

П. А. Каліман, О. В. Павиченко

Індукція гем-оксигенази в серці та судинах і пероксидна резистентність еритроцитів щурів за умов розвитку гемолітичної анемії

Установлено, що розвиток гемолітичної анемії, викликаній введенням крысам фенілгідразина (7 мг/100 г), обуславлюється зниженням содержания восстановленного глутатиона и каталазной активности в эритроцитах и увеличением степени гемолиза этих клеток в кровяном русле. Показано повышение гемоксигеназной активности и содержания ТБК-активных продуктов в сердце и сосудах крыс через 24 ч после введения фенілгідразина. Обсуждаются возможные механизмы индукции гемоксигеназы-1 в условиях гипоксии в ответ на развитие гемолітической анеміи и ее роль в защите клеток от повреждения.

ВСТУП

Гем-оксигеназа – ГО – (КФ 1.14.99.3) каталізує ключову реакцію катаболізму гему за допомогою розщеплення порфіринового кільця з утворенням монооксиду вуглецю (СО), Fe^{2+} і білівердину IX α . Останній в білівердинредуктазній реакції відновлюється за участю НАДФН до білірубіну. Всі продукти реакції мають високу біологічну активність: білірубін проявляє антиоксидантні властивості [20], СО відіграє важливу роль у регуляторних процесах, в тому числі й тих, що реалізуються через активацію гуанілатциклази [22, 25, 32], а іони заліза здатні активувати транскрипцію деяких генів, у тому числі феритину та синтази оксиду нітрогену [9, 11].

Останнім часом досліджено три ізоформи ГО, що є продуктами різних генів: ГО-2 і ГО-3 – конститутивні форми, а ГО-1 – індукцибельний ізофермент [18], активність якого підвищується при дії на організм чи клітини пошкоджувальних чинників, у тому числі таких, що спричиняють розвиток гемолітичної анемії та оксидативного стресу [8, 30].

ГО-1 розглядається як стресорний білок, причому встановлено, що його індукція забезпечує захист клітин від пошкодження при оксидативному стресі [8, 28], бере участь у формуванні захисних реакцій за різних патологічних станів, у тому числі й захворювань серцево-судинної системи [14, 17].

Відомо, що введення фенілгідразину (ФГ) є класичною моделлю розвитку гемолітичної анемії. Раніше нами було показано, що введення щурам ФГ [3], супроводжується розвитком оксидативного стресу й індукцією ГО в печінці та селезінці, але активність цього ферменту в серці і судинах за цих умов не досліджувалася. Крім того, дані літератури щодо механізмів гемолітичної дії ФГ залишаються суперечливими [12, 26, 27].

Мета цієї роботи – вивчення динаміки активності ГО в серці та судинах щурів, а також дослідження пероксидної резистентності еритроцитів щурів і деяких показників антиоксидантної системи цих клітин за умов розвитку гемолітичної анемії, що спричинена введенням тваринам ФГ.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах лінії Вістар масою 200–250 г. Анемію моделювали [6] внутрішньоочеревинним введенням ФГ (7 мг/100 г). Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом через 0,5, 2, 6 та 24 год після ін'єкції. Кров збирали в склянку з 4%-м розчином цитрату натрію для отримання еритроцитів і, окремо, для отримання сироватки. Еритроцити відмивали охолодженим фізіологічним розчином на тріс-НСІ-буфері (0,01 моль/л, рН 7,4), у разі повторного центрифугуванні при 4 °С. Для отримання сироватки кров центрифугували 20 хв при 3000 хв⁻¹. Для визначення вмісту гемоглобіну кров брали з хвостової вени. Серце та судини перфузували холодним фізіологічним розчином *in situ* та гомогенізували з 0,1 моль/л фосфатним буфером (рН 7,45) на холоді.

За розвитком анемії спостерігали за накопиченням у сироватці крові гемовмісних продуктів і концентрації гемоглобіну в крові щурів, яку визначали гемоглобінціанідним методом за допомогою стандартного набору фірми “Lachema” (Чехія). Вміст відновленого глутатіону в еритроцитах визначали спектрофотометрично за кількістю утвореного комплексу з алоксаном [5]. Каталазну активність в еритроцитах визначали спектрофотометрично за кількістю зниження вмісту пероксиду водню [2]. Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу та глутатіонредуктазу активність в еритроцитах досліджували спектрофо-

тометрично за вмістом утвореного [10] та зниженого [4] НАДФН відповідно. Пероксидну резистентність еритроцитів (рівень спонтанного гемолізу) визначали за методом Ягера [15], вміст загального гемму в сироватці крові – піридингемохромним методом (у 1 л сироватки) [29]. Вміст МДА в сироватці крові, гомогенатах серця та судин вивчали за вмістом утворених ТБК-активних продуктів. Гемоксигеназну активність в гомогенатах серця та судин визначали методом двопрменевої спектрофотометрії за вмістом утвореного білірубину [19]. З метою вивчення можливого пошкодження серцевого м'яза за допомогою стандартних наборів фірм “Біокон” (Росія) та “Lachema” (Чехія) визначали аспаратамінотрансферазну (АсАТ) і креатинфосфокіназну (КФК) активність. Вміст білка визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера [21]. Оцінку значимості розходжень між групами одержаних результатів проводили за допомогою методу непараметричної статистики з використанням критерію Манна-Уїтні-Вілкоксона [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з наведених у табл. 1 результатів, через 2 год після введення щурам ФГ у сироватці крові вміст гемовмісних продуктів починає підвищуватися, а через 6 та 24 год збільшується у 4 та 8 разів відповідно. Накопичення загального гемму в кров'яному руслі після введення ФГ спостерігається внаслідок лізису еритроцитів. Відомо, що

Таблиця 1. Вміст загального гемму, малонового діальдегіду в сироватці, гемоглобіну в крові щурів у різні терміни після введення фенілгідрозину (M±m; n=5–6)

Показник	Контроль	30 хв	2 год	6 год	24 год
Гем, нмоль/л	8,66±1,19	9,35±2,01	19,43±2,48*	37,09±7,25***	67,99±10,43***
Гемоглобін, г/л	140,0±4,0	138,5±6,5	132,8±3,8	93,9±3,3*	93,4±2,2*
Малоновий діальдегід, нмоль/л	5,26±0,35	6,03±0,35	6,43±0,20*	9,86±1,29**,**	14,00±1,49***

Примітка. Тут і в табл. 2–4 * P<0,05 відносно контролю, ** P<0,05 відносно значень через 2 год, *** P<0,05 відносно значень через 6 год.

ФГ здатний спричинювати утворення тілець Гейнца та порушення конформації мембран еритроцитів [26], внаслідок чого модифіковані еритроцити швидше захоплюються клітинами системи мононуклеарних фагоцитів, а також лізуються в кров'яному руслі. Пошкодження мембран еритроцитів підтверджується експериментальними даними про пероксидну резистентність цих клітин (табл. 2). Рівень спонтанного гемолізу починає підвищуватися вже через 30 хв після введення ФГ, хоча внутрішньосудинного гемолізу на цей час ще немає. Пошкодження мембран еритроцитів у перші хвилини після ін'єкції також може бути зумовлено окисними властивостями самого ФГ, здатного активувати процеси ланцюгового окиснення в мембранах клітин крові, призводячи до лізису еритроцитів у кров'яному руслі [12]. Нами показано, що через 0,5 год після введення ФГ спостерігається тенденція до підвищення вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів, та його зростання в наступні досліджувані години (див. табл. 1). Це свідчить про активацію вільнорадикального окиснення в кров'яному руслі, що передуює гемолізу і може бути важливою причиною подальшого лізису еритроцитів за дії ФГ. Потужний гемоліз може призводити до зниження кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну в крові з подальшим розвитком

анемії. Так, у табл. 1 показано, що через 6 та 24 год після введення ФГ відбувається зниження вмісту гемоглобіну на 30 %. За даними деяких авторів [7] зниження вмісту гемоглобіну на 15 % розглядається як анемія, тому наведені результати свідчать про розвиток гемолітичної анемії.

Установлено, що введення ФГ спричинює зниження вмісту відновленого глутатіону та каталазної активності в еритроцитах у всі досліджувані терміни дії (див. табл. 2). Відомо, що ФГ може зв'язуватися з гемом різних гемопротеїнів, у тому числі з гемовою групою каталази, внаслідок чого спостерігається інгібування цього ферменту та накопичення пероксиду гідрогену [27]. Це може бути причиною зниження вмісту важливого низькомолекулярного антиоксиданту – відновленого глутатіону в еритроцитах. Беручи до уваги, що активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та глутатіонредуктази не змінюються ні в які терміни дії ФГ (див. табл. 2), можна зробити висновок, що робота системи з відновлення глутатіону в еритроцитах не страждає, а вміст цього антиоксиданту знижується, ймовірно, внаслідок надмірного утворення пероксиду гідрогену в результаті інактивації каталази. Накопичення вільних радикалів у разі введення ФГ, як вважають деякі автори, також може бути результатом вивільнення іонів заліза та спричинювати

Таблиця 2. Рівень спонтанного гемолізу, вміст відновленого глутатіону, каталазна, глутатіонредуктазна та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність в еритроцитах щурів у різні терміни після введення фенілгідазину ($M \pm m$; $n=5-6$)

Показник	Контроль	0,5 год	2 год	6 год	24 год
Спонтанний гемоліз, %	17,61 \pm 1,69	32,14 \pm 4,07*	36,58 \pm 5,31*	44,56 \pm 5,17*	56,12 \pm 2,44*,***
Відновлений глутатіон, мкмоль глутатіону/мл еритроцитів	2,908 \pm 0,070	2,164 \pm 0,154*	1,758 \pm 0,054*	1,845 \pm 0,093*	1,954 \pm 0,104*
Каталазна активність, мкмоль $H_2O_2 \cdot xh^{-1} \cdot mg^{-1}$ білка	122,2 \pm 9,6	75,3 \pm 10,2*	80,5 \pm 6,8*	79,7 \pm 7,9*	85,6 \pm 4,6*
Глутатіонредуктазна активність, нмоль НАДФН $\cdot xh^{-1} \cdot mg^{-1}$ білка	130,5 \pm 25,4	145,5 \pm 18,6	128,4 \pm 12,6	137,2 \pm 26,3	141,6 \pm 15,6
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність, нмоль НАДФН $\cdot xh^{-1} \cdot mg^{-1}$ білка	20,12 \pm 2,36	18,65 \pm 1,15	21,36 \pm 0,96	19,87 \pm 1,02	21,57 \pm 0,83

Таблиця 3. Гемоксигеназна активність та вміст малонового діальдегіду в серці та судинах щурів у різні терміни після введення фенілгідрозину ($M \pm m$; $n=5-6$)

Показник	Контроль	0,5 год	2 год	6 год	24 год
Серце					
Гемоксигеназна активність, нмоль білірубину \cdot xv^{-1} \cdot mg^{-1} білка	0,022 \pm 0,003	0,030 \pm 0,006	0,036 \pm 0,008	0,033 \pm 0,003	0,055 \pm 0,009*
Малоновий діальдегід, нмоль \cdot mg^{-1} білка	0,132 \pm 0,025	0,142 \pm 0,036	0,156 \pm 0,015	0,144 \pm 0,032	0,198 \pm 0,022*
Судини					
Гемоксигеназна активність, нмоль білірубину \cdot xv^{-1} \cdot mg^{-1} білка	0,031 \pm 0,004	0,029 \pm 0,006	0,034 \pm 0,005	0,030 \pm 0,003	0,071 \pm 0,008*
Малоновий діальдегід, нмоль \cdot mg^{-1} білка	0,281 \pm 0,035	0,264 \pm 0,036	0,297 \pm 0,075	0,320 \pm 0,050	0,400 \pm 0,022*

активацію процесів ПОЛ у мембранах еритроцитів, призводячи до гемолізу [12].

Показано, що введення ФГ спричинює збільшення активності ГО в серці та судинах щурів (табл. 3), у той час як підвищення вмісту загального гемму в цих органах не відбувається. Модифіковані гемовмісні продукти, що накопичуються в кров'яному руслі внаслідок дії ФГ, являють собою високомолекулярні сполуки і, на відміну від вільного гемму, не здатні проникати через плазматичні мембрани до клітин різних органів. Ймовірно, саме з цієї причини збільшення гемовмісних продуктів у серці та судинах, незважаючи на гемоліз, не спостерігається. Збільшення активності ГО у цих органах може бути результатом гіпоксичного стану у відповідь на розвиток тривалої анемії [14, 16], причому одним із підтверджень гіпоксії може бути накопичення тут вільних радикалів [2] через 24 год, про що свідчить підвищення вмісту МДА в цих органах (див. табл. 3). Накопичення вільних радикалів у серці може спричинювати пошкодження різних біомо-

лекул, надмолекулярних комплексів і навіть цілих клітин. Так, встановлено, що введення ФГ призводить до посилення активності АсАТ і КФК у сироватці крові, маркерних ферментів ушкодження серцевого м'яза (табл. 4), що може бути зумовлено підвищенням проникності мембран кардіоміоцитів внаслідок активації вільнорадикальних процесів.

Відомо, що гостра гіпоксія стимулює збільшення вмісту мРНК ГО-1, а також підвищення вмісту самого білка як у тканинах тварин, так і в клітинній культурі [16]. При цьому показано, що в гладеньком'язових клітинах судин при гіпоксії індукція ГО-1 регулюється на рівні генної транскрипції за участю фактора індукованого гіпоксією – HIF-1 [16], що також регулює транскрипцію еритропоетину та ендотеліального фактора росту судин. Однак деякі дослідники вважають, що індукція ГО-1 в умовах гіпоксії здійснюється за участю цитокінів і за допомогою активації ядерного фактора Nf-kB через HIF-1-незалежні шляхи [31]. Встановлено,

Таблиця 4. Активність (од. активності/л) аспаратамінотрансферази та креатинфосфокінази в сироватці крові щурів в різні терміни після введення фенілгідрозину ($M \pm m$; $n=5-6$)

Показник	Контроль	0,5 год	2 год	6 год	24 год
Аспаратамінотрансфераза	215 \pm 56	240 \pm 42	200 \pm 76	300 \pm 72	880 \pm 140*
Креатинфосфокіназа	256 \pm 78	210 \pm 54	235 \pm 65	261 \pm 132	1120 \pm 230*

що максимальний вміст мРНК ГО-1 у гладеньком'язових клітинах судин при гіпоксії спостерігається через 12 год, причому до 48 год це підвищення нормалізується. Індукція ГО-1 у відповідь на розвиток гіпоксичного стресу була показана також в ендотеліальних клітинах судин [24]. Деякі автори вважають, що індукція ГО-1 у серці щурів при гострому гіпоксичному стані може здійснюватися через активацію індукцибельної форми NO-синтази [13]. Значення підвищення активності ГО за гіпоксичного стану до кінця не з'ясовано, хоча доведеним є той факт, що індукція цього ферменту за умов гіпоксії носить адаптивний захисний ефект. Так, було показано, що трансгенна лінія мишей, що не містить ген ГО-1, була малоадаптивна до хронічної гіпоксії з подальшим розвитком легеневої гіпертензії й інфаркту правого шлуночка серця [23, 28].

Одержані результати й аналіз даних літератури дозволяють зробити висновок, що розвиток ФГ-гемолітичної анемії, однією з причин чого може бути порушення роботи антиоксидантної системи еритроцитів, супроводжується активацією вільнорадикального окиснення в серці та судинах щурів і підвищенням активності ГО, яку можна розглядати як одну з початкових ланок адаптивного процесу в перші години розвитку гемолітичної анемії.

P. A. Kaliman, O.V. Pavichenko

THE HEME OXYGENASE INDUCTION IN RAT HEART AND VESSELS AND THE PEROXIDATIVE RESISTENCE OF RAT ERYTHROCYTES UNDER HEMOLYTIC ANEMIA DEVELOPMENT

The hemolytic anemia development caused by phenylhydrazine injection (7 mg/100 g b.w.) was shown to be caused by the decreasing of both catalase activity and glutathione content in erythrocytes, and by the increasing of spontaneous hemolysis level of these cells in blood stream. The increasing of heme oxygenase activity and TBA-active products in rat heart and vessels were revealed 24 hrs after phenylhydrazine injection. Possible mechanisms of heme oxygenase-1 induction under hypoxia as response to the hemolytic anemia development

and its role in defense of the cells from damage are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л.: Медицина, 1973. – 144 с.
2. Дубинина Е.Е., Ефимова Л.Ф., Софронова Л.Н., Геронимус А.Л. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии // Лаб. дело. – 1989. – №9. – С. 16–19.
3. Каліман П.А., Стрельченко Е.В., Бараннік Т.В. та ін. Метаболізм гему та гемопротейнів і деякі показники антиоксидантної системи в еритроцитах і тканинах щурів при фенілгідразинівій анемії // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, №2. – С. 66–72.
4. Макаренко Е.В. // Лаб. дело. – 1998. – 11. – С. 48–50.
5. Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях. – В кн.: Методы биохимических исследований / Под ред. Прохоровой М.И. – 1982. – С. 183–185.
6. Саркисов Д.С., Ремезов П.И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. – М.: Моск. правда, 1960. – 780 с.
7. Физиология человека : Пер. с англ. под руководством Р. Шмидта и Г. Тевса. – М.: Мир, 1996. – 323 с.
8. Applegate L.A., Luscher P., Tyrrel R.M. Induction of heme oxygenase a general response to oxidative stress in cultured mammalian cells // *Canc. Res.* – 1991. – **51**(3). – P. 974–978.
9. Balla J., Nath K.A., Balla G. et al. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction in rat lung by hemoglobin in vivo // *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 1995. – **268**. – P. 321–327.
10. Bottomley R. H. Metabolic adaptation in rat hepatomas // *Cancer Res.* – 1963. – **23**, №3. – P. 400–409.
11. Carraway M.S., Yhio A.J., Carter J.D. Expression of heme oxygenase-1 in the lung chronic hypoxia // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2000. – **278**(1). – P. 806–812.
12. Ciccoli L., Signorini C., Alessandrini C. Iron release, lipid peroxidation and morphological alterations of erythrocytes exposed to acrolein and phenylhydrazine // *Exp. Mol. Pathol.* – 1994. – P. 108–118.
13. Deindl E., Kolar F., Neubauer E. et al. Effect of intermittent high altitude hypoxia on gene expression in rat heart and lung // *Physiol. Res.* – 2003. – **52**(2). – P. 147–157.
14. Grabellus F., Schmid C., Levkau B. Reduction of hypoxia-inducible heme oxygenase-1 in the myocardium after left ventricular mechanical support // *J. Pathol.* – 2002. – **197**(2). – P. 230–237.
15. Jager F.C. Determination of vitamin E requirement in rats by means of spontaneous haemolysis in vitro // *Nutr. Dieta.* – 1968, №10. – С. 215–223.

16. Lee P.J., Jiang B.H., Chin B.Y. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**(9). – P. 5375–5381.
17. Lu R., Peng J., Xiao L. et al. Heme oxygenase-1 pathway is involved in delayed protection induced by heat stress against cardiac ischemia-reperfusion injury // *Int.J.Cardiol.* – 2002. – **82**(2). – P. 133–140.
18. Maines M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. – *Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol.* – 1997. – 37. – P. 517–554.
19. Maines MD, Kappas A. Prematurely evoked synthesis and induction of d-aminolevulinat synthetase neonatal. Evidence for metal ion repression of enzyme formation // *J. Biol. Chem.* – 1978. – **253**. – P. 2312–2336.
20. Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease // *Clin. Chem.* – 2000. – 46. – P. 1723–1727.
21. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – **31**(5). – P. 964.
22. Morita T., Perrella MA, Lee ME, Kourenbanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is regulator of vascular cGMP // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* – 1995. – **92**. – P. 1475–1479.
23. Morse D., Choi A.M.K. Heme Oxygenase-1. The emerging molecule has arrived // *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2002. – 27(1). – P. 8–16.
24. Nakayama M., Takahashi K., Kitamuro T. et al. Repression of heme oxygenase-1 by hypoxia in vascular endothelial cells // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **271**(3). – P. 665–671.
25. Ndisang J.F., Zhao W., Wang R. Selective regulation on blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension / *Hypertension.* – 2002. – **40**(3). – P. 315–321.
26. Ohara A. N-phenylprotoporphyrin IX formation in the hemoglobin-phenylhydrazine reaction // *J. Biol. Chem.* – 1981. – 257(11). – P. 6231–6242.
27. Ortiz de Montellano, Kerr D.E. Inactivation of catalase by phenylhydrazine. Formation of a stable eryl-iron heme complex // *J. Biol. Chem.* – 1983. – **258**(17). – P. 558–10563.
28. Otterbein L.E., Choi A.M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2000. – **279**(6). – P. 029–1037.
29. Paul K.G., Theorel H., Akesson A. The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (Pyridine haemochromogen) // *Acta Chem. Scand.* – 1953. – 7(9). – P. 1284–1287.
30. Yachie A., Niida Y., Wada T. et al. Oxidative stress enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency // *J. Clin. Invest.* – 1999. – **103**(1). – P. 129–135.
31. Yan S.F., Ogawa S., Stern D.M., Pinsky D.J. Hypoxia-induced modulation of endothelial cell properties: regulation of barrier function and expression of interleukin-6 // *Kidney Int.* – 1997. – **51**. – P. 419–425.
32. Zhang F, Kaide I.J., Yang L. et al. Carbon Monoxide Modulates the Pulmonary Vascular Response to Acute Hypoxia: Relation to Endothelin // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – p. 3.

Харків. нац. ун-т ім. В.Н.Каразіна М-ва освіти та науки України