

Влияние донатора NO нитрозотиола глутатиона на уровень окислов азота и малонового диальдегида в крови крыс

Л.Ю.Каминская, А.А.Жлоба, Л.А.Александрова, О.М.Моисеева, В.Л.Эмануэль, Е.В.Шляхто
Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова;
Институт кардиологии им. акад. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург

Резюме. Оксид азота (NO) представляет собой парамагнитную молекулу, т.е. свободный радикал, и при неблагоприятных условиях метаболизма способен вызвать, так называемый нитрозилирующий стресс. В работе проведено изучение нарастания продукта ПОЛ малонового диальдегида методом ВЭЖХ-анализа при введении экспериментальным крысам донора NO нитрозоглутатиона. Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent-1100 ("Agilent Technologies", Германия). Эффект нитрозоглутатиона сравнивали с влиянием вводимой животным смеси нитрилоацетата железа с гомоцистином в качестве прооксиданта. Под влиянием экспериментального оксидативного стресса после введения нитрилоацетата железа с гомоцистином (40 мкмоль/кг по содержанию железа) содержание малонового диальдегида в сыворотке крови крыс возрастало примерно в 20 раз по сравнению с этим показателем в контрольной группе животных. При нитрозотиоловом оксидативном статусе (после введения нитрозоглутатиона в дозе 200 мкмоль/кг) у крыс выявлена активация образования малонового диальдегида в 4 раза. Сделан вывод о том, что доноры NO способны вызывать оксидативный стресс. При использовании доноров NO в длительной терапии необходимо контролировать оксидативный статус организма.

Effect of the NO donor nitrosothiol glutathione on the rat blood levels of nitric oxides and malonic dialdehyde
L.Yu. Kaminskaya, A.A. Zhloba, L.A. Aleksandrova, O.M. Moiseyeva, V.L. Emanuel, Ye.V. Shlyakhto

Summary. Nitric oxide (NO) is a paramagnetic molecule, i.e. a free radical, and, under poor metabolic conditions, can induce the so-called nitrosylating stress. HPLC was used to study an increase of the lipid peroxidation (LPO) product malonic dialdehyde when the NO donor nitrosogluthathione was administered to experimental rats. Chromatographic analysis was made on an Agilent-1100 liquid chromatograph (Agilent Technologies, Germany). The effect of nitrosogluthathione was compared with that of a mixture of ferrous nitrile acetate and homocystine given to the animals as a prooxidant. Under experimental oxidative stress after administration of ferrous nitrile and homocystine (40 mkmmole/kg, calculated with reference to iron), the rat blood serum level of malonic dialdehyde increased by approximately 20 times as compared to that in the control group of animals. Four-fold activation of malonic dialdehyde formation was revealed in rats under nitrosothiol oxidation (after administration of nitrosogluthathione in a dose of 200 mkmmole/kg). It is concluded that NO donors are able to induce oxidative stress. When NO donors are used in long-term therapy, it is necessary to control the body's oxidative status.

Принятые сокращения

МДА – малоновый диальдегид
ПОЛ – перекисное окисление липидов
АФК – активные формы кислорода, термин шире, чем СР, так как включает кроме радикалов перекись водорода, синглетный кислород, гипохлориты, гидроперекиси
РАВ – реактивные азотистые вещества (пероксинитрит ONOO⁻, нитрозоний NO⁺, нитроксил NO[•])
СОД – супероксиддисмутаза
°С – температура в градусах Цельсия
O² – супероксиданион
NO или NO[•] – монооксид азота, оксид азота, в отличие от высших окислов азота, обнаруживаемых в организме в виде анионов NO₂⁻ и NO₃⁻, имеет важное физиологическое значение в качестве аллостерического модулятора гуанилатциклазы
ONOO⁻ – пероксинитрит
RSH – тиоловые соединения
RSNO – нитрозотиолы

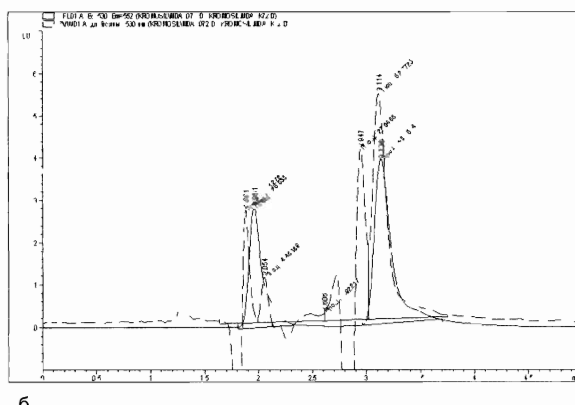
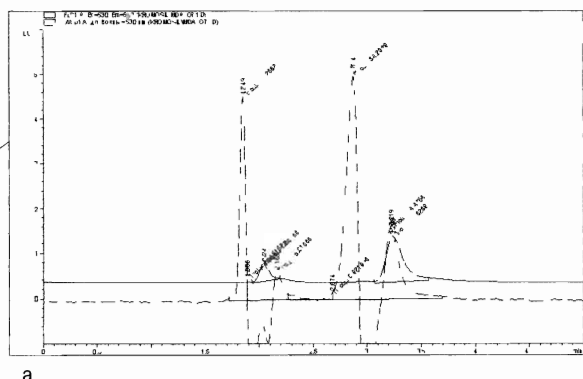
Под влиянием оксида азота (NO) наблюдается окисление тиолов с образованием нитрозотиолов [1–4]. В плазме крови обнаруживаются нитрозотиолы цистеина, альбумина, а в клетках – нитрозотиолы глутатиона, цистенилглицина, различных белков, включая очень важные для регуляции пролиферативной активности клеток и их апоптоза [5]. NO – свободный радикал, вызывающий эндотелийзависимую вазодилатацию (другое название – эндотелиальный фактор релаксации), ингибирующий агрегацию тромбоцитов, адгезию лейкоцитов к эндотелию и пролиферацию гладкомышечных клеток сосудистой стенки [6, 7]. Другие гладкомышечные клетки, например бронхимальные, также чувствительны к NO. NO после конъюгации с супероксиданионом направляется по различным путям преобразования пероксинитрита, включая нитрование белков, образование нитрозотиолов, в том числе нитрозотиолов гомоцистеина. Часть этих продуктов приводит

к усилению оксидативного стресса и свертываемости крови, тромбообразованию. В условиях нарастающего оксидативного стресса за счет генерации активных форм кислорода чаще наблюдается снижение активности эндотелиальной NO-синтазы и глутатион-пероксидаз [8]. Это вызывает оправданное стремление использовать доноры NO в терапевтических целях при недостаточной выработке данного медиатора эндотелиальными клетками. Однако это не всегда представляется целесообразным, в связи хотя бы с тем, что субэндотелиальные макрофаги также являются источником значительных количеств NO. Кроме того, сам NO представляет парамагнитную молекулу, т.е. свободный радикал, и при неблагоприятных условиях метаболизма способен вызвать так называемый нитрозилирующий стресс.

Экзогенные донаторы NO, исключая субстрат NO-синтазы, аминокислоту аргинин, высвобождают NO, по-видимому, без участия специально синтезируемых ферментов. К подобным донорам NO относятся такие лекарственные препараты, как нитросорбит, эринит и нитроглицерин, а также нитропруссид натрия, известные в фармакологии как нитраты, нитриты, к которым относятся амилнитрит, соли азотистой кислоты – NO₂⁻. Эти вещества с участием эндогенных окислительно-восстановительных систем способны генерировать монооксид азота (NO). Монооксид азота накапливается в виде нитрозотиолов, транспортируется и взаимодействует с молекулами-мишенями, в частности гемовыми белками [9]. К нитрозотиолам относятся нитрозоглутатион, нитрозоцистеин, нитрозо-S34-альбумин, S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин и др. Из нитрозотиолов самым лучшим, с точки зрения малой токсичности, является S-нитрозоглутатион.

Одной из основных целей данной работы было изучение нарастания продукта ПОЛ малонового диальдегида при введении донора NO нитрозоглутатиона экспериментальным животным.

Рис. 1. ВЭЖХ-анализ ТБК-активных продуктов в образце плазмы крови с использованием спектрофотометрического и флуориметрического детектирования на колонке Kromasil KR100 3,5–С8 4,6 × 100 мм, подвижная фаза – буфер 0,1М калий фосфатный, pH 3,75 с ацетонитрилом в объемном соотношении 8:2, скорость элюции 0,8 мл/мин, температура в колоночном отделении 25°C. Нанесено 10 мкл образца. а – на колонку нанесен стандартный образец 7,6 мкМ МДА, б – дериват плазмы крови. Сплошная линия – данные флуоресценции элюата, возбуждение при 530 нм, испускание при 552 нм, пунктирная – светопоглощение в Миллиединицах абсорбции при длине волны 530 нм.



Материалы и методы

Опыты проведены на крысах-самцах линии Вистар 250–330 г. Животных получали из селекционной станции Рапполово (Санкт-Петербург). Крыс размещали по 8 особей в стандартных клетках, и животные привыкали к условиям лаборатории в течение минимум 1 нед – неограниченный доступ к пище (гранулированный корм) и воде в виварии с температурой $22 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажностью 60%.

Подвижность животного ограничивали и соответствующий раствор вводили в течение 2–3 мин. Животным контрольной группы вводили изотонический раствор NaCl в том же объеме. Количество животных в группе менее 8 объясняется отбраковыванием при неудовлетворительном заборе материала. В каждой серии для каждой дозы использованы также по 2 резервных животных. Для анализа ВЭЖХ-методом включали материал 8 животных. Всего в экспериментах использовали 164 животных. Из них отбраковано 12.

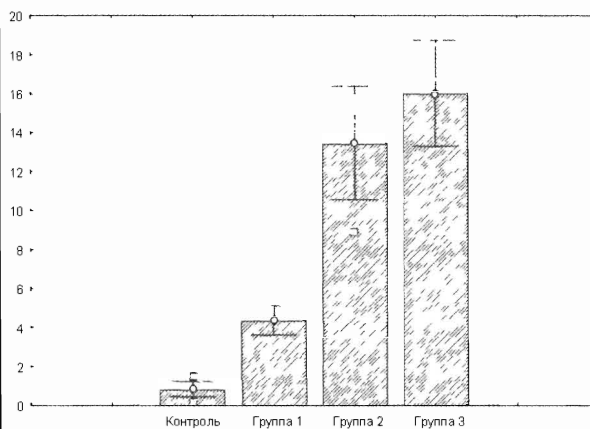
По истечении времени экспозиции введенной дозы животных обезбуживали приемом дислокации и после декапитации забирали материал на анализ. Спустя 30 мин после забора крови производили центрифугирование при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Сыворотку крови отбирали, помещали в пластиковые пробирки и хранили при $t = -20^\circ\text{C}$ до процедуры пробоподготовки.

Животным в проведенных экспериментах вводили прооксидант и нитрозоглутатион.

Оборудование и реактивы. Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent-1100 ("Agilent Technologies", Германия). Анализ образцов осуществляли с помощью VWD-спектрофотометрического и флуоресцентного детекторов. Для хроматографического разделения использовали колонку Kromasil KR100 3,5–С8 4,6 × 100 мм (4,6 × 150 мм). Все реагенты, которые использовались в экспериментальной работе, были особо чистые (ОСЧ) и химически чистые (ХЧ). Для приготовления подвижных фаз использовались ацетонитрил ОСЧ сорт 0 (НПК "Криохром", Россия), гидрат окиси калия ("Сигма", США), фосфорная кислота с концентрацией 87% (Россия).

Прооксидант представлял собой смесь нитрилтриацетата железа и гомоцистина (дисульфидная форма аминокислоты). Нитрилтриацетат железа готовят из ди-натриевой соли нитрилтриуксусной кислоты (Sigma, Chemical Co, St Louis MO USA) в количестве 94 мг и железно-аммониевой соли лимонной кислоты в количестве 40 мг. Навески растворяют в 10 мл 5 мМ раствора гомоцистина на 1% альбумине и получают раствор прооксиданта с конечной концентрацией 20 мМ по иону железа.

Рис. 2. Влияние прооксиданта в дозах 10 (группа 1), 20 (группа 2) и 40 мкмоль (группа 3) по содержанию железа на 1 кг массы тела на содержание МДА в сыворотке крови крыс.



Достоверность различий в уровне МДА группы 1 к контрольной, $p = 1,14365 \times 10^{-6}$, Достоверность различий в уровне МДА второй и первой группы, $p = 1,22208 \times 10^{-5}$, Достоверность различий в уровне МДА группы 3 и 2, $p = 0,003162$.

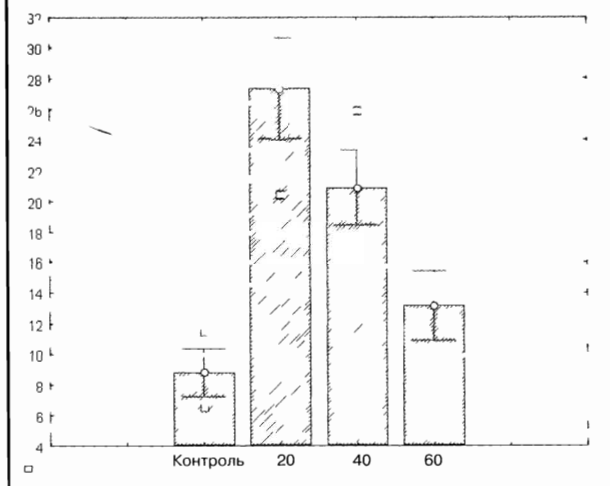
При анализе накопления ТБК-активных продуктов и МДА у экспериментальных крыс под влиянием увеличения дозы прооксиданта показано, что уровень МДА в первой группе нарастает по сравнению с контролем более чем в 2,5 раза и в группе 2 по сравнению с группой 1 более чем в 3 раза, тогда как при дальнейшем значительном повышении дозы прооксиданта – только на 18%.

Животные получали препарат, обозначенный нами как прооксидант, в 3 дозах однократно: 0,5; 1 и 2 мл на 1 кг массы тела животного.

Для синтеза нитрозоглутатиона использовали коммерческий препарат глутатиона восстановленного и нитрит натрия (NaNO_2) [4]. На ледяной бане смешивали по 2,2 мл эквимольные растворы (220 мМ) глутатиона восстановленного и нитрита натрия. При постоянном перемешивании постепенно приливали 250 мкл 4,0 М HCl. Смесь инкубировали при 4°C в темноте в течение 40 мин и нейтрализовали, добавляя 250 мкл 4,0 М NaOH. Кристаллический нитрозоглутатион получали осаждением ацетоном на холоду. Высушенные кристаллы использовали для приготовления рабочих растворов нитрозоглутатиона.

Конечную концентрацию нитрозотиола глутатиона определяли, используя коэффициент молярной экстинкции $767 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при измерении светопоглощения

Рис 3. Влияние парентерального введения нитрозоглутатиона в дозе 200 мкмоль на 1 кг массы тела на суммарное содержание окислов азота в сыворотке крови крыс контрольной группы и через 20, 40 и 60 мин после введения препарата.



при длине волны 334 нм. Для экспериментов использовали раствор в концентрации 1,0–0,1 мМ. Окислы азота определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса, как описано ранее [10].

Для специфического выявления МДА вместо ТБК-активных продуктов использовали следующую модификацию метода анализа по образованию флуоресцентных продуктов МДА и тиобарбитуровой кислоты [11]. К 350 мкл 1 мМ KH_2PO_4 pH 3,0 добавляли 5 мкл 20 мМ глутатиона, восстановленного и 5 мкл бутанола. После перемешивания вносили 50 мкл исследуемого образца. Перемешивали и добавляли 6 г/л тиобарбитуровую кислоту в количестве 100 мкл, перемешивали повторно. Образцы плотно закрывали пробками и выдерживали 45 мин при 93°C. После инкубации пробы охлаждали в ледяной бане 10 мин и центрифугировали при 4500 g 7 мин. Супернатант фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм. После этого пробы вносили в хроматографическую систему.

Как показано на рис. 1, содержание МДА-производных ТБК (t_R от 3,15 до 3,25 мин) в составе ТБК-активных продуктов, определенных спектрофотометрическим методом, МДА составляет менее 50%. Большая часть ТБК-активных продуктов не выявляется по флуоресценции, характерной для ТБК-производных МДА.

В составе ТБК-активных продуктов помимо производных МДА имеются дополнительные дериваты. На это указывают данные других авторов [12], которые обнаруживают среди ТБК-активных продуктов наряду с пероксидами липидов ацетилнейраминую кислоту и билирубин.

Статистическая обработка результатов экспериментов проведена непарным t-тестом Стьюдента. Различия признавали достоверными при $p < 0,05$. Результаты обработки представляли как стандартные ошибки (SE) или стандартные отклонения (SD). Для получения указанных статистических параметров использовали Statsoft® Statistica версия 6 и Microsoft® Excel 2002.

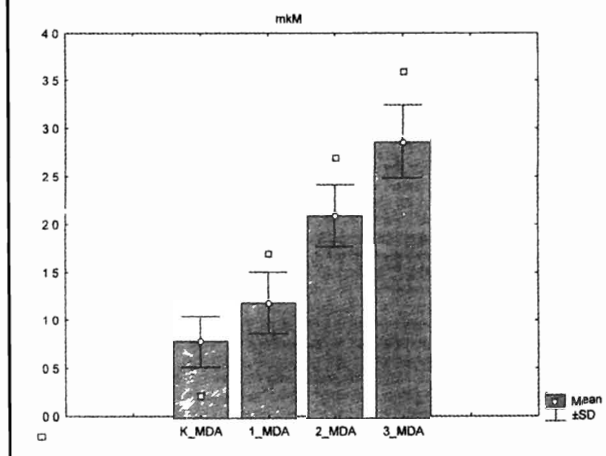
Результаты исследования

Под влиянием прооксиданта в образцах сыворотки крови экспериментальных крыс обнаруживается нарастание уровня МДА (рис. 2).

После однократного введения нитрозоглутатиона окислы азота в сыворотке крови крыс постепенно снижаются от 20 до 40 мин (рис. 3).

При анализе гидролизатов белков сыворотки крови крыс полученных и проанализированных спустя 40 мин после введения нитрозоглутатиона обнаруживается фракция нитротирозина с характерным поглощением

Рис. 4. Влияние парентерального введения нитрозоглутатиона (в дозе 200 мкмоль/кг) на содержание МДА в сыворотке крови крыс контрольной группы и через 20, 40 и 60 мин после введения препарата.

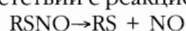


ем при 420–430 нм в слабощелочной (pH 8,0) и 360–380 нм в слабокислой (pH 4,5) среде. Максимальные пики абсорбции относились к образцам, полученным через 40 мин после введения нитрозотиола глутатиона.

Накопление продукта ПОЛ МДА под влиянием нитрозотиола глутатиона развивается постепенно в течение 60 мин после введения препарата (рис. 4). Под влиянием увеличения доноров NO не наблюдается выраженного оксидативного стресса по уровню продукта ПОЛ – МДА. Интересно отметить, что максимальный уровень окислов азота в крови выявляется сразу через 20 мин после введения препарата, возрастая примерно в 3 раза по сравнению с их уровнем в сыворотке интактных животных, а уровень МДА поднимается от 0,7 до, примерно, 2,8 мкмМ постепенно в течение всего периода наблюдения. В отличие от других моделей экспериментального оксидативного стресса при нитрозотиоловом оксидативном статусе не выявлено значительной активации ПОЛ у крыс, находящихся на обычной диете.

Обсуждение

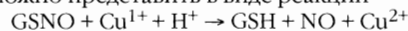
Механизмы воздействия нитрозотиолов при парентеральном введении связаны с их прямым вкладом в общий пул NO. Нитрозотиолы высвобождают NO в соответствии с реакцией



В этой реакции способен также образовываться тильный радикал. Эта реакция в физиологических ситуациях протекает достаточно интенсивно только при поглощении световой энергии или других видов излучения, в особенности в присутствии ионов переходных металлов. Реакции транснаитрозилирования, протекающие в присутствии переходных металлов, в том числе ионов меди, приводят к образованию дисульфидов, например глутатиона:



Во внутренних средах организма высвобождение NO можно представить в виде реакции



Окисленные ионы меди подвергаются восстановлению за счет эндогенных аминотиолов или аскорбата:



В присутствии ионов меди или железа происходит генерация NO из нитрозотиолов и окисление тиоловых групп. Исходя из того, что эти ионы с переменной валентностью в свободном состоянии во внутренней среде практически отсутствуют, в настоящее время интенсивно изучаются белки, их содержащие [18]. Функции церулоплазмينا, СОД и других медьсодержащих белков в регенерации NO изучены недостаточно.

При интерпретации летальных воздействий со стороны тех или иных метаболитов и регуляторов клеточных