

Підвищення рівня спряження конститутивних NO-синтаз і вмісту гемоглобіну в еритроцитах старих тварин залізовмісним фітопрепаратом

С.І. Уретій¹., А.В. Коцюруба²., Б.С. Коп'як²

¹Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця МОЗ України, Київ;

²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: koryak@biph.kiev.ua

In vivo досліджували дію залізовмісного препарату Урфугем на вміст гемоглобіну в крові старих щурів. Для встановлення біохімічних механізмів дії препарату визначали показники оксидативного і нітрозативного стресу, рівні спряження конститутивних NO-синтаз (cNOS) і вміст сірководню (H_2S) в плазмі та еритроцитах, вміст негемового заліза в плазмі і чутливість еритроцитів до кислотного гемолізу. Встановлено високі рівні надлишкового синтезу NO в крові старих тварин внаслідок реутилізації нітрат-аніона (NO_3^-) нітратредуктазою і *de novo* синтезу NO індукційною NOS (iNOS), які не знижувалися препаратом. Вірогідно, дія останнього підвищувала рівень спряження cNOS у плазмі та еритроцитах, знижувала вміст гемоглобіну в еритроцитах та підвищений у них за старіння вміст H_2S , а також знижувала стійкість останніх до кислотного гемолізу. Зафіксовано і зниження в еритроцитах при дії препарату швидкості генерації супероксидного аніон-радикала ($*O_2^-$) і вмісту стабільного пероксиду водню (H_2O_2), які у старих тварин значно перевищували контрольні значення. Дія урфугему не спричинявала зниження високих рівнів генерації гідроксильного радикала ($*OH$) і пулів стабільного метаболіту оксиду азоту (NO_3^-) в еритроцитах. Отримані результати вказують на те, що причиною підвищення проникливості протона (H^+) в еритроцити, яким викликається їх кислотний гемоліз, за дії препарату може бути зміна співвідношення рівнів оксидативного і нітрозативного стресу в них, збільшення у бік останнього. Таким чином, генерація токсичного $*OH$ у крові старих тварин здійснюється не за рахунок класичної реакції Фентона за наявності Fe^{2+} , а внаслідок утворення і розпаду пероксинітриду.

Ключові слова: гемоглобін; еритроцити; кислотний гемоліз; оксидативний і нітрозативний стрес; препарат; старі щури.

ВСТУП

Раніше ми показали [1], що еритроцити старих щурів мають підвищену проникність для протона внаслідок можливої активації кальцій-протонного обмінника (т.з. Ca^{2+} -АТ-Фази плазматичної мембрани), це у свою чергу може викликати їх кислотний гемоліз при зниженні рН крові. Однією з причин зниження стійкості до кислотного гемолізу є наявність у еритроцитів старих тварин оксидативно/нітрозативного стресу, тобто підвищеної генерації супероксиду (O_2^-) і надлишкового оксиду азоту (NO) [2]. Відомо, що при гемолізі еритроцитів звільняється АТФ

© С.І. Уретій., А.В. Коцюруба., Б.С. Коп'як

[3], який активує ендотеліальну NO-синтазу (eNOS) [4], але руйнування плазматичної мембрани еритроцитів (гемоліз) і звільнення гемоглобіну має за наслідок утворення газового трансмітера оксиду вуглецю (CO) через руйнування гему гемоксидазою [5], так і сприяє підвищенню синтезу гемоглобіну [6]. В еритроцитах інтенсивно синтезується не лише NO при відновленні нітрит-аніона (NO_2^-) дезоксигемоглобіном [7], але і H_2S ферментом меркаптопіруватсульфотрансферазою (MPST) [8]. Недавно встановлено, що не лише NO окиснюється в еритроцитах оксигемоглобіном до нітрат-аніона (NO_3^-)

[9], але і H_2S [10] до тіосульфату ($H_2S_2O_3$) і полісульфідів $((H_2S)_n$. Тим самим еритроцити як і мітохондрії здатні здійснювати детоксикацію H_2S , високий вміст якого надзвичайно токсичний, в першу чергу внаслідок інгібування дихання в мітохондріях [11, 12]. Оскільки в зрілих еритроцитах мітохондрії відсутні, очевидно саме вони як і мітохондрії інших клітин можна вважати основним місцем детоксифікації H_2S . Аналогічні припущення стосуються і NO, високий вміст якого в еритроцитах не є токсичним, а одним із основних місць-депо контрольованого ферментативного окиснення та синтезу. В механізмах реалізації регуляторних функцій NO важливу роль відіграє його взаємодія із залізом в активних центрах ферментів-мішеней розчинної гуанілатциклази, каталази, окси- і дезоксигемоглобіну тощо. [13]. Досліджуваний препарат урфугем містив залізо і аскорбінову кислоту, яка бере участь в регенерації глутатіону (відновленні окисненого глутатіону).

Метою нашої роботи було визначити вплив препарату на вміст гемоглобіну в крові, інтенсивність оксидативного і нітрозативного стресу в еритроцитах і в плазмі, яка їх оточує, а також на залежну від останнього стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на 10 дорослих безпородних щурах віком 6 міс і 10 старих віком 24 міс. Старих щурів розділяли на дві групи по 5 тварин у кожній. Тваринам контрольної групи згодовували протягом 14 діб стандартний раціон віварію, тоді як тваринам дослідної групи замість питної води давали водний розчин залізовмісного препарату урфугем з розрахунку по 0,1 мг/кг. Крім Fe^{2+} препарат містить сухий екстракт кропиви дводомної і аскорбінову кислоту. Через 14 діб тварин декапітували, забирали кров, з якої центрифугуванням виділяли еритроцити і збагачену лейкоцитами плазму. Суспензію еритроцитів крові дорослих, контрольних і дослідних

старих щурів в ізотонічному середовищі 0,14 М NaCl використовували для проведення кінетичного аналізу кислотного гемолізу [14], який детально описаний нами раніше [15].

Вміст гемоглобіну в цільній крові і негемового заліза (Fe) в плазмі крові визначали за допомогою вітчизняних клінічних тест-добірок фірми «Філісіт-діагностика» (Дніпропетровськ). В наборі для дослідження вмісту загального заліза та вільного негемового заліза використовували тріс-НСІ-буфер (рН 7,4). Біохімічні показники оксидативного стресу (швидкість генерації $*O_2^-$ і $*OH$, пули H_2O_2 , сечової кислоти, тромбоксану B_2 , пептидолейкотрієну C_4 , дієнових конюгатів і малонового діальдегіду, як і нітрозативного стресу (сумарну активність конститутивних (ендотеліальної і нейрональної) NO-синтаз, $eNOS = eNOS + nNOS$; активність $iNOS$ і НАДН-залежну нітратредуктазну активність; пули NO_3^- і H_2S визначали в плазмі крові і в гемолізатах еритроцитів [16]. Всі роботи з тваринами проводили відповідно до Закону України від 21.02.2006 №3447-IV „Про захист від жорстокого поводження” та відповідно до етичних норм і правил роботи з лабораторними тваринами. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), SDUDENT (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США)

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кислотна резистентність характеризує роботу кальцій-протонного обмінника плазматичної мембрани еритроцитів за дії різних факторів у період старіння. Роботу цього обмінника оцінювали за статистично обробленими кінетичними показниками гемолізу (таблиця).

Як видно з таблиці і рис. 1, стійкість еритроцитів старих тварин до кислотного гемолізу після двотижневого вживання препарату знижувалася, тобто проникність протона через плазматичну мембрану зростала. На це вказує зниження загальної тривалості гемо-

Показники кінетичних кислотних еритрограм щурів досліджених груп (М ± m)

Показник	Дорослі щури (n=10)	Старі щури	
		контроль (n=5)	препарат (n=5)
Інтегральний індекс стійкості, ум.од.	486,15 ± 32,42	246,27 ± 19,35*	159,83 ± 7,18*/**
Тривалість гемолізу, хв	13,81 ± 1,60	5,9 ± 0,37*	2,80 ± 0,27*/**
Частка лабільних клітин (гемоліз до 2,5хв), %	12,06 ± 1,38	67,38 ± 12,09*	99,35 ± 0,47*/**
Частка стабільних клітин (гемоліз після 7,5хв), %	28,1 ± 3,1	1,51 ± 0,22*	0 ± 0

лізу (від $5,9 \pm 0,37$ до $2,80 \pm 0,27$ хв) та інтегрального індексу стійкості (від $246,27 \pm 19,35$ до $159,83 \pm 7,18$ ум.од.) і, навпаки, збільшення частки лабільних «старих» еритроцитів (від $67,38 \pm 12,09$ до $99,35 \pm 0,47\%$ у сумарній популяції еритроцитів (див. таблицю). І в свою чергу свідчить про активацію роботи кальцій-протонного обмінника, т.з. Ca^{2+} -АТФази. Як відомо [2], проникність плазматичної мембрани еритроцитів для різних речовин, в т.ч. для H^+ , знаходиться під контролем активних форм кисню (АФК) і азоту (АФА), які неспецифічно окиснюють ліпідні і специфічно білкові компоненти плазматичних мембран. Ми дослідили зміни показників, що характеризують інтенсивність окисдативного і нітрозативного стресу, котрі виникають при підвищенні генерації АФК і АФА в плазмі

(див. рис.3,а, рис.4,а) і еритроцитах (рис.3,б, рис.4,б) старих щурів за дії препарату. Його вживання викликало значне зниження в еритроцитах швидкості генерації *O_2^- (на 37%) і пулів H_2O_2 (на 59%; див. рис.3,б), а в плазмі крові зниження пулів H_2O_2 (на 72%) і, навпаки, підвищення пулів негемового заліза (на 68%) і ще значніше (в 3 рази) активності cNOS (конститутивного кальційзалежного de novo синтезу NO із L- аргініну (рис.4,а). Отже, активація кальцій-протонного обмінника (підвищення протонної проникливості) еритроцитів за дії урфугему призводила до зниження їх стійкості до кислотного гемолізу. При цьому підвищувався вміст негемового заліза в плазмі і змінювалося співвідношення в інтенсивності генерації АФК та АФА на користь останніх як в плазмі, так і в ери-

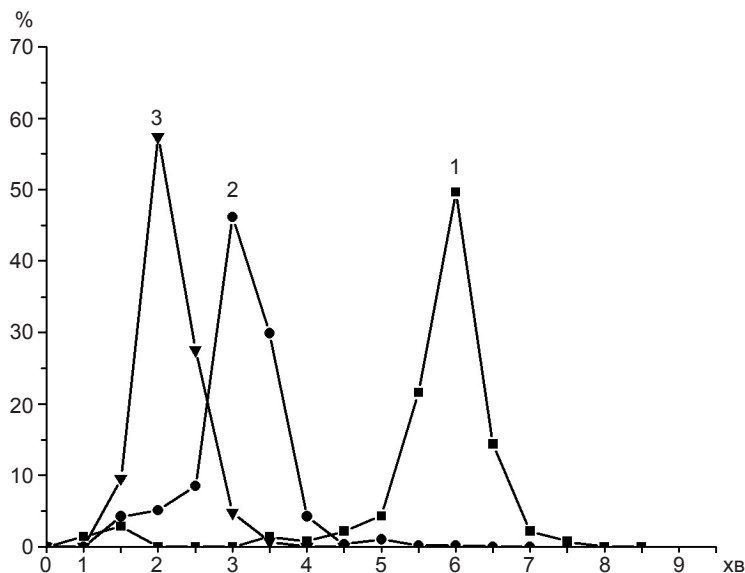


Рис. 1. Кислотні еритрограми щурів за різних умов експерименту: 1- дорослі щури, 2- контрольні старі щури, 3- старі щури, що отримували урфугем; за віссю абсцисс – тривалість гемолізу, за віссю ординат - рівень гемолізу.

троцитах. Такі зміни за дії препарату мали за наслідок вірогідне (на 40%) підвищення вмісту гемоглобіну (див. рис.2,а) і індексу спряження cNOS (див. рис.2,б). Розглянемо можливий внесок кожного із вищевказаних препаратозалежних змін у підвищенні вмісту гемоглобіну. Стосовно підвищення кальцій-протонного обміну і кислотного гемолізу еритроцитів існує в медичному середовищі стала думка про те, що саме руйнування еритроцитів, через гемоліз, забезпечує максимальне посилення синтезу гемоглобіну. Причиною цього може бути також зафіксова-

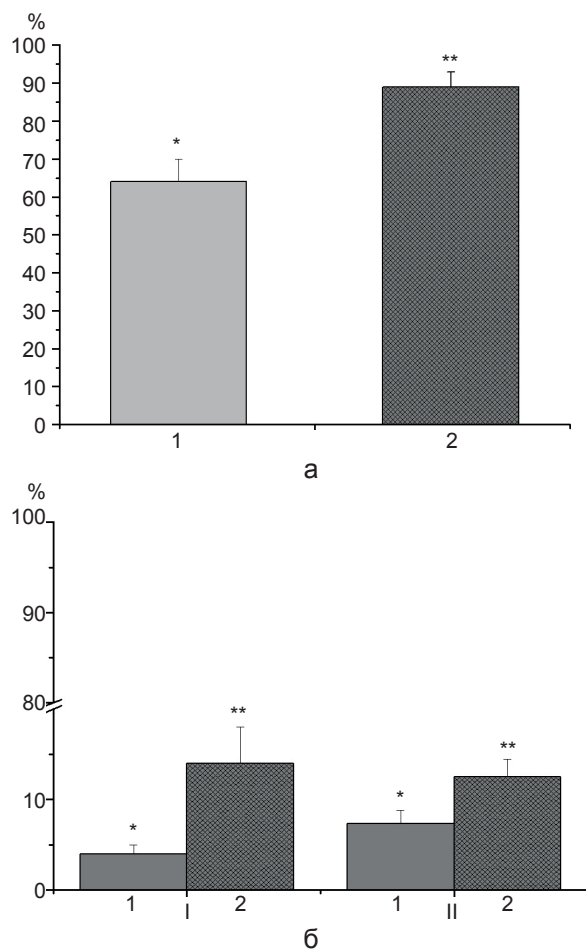


Рис.2. Дія препарату урфугему на вміст гемоглобіну в цільній крові старих щурів (а) та індекс спряженості конститутивної NO-синтази (б) в плазмі (I) й еритроцитах (II) крові: 1-контроль, 2-препарат. Лінією позначено вміст гемоглобіну у дорослих щурів (100%). *P<0,05 відносно дорослих, ** P<0,05 відносно контролю (старих щурів, що не отримували препарат)

не нами значне підвищення активності cNOS у плазмі крові (див. рис.4,а), але не в самих еритроцитах (див. рис.4,б) у старих щурів за дії урфугему, внаслідок можливого звільнення при їх гемолізі АТФ, який діє на ці ферменти синтезу NO через свої пуринорецептори на плазматичних мембранах лейкоцитів [17]. У разі дії препарату більш ніж у 3 рази підвищувався індекс спряження cNOS в плазмі крові старих тварин (див. рис.2,б), що свідчить про збільшення частки конститутивного кальційзалежного de novo синтезу NO, а не $*O_2^-$ із L-аргініну, яке здійснюють ці ферменти у неспряженому стані у старих тварин. Дія урфугему щодо спряженого стану cNOS в еритроцитах була менш ефективною (див. рис.2,б). Окисний (як оксидативний, так і, особливо, нітрозативний) стрес, який спостерігається за умов старіння [2], є його першопричиною [18], і також мішенню дії препарату. На це вказує зафіксоване зниження генерації $*O_2^-$ в еритроцитах і пулів H_2O_2 як в еритроцитах, так і в плазмі (див. рис.3,а,б). Не виключено, що причиною такого зниження швидкості генерації $*O_2^-$ є підвищення спряженості ферментів cNOS (eNOS чи/i nNOS), більш значного в плазмі крові. В свою чергу підвищення спряженими ферментами синтезу NO в плазмі може бути одним із індукторів підвищення в крові вмісту гемоглобіну (а, отже, можливо, і швидкості його синтезу de novo) у старих щурів за дії урфугему. Також важливою не лише в підвищенні пулів гемоглобіну, але і його функційних властивостей, які залежать від процесу глутатіонування [19], може бути роль H_2S , яка ще не з'ясована, але класичну функцію еритроцитів в світлі нових даних вже варто доповнити їх здатністю транспортувати не лише O_2 , але й газові трансмітери – NO, CO і H_2S . Ймовірно, NO транспортується еритроцитами у вигляді нітрит-аніона, здатного легко відновлюватися нітритредуктазою активністю дезоксигемоглобіну ($NO_3^- \rightarrow NO$) [7]. Можна вважати, що CO транспортується еритроцитами у вигляді гемової

групи молекул гемоглобіну, при гемолізі еритроцитів останній „виходить” в плазму, де його гемова група негайно руйнується гемоксигеназою з вивільненням CO [6]. H₂S синтезується в еритроцитах de novo ферментом MPST [8], еритроцити можуть його накопичувати з плазми (вміст H₂S в еритроцитах дорослих щурів майже втричі перевищує плазмовий 76,1±8,2 і 27,1±1,8 пмоль/мг білка відповідно) і також можуть використовувати його як для власних потреб, так і для транспортування до інших клітин-мішеней. Високий вміст H₂S в еритроцитах, згідно з нашою гіпотезою, необхідний для запобігання глутатіонування гемоглобіну, що погіршує його властивості. Такий самий процес глутатіонування призводить до неспряження мо-

лекул cNOS (eNOS чи/і nNOS), що знижує конститутивний синтез NO і, навпаки, підвищує генерацію цими ферментами *O₂⁻, викликаючи підсилення оксидативного стресу і збільшення внаслідок цього пулів окисненого глутатіону. Саме останній здійснює глутатіонування цистеїнових залишків у молекулах гемоглобіну і багатьох інших білків [20]. Таким чином, відбувається замкнене коло взаємопідсилення оксидативного стресу і глутатіонування cNOS. У разі гемоглобіну, цей процес може змінювати ферментативні активності різних його форм - тієї ж вищезгаданої нітритредуктазної активності дезоксигемоглобіну, здатності окиснювати NO до нітрат-аніона оксидазною активністю оксигемоглобіну чи генерувати не лише H₂O₂,

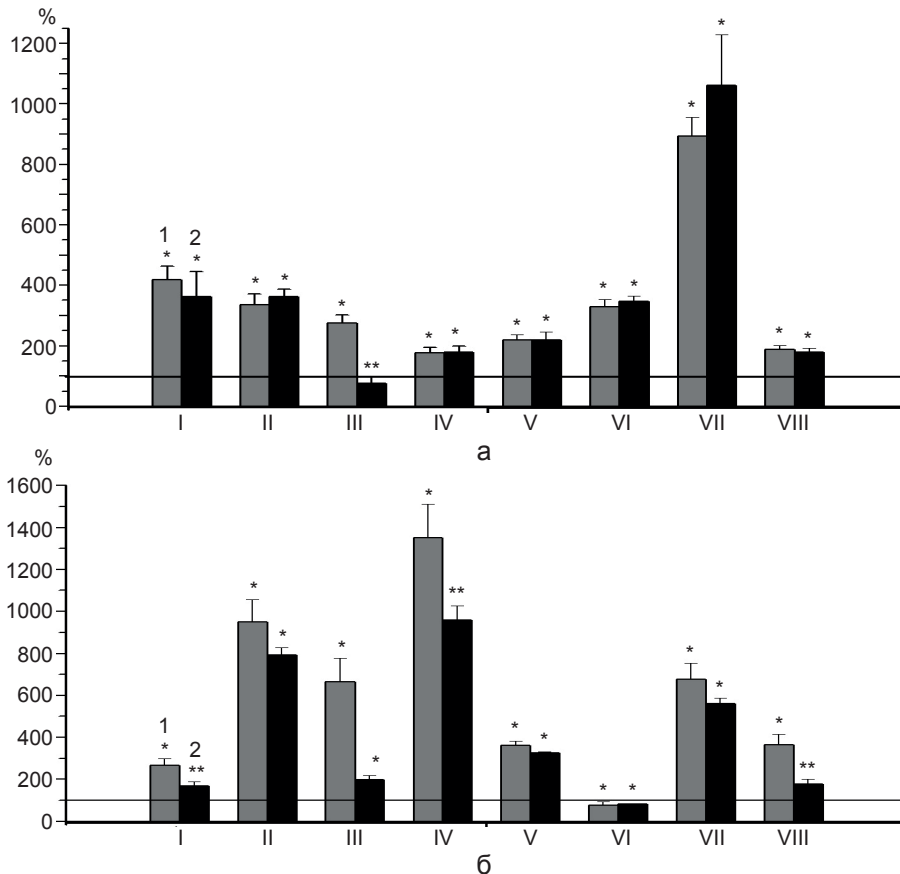


Рис.3. Дія препарату на показники оксидативного стресу в плазмі (а) і в еритроцитах (б) старих щурів; I-швидкість генерації *O₂⁻ II- швидкість генерації *OH, III- вміст H₂O₂, IV- вміст сечової кислоти, V- вміст тромбоксану B₂, VI- вміст пептидолейкотрієну C₄, VII-вміст дієнових кон'югатів, VIII- вміст малонового діальдегіду. Лінією позначено вміст показників у дорослих щурів (100%). *P<0,05 відносно дорослих, ** P<0,05 відносно контролю (старих щурів, що не отримували препарат)

про що відомо вже давно, але й тіосульфат ($H_2S_2O_3$) та полісульфіди (HS_n) при окисненні H_2S в еритроцитах за участю метгемоглобіну, як встановлено недавно [10]. Механізмом захисту H_2S різних форм гемоглобіну, може бути збільшення пулів відновленого глутатіону (GSH), який перешкоджає глутатіонуванню цистеїнових залишків гемоглобіну. В свою чергу для синтезу GSH при зниженні утворення H_2S пули першого можуть збільшуватися у разі посиленого використання L-цистеїну, який є спільним попередником de novo синтезу і глутатіону, і H_2S , утворюючи т.з. L-цистеїновий шунт. Подібний шунт відомий для L-аргініну. Останній використовується для синтезу сечовини та de novo синтезу NO [21,22]. Незначне (на 30%), але

вірогідне зниження еритроцитарних пулів H_2S за дії препарату (див. рис.4,б) вказує на таку можливість. Причиною може бути зафіксоване нами підвищення кальцій-протонного обміну в цих клітинах, про що свідчить зміщення еритрограми кислотного гемолізу вліво (див. рис.1, крива 3). Відомо [23], що для запобігання значного підкислення цитозолу при підвищенні транспорту H^+ в еритроцити в обмін на вихід іонів кальцію, вони інтенсифікують „викидання” протонів у вигляді бікарбонату (HCO_3^-) або гідросульфіту (HS^-). І, нарешті, не виключено, що урфугем підвищує щойно відкритий феномен окиснення H_2S в еритроцитах метгемоглобіном до тіосульфату ($H_2S_2O_3$) і полісульфідів (H_2S_n) [10]. До цього часу єдиним шляхом

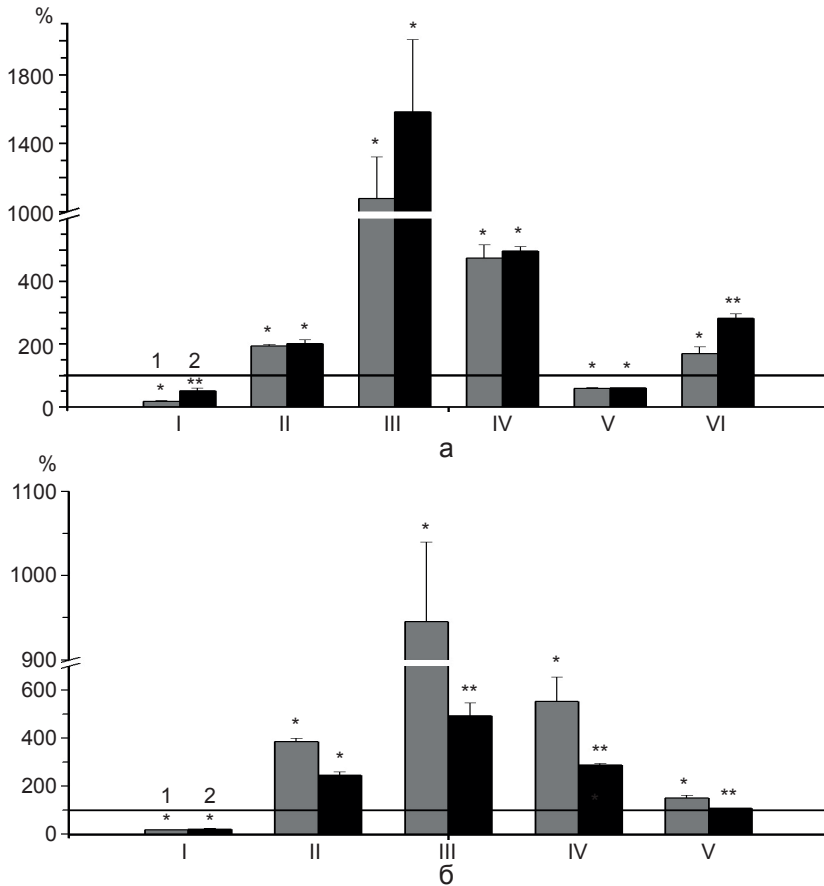


Рис.4. Дія препарату на показники нітрозативного стресу в плазмі (а) і в еритроцитах (б) старих щурів; I- активність сNOS, II— активність iNOS, III- активність нітратредуктази, IV- вміст NO_3^- , V- вміст H_2S , VI- вміст вільного негемового заліза. Лінією позначено значення показників у дорослих щурів (100%). *P<0.05 відносно дорослих, ** P<0,05 відносно контролю (старих щурів, що не отримували препарат)

окиснення H_2S вважався мітохондріальний із „скиданням” електронів у електронно-транспортний ланцюг і, в т.ч. за участю H_2S в генерації АТФ в мітохондріях. Насправді H_2S давно відомий як єдиний неорганічний субстрат дихання [24]. Полісульфіди є дуже потужними біорегуляторами [25], наявність в еритроцитах незалежного від мітохондрій шляху окиснення H_2S з утворенням H_2S_n і $H_2S_2O_3$ має надзвичайно велике значення, незважаючи на прогнозовану відсутність участі в генерації енергії, оскільки мітохондрії в еритроцитах шурів, як і людини відсутні. По-перше, тому, що саме H_2S_n опосередковують такі відомі біоефекти H_2S , як регуляція тону судин, ангиогенезу і споживання кисню; нейромедіаторна, цитопротекторна і протизапальна дія [26]. По-друге, утворення в еритроцитах $H_2S_2O_3$ при окисненні H_2S передбачає можливість ресинтезу H_2S вищевказаним ферментом його синтезу *de novo* MPST, подібно до потужного ресинтезу NO із NO_2^- в еритроцитах за дії дезоксигемоглобіном. Що стосується підвищення вмісту вільного негемового заліза залізовмісним препаратом, то цей ефект можна вважати очікуваним, тим більше він став очевидним наслідком підвищеного гемолізу еритроцитів і неминучого руйнування гему гемоксидазою звільненням заліза, білірубину та оксиду вуглецю (CO). Останній, як і NO, є потужним низькомолекулярним регулятором серцево-судинної та інших важливих систем організму, діючи через сигнальну систему розчинної гуанілатциклази (pGC—cGMP—PKG) [27, 28]. Водночас підвищення плазмових пулів заліза мало впливає на синтез гемоглобіну [29, 30]. Причиною стимуляції його синтезу не є залізо, що звільняється при руйнуванні еритроцитів, а інші фактори цього процесу. Ми вважаємо, що основними із них є звільнення АТФ і CO. Цікаво, що пули H_2S знаходяться у тісному взаємозв'язку з останніми [31]. За дії урфугему вони знижувалися в плазмі (див. рис.4,а), як було вказано раніше, а в еритроцитах (див. рис.4,б)

значно перевищували значення в плазмі. Таким чином, зафіксоване збільшення гемолізу еритроцитів за дії урфугему може призводити до звільнення у плазму всіх трьох (!) відомих нині газових трансмітерів – CO при руйнуванні гему гемоксидазою, NO внаслідок реутилізаційного синтезу в еритроцитах і синтезу в стінці судин звільненим при гемолізі АТФ, та H_2S внаслідок його виходу з еритроцитів у плазму при її руйнуванні.

ВИСНОВКИ

1. У старих шурів знижується вміст гемоглобіну в крові і, навпаки, підвищується активність кальцій-протонного обміну, що викликає прискорений кислотний гемоліз еритроцитів.

2. Залізовмісний препарат, який старі тварини вживали протягом 14 діб, підвищував як вміст гемоглобіну, так і швидкість кальцій-протонного обміну, внаслідок чого стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу знижувалася.

3. У плазмі, та в еритроцитах старих тварин спостерігається оксидативно/нітрозативний стрес, викликаний зниженням активності конститутивного *de novo* синтезу NO і, навпаки, високими рівнями генерації як АФК – малотоксичного супероксидного і токсичного *ОН, так і високими рівнями генерації надлишкового NO – шляхом індуцибельного *de novo* синтезу і внаслідок реутилізації нітрат-аніона нітратредуктазою.

4. Після вживання урфугему рівень генерації супероксидного радикала, але не токсичного *ОН-радикала в еритроцитах знижувався і, навпаки, як у плазмі, так і в еритроцитах старих тварин підвищувався рівень конститутивного *de novo* синтезу NO внаслідок підвищення спряження cNOS.

5. Високі рівні генерації токсичного *ОН-радикала в крові старих шурів зумовлюються утворенням і розпадом по радикальному шляху пероксинітриту в умовах оксидативно/нітрозативного стресу, а не по класичному шляху перетворення пероксиду водню в реакції Фентона.

С.И. Уретий, А.В. Коцюруба, Б.С. Копьяк

СНИЖЕНИЕ У СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ СТОЙКОСТИ К КИСЛОТНОМУ ГЕМОЛИЗУ ЭРИТРОЦИТОВ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИМ ФИТОПРЕПАРАТОМ УВЕЛИЧИВАЕТ УРОВЕНЬ ГЕМОГЛОБИНА В НИХ

In vivo проведено дослідження хронічного діяння залізо-содержащого препарату Урфугем на рівень гемоглобіну в крові старих крыс. Для установлення біохімічних механізмів можливої стимуляції його синтезу визначали показателі оксидативного і нітрозативного стресу і вміст сероводорода в плазмі і в еритроцитах, негемового заліза в плазмі і чутливість до кислотному гемолізу еритроцитів. Установили, що препарат достовірно підвищує вміст гемоглобіну і знижує стійкість еритроцитів до кислотному гемолізу. Зафіксовано також достовірне зниження в еритроцитах швидкості генерації супероксидного аніон-радикала ($*O_2^-$) і вмісту пероксида водороду (H_2O_2), але не за рахунок зниження активності ліпідних (ліпоксигеназа і циклооксигеназа) або нуклеотидного (ксантінооксидаза) генераторів $*O_2^-$. Препарат не знижує високі рівні генерації гідроксильного радикала ($*OH$) і пулу нітрат-аніона (NO_3^-) в еритроцитах. Установлено угнетення de novo синтезу NO конститутивними NOS (cNOS) внаслідок їх несопряження і високі рівні надлишкового синтезу NO як в плазмі, так і в еритроцитах старих тварин за рахунок реутилізації NO_3^- нітратредуктазою і de novo синтезу NO індукційною NO-синтазою. Препарат частково відновлював конститутивний de novo синтез NO, збільшуючи спряження cNOS. Отримані результати вказують на те, що причиною подальшого підвищення проникності для протона (H^+) плазматическої мембрани еритроцитів у збільшеній у старих тварин, котрим викликається їх кислотний гемолиз, препаратом може бути зміна співвідношення рівнів оксидативного і нітрозативного стресу в еритроцитах на користь останнього, тобто генерація токсического $*OH$ не за рахунок класическої реакції Фентона в присутстві Fe^{2+} , а за рахунок утворення і розпаду пероксинітриду. Ключеві слова: гемоглобін; еритроцити; кислотний гемолиз; оксидативний і нітрозативний стрес; залізо-содержащий препарат; старі крыси

S.I. Uretii¹, A.V. Kotsuruba², B.S. Kopyak²

REDUCING RESISTANCE TO ACID HEMOLYSIS BY IRON-CONTAINED DRUG INCREASES THE LEVEL OF HEMOGLOBIN IN THE ERYTHROCYTES OF AGING ANIMALS

In experiments in vivo we studied the effect of chronic iron-containing drug (Urfuhem) supplementation on the level of

hemoglobin (Hb) in the blood of aging rats. To establish the biochemical mechanisms of drug action it were determined the parameters of oxidative/nitrosative stress and the hydrogen sulfide level in plasma and erythrocytes, the level of non-heme iron in plasma and erythrocytes sensitivity to acid hemolysis. It was found that in aging rats the drug significantly increases the Hb content of red blood cells and reduces its resistance to acid hemolysis. After the drug supplementation the rate of superoxide anion-radical ($*O_2^-$) generation in erythrocytes and stable hydrogen peroxide (H_2O_2) content both in plasma and erythrocytes were down-regulated. The drug did not reduce the high levels of generation of the hydroxyl radical ($*OH$) and high levels of excess NO de novo synthesis by iNOS in erythrocytes but reduced the pools of nitrate anion (NO_3^-) and its reutilization for NO synthesis. After the drug supplementation the rate of constitutive NO synthesis by cNOS in aging rats plasma was up-regulated perhaps by cNOS coupling. The results indicate that the reason for increasing the permeability of the proton (H^+) in red blood cells that causes the acid hemolysis in aging rats after the drug supplementation can be change in the balance of levels of oxidative and nitrosative stress in red blood cells in favor of the latter, and that toxic $*OH$ generation is not at the expense of the classical Fenton reaction in the presence of iron ions (Fe^{2+}), but due to the formation and decomposition of peroxyntirite ($ONOO^-$).

Key words: hemoglobin; red blood cells; acid hemolysis; oxidative and nitrosative stress; iron-contained drug; old rats

¹O.O.Bogomolets national medical university, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv;

²O.O.Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

- 1.Kotsuruba AV, Sharipov RR, Kopyak BS, Sagach VF. Brain focal ischemia-reperfusion causes a decreased resistance of erythrocytes from venous blood to acid hemolysis, which is prevented by ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2015; 61(5):3-10. [Ukrainian].
- 2.Kotsuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF, Spivak NJ. Nanocerium restores the erythrocytes stability to acid hemolysis by inhibition of oxygen and nitrogen reactive species in old rats. *Fiziol Zh.* 2015; 61(1):3-9. [Ukrainian].
- 3.Sikora J, Orlov SN, Furuya K, Grygorczyk R. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood.* 2014; 124(13):2150-7.
- 4.Giebink AW, Vogel PA, Medawala W, Spence DM. C-peptide-stimulated nitric oxide production in a cultured pulmonary artery endothelium is erythrocyte mediated and requires Zn(2+). *Diabetes Metab Res Rev.* 2013; 29(1):44-52.
- 5.Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(4):585-630.
- 6.Westphal M, Weber TP, Meyer J, von Kegler S, Van Aken

- H, Booke M. Affinity of carbon monoxide to hemoglobin increases at low oxygen fractions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295(4):975-7.
7. Sahach VF, Doloman LB, Kotsiuruba AV, Bukhanevich OM, Kurdanov KhA, Beslanieiev IA, Bekuzarova SA. Increased level of nitric oxide stable metabolites in the blood of highlanders. *Fiziol Zh.* 2002; 48(5):3-8. [Ukrainian].
 8. Valentine WN, Toohey JJ, Paglia DE, Nakatani M, Brockway RA. Modification of erythrocyte enzyme activities by persulfides and methanethiol: possible regulatory role. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(5):1394-8.
 9. Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2014; 2:251-8.
 10. Vitvitsky V, Yadav PK, Kurthen A, Banerjee R. Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides. *J Biol Chem.* 2015; 290(13):8310-20.
 11. Matallo J, Vogt J, McCook O, Wachter U, Tillmans F, et al. Sulfide-inhibition of mitochondrial respiration at very low oxygen concentrations. *Nitric Oxide.* 2014; 41:79-84.
 12. Savolainen H. High Toxicity of Hydrogen Sulfide by the Inhibition of Mitochondrial Respiration. *J Biol Chem.* 2010; 285(24): 1e9.
 13. Cooper CE. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411(2-3):290-309.
 14. Terskov IA, Gittelzon II. Method chimicheskich (kislotnich) erytrogram. *Biophysika.* 1957; 2(2):259-66. [Russian].
 15. Kotsuruba AV, Kopjak BS, Sagach VF, Spivak Nja. Old rats erythrocytes stability to acid hemolysis restoring by cerium oxide nanoparticles. *Fiziol Zh.* 2014; 60(6):3-9. [Ukrainian].
 16. Drachuk K.O., Kotsiuruba A.V., Bazilyuk, Stepanenko L.G., Sagach V.F. Propagylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscles in old rats. *Fiziol Zh.* 2014; 60(4):3-10. [Ukrainian].
 17. Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, et al. NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol.* 2009; 182(5):2898-908.
 18. Fan Q, Chen M, Fang X, Lau WB, Xue L, et al. Aging might augment reactive oxygen species (ROS) formation and affect reactive nitrogen species (RNS) level after myocardial ischemia/reperfusion in both humans and rats. *Age (Dordr).* 2013; 35(4):1017-26.
 19. Colombo G, Dalle-Donne I, Giustarini D, Gagliano N, Portinaro N, et al. Cellular redox potential and hemoglobin S-glutathionylation in human and rat erythrocytes: A comparative study. *Blood Cells Mol Dis.* 2010; 44(3):133-9.
 20. Dafre AL, Reischl E. Hemoglobin S-thiolation during peroxide-induced oxidative stress in chicken blood. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2006; 142(3-4):188-97.
 21. Sahach VF, Kotsiuruba AV, Baziliuk OV, Mehed' OF, Stepanenko LH. Inhibitors of arginase pathway in L-arginine metabolism as a new class of antihypertensive drugs: action of urea on oxidative and nonoxidative metabolism of L-arginine and vascular tone in chronic hypertension. *Fiziol Zh.* 2004; 50(6):9-18. [Ukrainian].
 22. Sagach VF, Bondarenko A, Bazilyuk OV, Kotsuruba AV. Endothelial dysfunction: possible mechanisms and ways of correction. *Experimental & Clinical Cardiology.* 2006; 11(2):107-112. [Ukrainian].
 23. Jennings ML. Transport of H₂S and HS(-) across the human red blood cell membrane: rapid H₂S diffusion and AE1-mediated Cl(-)/HS(-) exchange. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013; 305(9):C941-50.
 24. A. Gubern M, Andriamihaja M, Nьbel T, Blachier F, Bouillaud F. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J.* 2007; 21(8):1699-1706.
 25. Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2015; 91(4):131-59.
 26. Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules.* 2014; 19(10):16146-57.
 27. Hristov KL, Gagov HS, Itzev D, Duridanova DB. Heme oxygenase-2 products activate IKCa: role of CO and iron in guinea pig portal vein smooth muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004; 25(4-5):411-21.
 28. Ahmmed GU, Xu Y, Hong Dong P, Zhang Z, Eiserich J, Chiamvimonvat N. Nitric oxide modulates cardiac Na(+) channel via protein kinase A and protein kinase G. *Circ Res.* 2001; 89(11):1005-13.
 29. Schmidt A, Kolb E, Hofmann U, Grьndel G, Nestler K, Schmidt U. The content of Hb in blood and the protein, Fe, Fe-binding capacity, Cu and Zn in blood plasma of low parity sows before and after oral iron administration. *Arch Exp Veterinarmed.* 1990; 44(3):439-46.
 30. Ahiboh H, Oga AS, Yapi HF, Kouakou G, Boua KD, et al. Anaemia, iron index status and acute phase proteins in malaria (Abidjan, C^ote d'Ivoire). *Bull Soc Pathol Exot.* 2008; 101(1):25-8.
 31. Clanton TL, Hogan MC, Gladden LB. Regulation of cellular gas exchange, oxygen sensing, and metabolic control. *Compr Physiol.* 2013; 3(3):1135-90.

*Матеріал надійшов
до редакції 08.02.2016*