 2. — P. 656-663.
9. Ванін А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований / А.Ф. Ванін // *Биохимия*. — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 867-869.
10. The toxicology of inhaled nitric oxide / B. Weinberger, D.L. Laskin, D.E. Heck, J.D. Laskin // *Toxicological Sciences*. — 2001. — Vol. 59. — P. 5-6.
11. Ma X.L. Exogenous NO inhibits basal NO release from vascular endothelium in vitro and in vivo / X.L. Ma, B.L. Lopez, T.A. Christopher // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* — 1996. — Vol. 271. — P. 2045-2051.
12. Значение химических свойств оксида азота для лечения онкологических заболеваний / Д.А. Винк, И. Водовоз, Дж. А. Кук [и др.] // *Биохимия*. — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 948-957.
13. 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 [et al.] // *Biology of Reproduction*. — 2006. — Vol. 74. — P. 375-382.
14. Nitric oxide dissociates lipid oxidation from apoptosis and phosphatidylserine externalization during oxidative stress / J.P. Fabisiac, V.A. Tyurin [et al.] // *Biochemistry*. — 2000. — Vol. 39, № 1. — P. 127-138.
15. 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.
16. Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of the rabbit lung / H. Yamashita, S. Akamine, Y. Sumida [et al.] // *The Annals of Thoracic Surgery* — 2004. — Vol. 78. — P. 292-297.
17. Exogenous nitric oxide enhances neutrophil cell death and DNA fragmentation / J.D. Fortenberry, M.L. Owens, M.R. Brown [et al.] // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. — 1998. — Vol. 18, № 3. — P. 421-428.
18. 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.
19. Shen Y.H. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways / Y.H. Shen, X.L. Wang, D.L. Wilcken // *FEBS Letters*. — 1998. — Vol. 433. — P. 125-131.
20. Brune B. Nitric oxide and its role in apoptosis / B. Brune, A. Knethen, K.B. Sandau // *European Journal of Pharmacology*. — 1998. — Vol. 351. — P. 261-272.
21. Tidball J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair / J. G. Tidball // *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* — 2005. — Vol. 288, № 2. — P. 345-353.
22. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation / Y.V. L. Molina, B. McDonald, B. Reep [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1992. — Vol. 267. — P. 24929-24943.
23. Herold S. Reactions of deoxy-, oxy-, and methemoglobin with nitrogen monoxide. Mechanistic studies of the S-nitrosothiol formation under different mixing conditions / S. Herold, G. Rock // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2003. — Vol. 278, № 9. — P. 6623-6634.
24. Gow A.J. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions / A.J. Gow, J.S. Stamler // *Nature*. — 1998. — Vol. 391 (6663). — P. 169-173.
25. Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis / E. Felley-Bosco // *Cancer Metastasis Reviews*. — 1998. — Vol. 17, № 1. — P. 25-37.
26. 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.] // *Mutation Research*. — 2000. — Vol. 466, № 2. — P. 187-195.



27. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control / L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura [et al.] // Nature. — 1996. — Vol. 380 (6571). — P. 221-226.

28. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А.]. — К.: Авіценна, 2002. — 156 с.

29. Вода питьевая: ГОСТ 24481-80. — [Действительный от 1980-12-29].

30. Роома М.Я. О применении кадмиевой колонки для определения нитратов в моче // Канцерогенные N-нитрозосоединения и их предшественники — образование и определение в окружающей среде / М.Я. Роома, Э.М. Канн, К. Веттиг. — Таллин, 1984. — С. 210-212.

31. Карякин Ю.В. Чистые химические вещества / Ю.В. Карякин, И.И. Ангелов. — М.: Химия, 1974. — 407 с.

32. Fine D.H. Analysis of volatile N-nitroso compounds by combined gas chromatography and thermal energy analysis // Environmental N-nitroso compounds, analysis and formation / D.H. Fine, D.P. Rounbehler. — IARC Scientific Publications, 1976. — P. 117-127.

33. Ажипа Я.И. Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса / Я.И. Ажипа. — М.: Наука, 1983. — 527 с.

34. Kostka P. Fluorometric detection of S-Nitrosothiols / P. Kostka, J.K.J. Park // Methods in Enzymology. — 1999. — Vol. 301. — P. 227-235.

35. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.

36. Effect of environmental nitric oxides on the antitumor resistance of rats / V.M. Mikhailenko, Z.D. Savtsova [et al.] // Experimental Oncology. — 2005. — Vol. 27, № 1. — P. 65-70.

37. Сидорик Е.П. Молекулярные механизмы нарушений в клетках при хроническом действии ионизирующего излучения низкой мощности дозы в связи с аварией на ЧАЭС / Е.П. Сидорик, А.П. Бурлака // Экспериментальная онкология. — 2000. — Т. 22, № 4. — С. 179-185.

38. Direct evidence of ceruloplasmin antioxidant properties / R.L. Atansi, D. Stea, M.A. Mateescu [et al.] // Molecular and Cellular Biochemistry. — 1998. — Vol. 189. — P. 127-135.

Надійшла до редакції 19.03.2010.

Автор висловлює подяку канд. фіз. наук Головіній І.М., ст. наук співр. Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України за допомогу при реєстрації спектрів ЕПР.

FOR THE ISSUE OF THE APPLICATION OF SYSTEM APPROACH TO THE STANDARTIZATION OF CHEMICAL AIR POLLUTANTS

Korshun M.N.

К ВОПРОСУ ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМНОГО ПОДХОДА К НОРМИРОВАНИЮ ХИМИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ВОЗДУШНОЙ СРЕДЫ



КОРШУН М.Н.

Комитет по вопросам гигиенического регламентирования МЗ Украины, г. Киев

Огласно п.1.7 Методических указаний [1] "вихідним положенням системного підходу є орієнтація на незалежне регламентування ксенобіотиків у різних середовищах на методологічно єдиній токсикологічній основі". Развивая содержание этого пункта, в следующем записано, что "сутьность системного підходу до гігієнічного нормування ксенобіотиків полягає у визнанні взаємозв'язку і взаємозумовленості чисельних значень усіх нормативів конкретної речовини у різних середовищах як за звичайних, так і за екстремальних умов праці і стану довкілля. Усі "звичайні" нормативи для даної речовини розглядаються як система взаємозв'язаних величин з обумовленими кількісними співвідношеннями між ними" (вопросы нормативних границ аварийного загрязнення находятся вне данной публикации). К числу теоретических основ системного похода (п.1.10 [1]) разработчики отнесли следующее положение: "Істотні відхилення вперше запропонованих або чинних нормативів окремих речовин від належних (типових) співвідношень є підставою для прове-

ДО ПИТАННЯ ПРО ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМНОГО ПІДХОДУ ДО НОРМУВАННЯ ХІМІЧНИХ ЗАБРУДНЮВАЧІВ ПОВІТРЯ

Коршун М.М.

У статті розглянуто можливість використання системного підходу для удосконалення санітарного законодавства у галузі забезпечення хімічної безпеки, зокрема визначення речовин, гігієнічні нормативи яких у повітрі потребують корекції, оскільки не задовольняють вимогам принципу системності.

Підкреслюється, що принцип системності не протирічить вітчизняному досвіду та відповідає міжнародній практиці регламентаційних рішень у галузі гігієнічного нормування шкідливих речовин.

Ключові слова: системність, гігієнічне нормування, шкідливі речовини.

© Коршун М.Н. СТАТТЯ, 2010.

