УДК: [577.125.8+577.152.1]:[546.48+546.172.6-31]

Вплив донорів монооксиду нітрогену на показники кадмій-індукованого оксидативного стресу в різних органах щурів

І.В. Нікітченко, Т.П. Рибальченко, Т.В. Бараннік, О.В. Павиченко

Основним механізмом токсичної дії іонів кадмію на клітини вважають оксидативний стрес, який кадмій, що не є перехідним металом, викликає опосередковано. Окисні пошкодження клітин за дії іонів кадмію є тканиноспецифічними і пов'язані з інгібуванням антиоксидантної системи, накопиченням вільного гему, заміщенням ессенціальних металів у металопротеїнах. Монооксид нітрогену (NO) виявляє високу спорідненість до гему та сульфгідрильних груп білків і пептидів, які є основними молекулярними мішенями для іонів кадмію. З огляду на вищенаведене, метою цієї роботи стало дослідження впливу донорів NO-радикалів на прооксидантно-антиоксидантний стан тканин ссавців за умов оксидативного стресу, спричиненого введенням *in vivo* хлориду кадмію. Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 160–200 г. $CdCl_2$ вводили підшкірно у дозі 14 мг/кг маси тіла. Прямий донор NO-радикалу нітропрусид натрію (SNP, 1 мг/кг маси) і субстрат NO-синтазної реакції L-аргінін (600 мг/кг маси) вводили внутрішньочеревинно. Для дослідження корегувального впливу донори NO-радикалу вводили за 0,5 год до ін'єкції солі кадмію. Об'єктами дослідження були плазма крові і гомогенати печінки, нирок і селезінки щурів. Введення хлориду кадмію спричинило низку порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу, більшість з яких відбувались через добу. Накопичення продуктів ліпопероксидації встановлено у сироватці крові, печінці та селезінці щурів. Посилення прооксидантних процесів у цих тканинах може бути результатом надходження до них іонів кадмію та продуктів гемолізу. В антиоксидантній системі суттєві зміни спостерігались під впливом кадмію лише в печінці: збільшення вмісту відновленого глутатіону та СОД активності і зниження активності каталази. Попередник монооксиду нітрогену L-аргінін не змінював базальний рівень прооксидантно-антиоксидантних показників, а також у більшості випадків не впливав на їх динаміку після введення хлориду кадмію в органах, що досліджувались. Прямий донор NO нітропрусид натрію діяв у печінці та селезінці значною мірою як прооксидант. В печінці введення тільки нітропрусиду, так само як і сумісне введення SNP і $CdCl_2$, призводило до активації вільнорадикальних процесів вже в перші години. У селезінці сумісне введення SNP і солі кадмію також спричинювало більш ранній розвиток оксидативного стресу, про що свідчило збільшення рівню гідропероксидів ліпідів і зниження вмісту відновленого глутатіону. Отже, введення прямого донору NO нітропрусиду натрію та субстрату NO-синтаз L-аргініну в обраних дозах не мало вираженого коригувального впливу на кадмій-індукований оксидативний стрес у печінці, нирках та селезінці. Однак у крові обидва донори NO ефективно запобігали накопиченню продуктів ліпопероксидації за введення $CdCl_2$, крім того, L-аргінін суттєво зменшував вихід лактатдегідрогенази, що може свідчити про захист клітин крові та судин від пошкоджень за дії іонів кадмію.

Ключові слова: *кадмій, оксидативний стрес, монооксид нітрогену, антиоксидантна система.*

Про авторів:
І.В. Нікітченко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, https://orcid.org/0000-0001-5858-3382
Т.П. Рибальченко – Харківська державна академія фізичної культури, вул. Клочківська, 99, Харків, Україна, 61022, tanyusic@ukr.net, https://orcid.org/0000-0003-3107-0290
Т.В. Бараннік – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, tbarannik@karazin.ua, http://orcid.org/0000-0002-8123-3871
О.В. Павиченко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, olga.pavichenko@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-1396-790X

Вступ

Солі кадмію виявляють різнопланові токсичні ефекти на організм ссавців, призводять до виражених змін генної експресії та обміну речовин (Tokumoto et al., 2019). Основним механізмом пошкоджуючої дії іонів кадмію на клітини вважають оксидативний стрес, який кадмій, що не є перехідним металом, викликає опосередковано (Liu et al., 2009). Прооксидантні ефекти кадмію можуть бути наслідком інгібування ферментів антиоксидантної системи та дихального ланцюга (Kukongviriyapan et al., 2016). Крім того, іони кадмію можуть витісняти іони ессенціальних металів, в тому числі іони заліза, з активних центрів ферментів, викликати деградацію гемопротеїнів крові та інших тканин з подальшим накопиченням вільного гему та іонів заліза, які є учасниками вільнорадикальних процесів (Chiabrando et al., 2014).

© Нікітченко І.В., Рибальченко Т.П., Бараннік Т.В., Павиченко О.В., 2020
DOI: 10.26565/2075-5457-2020-34-2

Основним механізмом детоксикації сполук важких металів, зокрема кадмію, вважають їх зв'язування тіол-багатими білками металотіонеїнами (МТ) з подальшим виведенням з організму. Гени МТ регулюються іонами цинку, останні за умов інтоксикації кадмієм активно витісняються з комплексів з МТ (Ejnik et al., 2010).

Встановлено, що за рахунок високої спорідненості до тіолових груп монооксид нітрогену NO також може активно витісняти іони цинку з МТ (Karim, Petering, 2017), що призводить до індукції синтезу МТ *de novo* (Katakai et al., 2001). Дані щодо прямої взаємодії іонів кадмію, металотіонеїнів та монооксиду нітрогену досить суперечливі. В літературі обговорюється як можливість переносу NO с нітрозоглутатіону на МТ з виходом іонів цинку залежно від рівню кисню у середовищі, так і низька здатність NO, але спроможність його метаболітів до прямої взаємодії з іонами цинку або кадмію у складі МТ (Zhu et al., 2010). Окрім впливу на обмін металів, NO виявляє антиоксидантні властивості, а також може знижувати рівень ліпофільного прооксиданта вільного гему шляхом його нітрозилювання та активації ферментів його деградації (Bloodsworth et al., 2000). Все це дозволяє розглядати монооксид нітрогену як перспективний засіб корекції розвитку оксидативного стресу за інтоксикації іонами кадмію.

З огляду на вищенаведене, **метою цієї роботи** стало дослідження впливу донорів NO-радикалів на прооксидантно-антиоксидантний стан тканин щурів за умов оксидативного стресу, спричиненого введенням хлориду кадмію.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 160–200 г. Хлорид кадмію вводили підшкірно у дозі 14 мг/кг маси тіла. Нітропрусид натрію (sodium nitroprusside, SNP) вводили внутрішньочеревинно в дозі 1 мг/кг маси тіла за 30 хв до ін'єкції $CdCl_2$. L-аргінін (Arg, наважку L-аргініну розчиняли в 1 N HCl, нейтралізували розчин амінокислоти 2 N NaOH і доводили до потрібного об'єму 0,9 % NaCl) вводили внутрішньочеревинно в дозі 600 мг/кг маси тіла за 30 хв до ін'єкції $CdCl_2$. Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм 0,9% NaCl. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 2 год або 24 год після введення хлориду кадмію. Експерименти проводились з дотриманням Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986, Директиви ЄЕС №609 від 24.11.1986 і наказ МОЗ України №690 від 23.09.2009).

Об'єктами дослідження були сироватка крові та гомогенати печінки, нирок та селезінки. Органи перфузували 0,9 % NaCl *in situ*. Наважку органу гомогенізували в 4 об'ємах 0,1 М К-Na-фосфатного буфера, pH 7,4. Гомогенат фільтрували і заморожували в рідкому азоті в поліетиленових ампулах по 0,6 мл. Перед експериментом ампули відігрівали у водяній бані при 37°С. Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) визначали спектрофотометрично за різницею поглинання при 535 та 520 нм продукту реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК), як описано в роботі (Ohkawa et al., 1979). Вміст ГПЛ виражали в еквівалентних кількостях малонового діальдегіду (МДА), використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $1{,}56 \cdot 10^5$ $М^{-1} \cdot см^{-1}$. Вимірювання швидкості накопичення МДА при спонтанному перекисному окисненні ліпідів (СПОЛ) в гомогенатах органів проводили, як описано в роботі (Владимиров, Арчаков, 1972), і виражали у нмоль МДА/мг білка за 20 хв інкубації. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали спектрофотометрично при 305 нм за кількістю утвореного комплексу з алоксаном (Patterson, Lazarow, 1955) і виражали у мкмоль/г тканини. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) визначали в сироватці крові флуориметрично за швидкістю відновлення NAD^+ (Иванов и др., 1974) та виражали в нмоль NADH/хв на 1 мл сироватки. Активність каталази (КАТ, КФ 1.11.1.6) визначали спектрофотометрично (240 нм) за швидкістю зменшення кількості пероксиду водню, як описано (Beavchamp, Fridovich, 1971), і виражали в мкмоль H_2O_2/хв на 1 мг білка. Активність Cu,Zn-супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали спектрофотометрично (560 нм) за ступенем інгібування реакції відновлення нітротетразолієвого синього (НТС) супероксидними радикалами, що генеруються у ксантиноксидазній реакції (Beavchamp, Fridovich, 1971). За одиницю СОД активності брали 50 % інгібування швидкості відновлення НТС і виражали в ум.од./хв. на 1 мг білка. Вміст протеїну визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959).

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Past (Hammer et al., 2001). Тип розподілу одержаних даних визначали за допомогою *W*-критерію Шапіро–Уілка. Залежно від типу розподілу проводився розрахунок середніх значень та стандартної помилки або

медіан та квартилей, порівняння показників у різних групах проводили з використанням, відповідно, *t*-критерію Стьюдента або непараметричного *U*-критерію Манна-Уітні. Розходження вважали статистично значущими при $p<0,05$.

Результати і обговорення

У сироватці крові оцінювали показники розвитку оксидативного стресу та пошкодження клітин. Через 2 год після введення хлориду кадмію вміст гідропероксидів ліпідів в сироватці крові не змінювався, а за добу підвищувався в 1,8 рази (табл. 1). Подібна динаміка ТБК-активних продуктів в сироватці крові після введення хлориду кадмію отримана також в роботі (Павиченко, Калиман, 2003). Зростання рівня продуктів ліпопероксидації після ін'єкції $CdCl_2$ свідчить про активацію вільно-радикальних процесів у кров'яному руслі. Відомо, що оксидативний стрес відіграє важливу роль у токсичних ефектах іонів кадмію в різних клітинах. Більшість даних літератури свідчить про опосередковану участь кадмію, як неперехідного металу, в розвитку оксидативного стресу: через вивільнення іонів заліза, інгібування антиоксидантної системи, накопичення вільного гему в тканинах тощо (Jurczuk et al., 2004; Павиченко, Калиман, 2003; Kaliman et al., 2008).

Таблиця 1.

Вміст ГПЛ (нмоль МДА/мг білка) та активність лактатдегідрогенази (нмоль NADH/хв на мл сироватки) в сироватці крові щурів після введення $CdCl_2$, сумісного введення $CdCl_2$ і нітропрусиду натрію або L-аргініну (*M*±*m* або *Me* (25%;75%), *n*=5–6, * – $p<0,05$ відносно контролю; # – $p<0,05$ відносно $CdCl_2$ через 24 год)

Показник	Контроль	$CdCl_2$	SNP+$CdCl_2$	L-Arg+$CdCl_2$	SNP	L-Arg
2 год						
ГПЛ	1,03±0,10	1,05±0,20	1,02±0,19	1,11±0,08	1,54±0,16*	1,18±0,06
ЛДГ	0,38 (0,26÷0,58)	0,48 (0,46÷0,62)	0,52 (0,51÷0,62)	0,57 (0,44÷0,88)	0,51 (0,49÷0,65)	0,48 (0,38÷0,64)
24 год						
ГПЛ	1,03±0,10	1,93±0,31*	1,20±0,17	1,09±0,27	1,18±0,15	0,87±0,17
ЛДГ	0,38 (0,26÷0,58)	3,76* (0,90÷9,6)	1,00* (0,88÷3,41)	0,66*# (0,51÷0,81)	0,45 (0,35÷0,47)	0,43 (0,36÷0,46)

Попереднє введення донорів монооксиду азоту нітропрусиду натрію або L-аргініну запобігало підвищенню вмісту ГПЛ під впливом кадмію. Відомо, що NO виявляє антиоксидантні властивості, обумовлені, по-перше, його здатністю безпосередньо взаємодіяти з алкоксильними і пероксильними радикалами, перериваючи у такий спосіб ланцюги вільнорадикальних реакцій (Chamulitrat, 1998). По-друге, NO утворює нітрозильні комплекси з гемовим залізом, обмежуючи його участь в окисно-відновних процесах (Меньщикова и др., 2006). Введення тільки нітропрусиду натрію призводило до підвищення вмісту ГПЛ в сироватці крові через 2 год після ін'єкції цього донору, що, ймовірно, обумовлено прооксидантними властивостями самого SNP (Nazari et al., 2012). Через добу дії SNP вміст гідропероксидів ліпідів не відрізнявся від контрольних значень. L-аргінін не впливав на базальний рівень ГПЛ в сироватці крові.

Активність ЛДГ в сироватці крові в перші години дії хлориду кадмію не змінилась, а через 24 год зросла майже в 10 разів (табл. 1). Різке підвищення активності цього ферменту у кров'яному руслі може свідчити про пошкодження клітин крові та інших тканин за умов надходження до організму хлориду кадмію. Через добу після сумісного введення L-аргініну і солі кадмію активність ЛДГ складала 170% від контрольного рівня, що значно нижче активності ферменту за дії тільки кадмію. За введення нітропрусиду натрію активність ЛДГ після ін'єкції $CdCl_2$ залишалась у 2,6 рази вище контролю.

Іони кадмію можуть надходити і накопичуватись у різних органах, але основними мішенями є печінка і нирки (Swiergosz-Kowalewska, 2001). Показано, що за гострої інтоксикації іони кадмію транспортуються переважно до печінки, де утворюють комплекси з металотіонеїнами. Останні

згодом вивільнюються і переносяться кров'ю до нирок, де поглинаються рецептор-опосередкованим ендоцитозом в ниркових проксимальних канальцях (Sabolić et al., 2010).

У печінці через 2 год після введення хлориду кадмію не виявлено змін вмісту ГПЛ, однак за добу цей показник збільшився в 2,1 рази (табл. 2). Раніше в нашій роботі (Kaliman et al., 2008) показано, що введення хлориду кадмію у тій самій дозі призводить до накопичення прооксиданту гему в клітинах печінки. Автори роботи (Djukic-Cosic et al., 2008) продемонстрували, що активація вільнорадикальних процесів під впливом іонів кадмію позитивно корелює зі значним підвищенням в клітинах печінки вмісту заліза, яке може залучатись до утворення високореакційного гідроксильного радикалу в реакції Фентона.

Таблиця 2.

Вміст ГПЛ (нмоль МДА/мг білка), рівень спонтанного ПОЛ (нмоль МДА/мг білка), вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини), активність СОД (ум.од./мг білка за хв) та каталази (КАТ, мкмоль H_2O_2/мг білка за хв) у печінці щурів після введення $CdCl_2$ та сумісного введення $CdCl_2$ і нітропрусиду натрію (SNP) або L-аргініну (*M*±*m*, *n*=5–6, * – $p \leq 0{,}05$ відносно контролю)

Показник	Контроль	$CdCl_2$	SNP+$CdCl_2$	L-Arg+$CdCl_2$	SNP	L-Arg
2 год						
ГПЛ	0,39±0,04	0,65±0,13	0,83±0,17*	0,40±0,03	0,91±0,07*	0,51±0,04
СПОЛ	1,49±0,26	1,83±0,22	2,03±0,37	1,27±0,24	1,84±0,22	2,27±0,38
GSH	2,22±0,49	3,34±0,48	2,84±0,69	1,93±0,33	2,38±0,44	3,51±0,70
СОД	2188±69	2136±192	2469±62*	2423±94	2684±110*	2047±228
КАТ	837±79	771±67	728±50	625±100	735±146	543±93*
24 год						
ГПЛ	0,39±0,04	0,98±0,19*	0,47±0,08	0,94±0,20*	1,09±0,16*	0,55±0,09
СПОЛ	1,22±0,14	0,90±0,13	1,54±0,22	1,33±0,17	2,29±0,10*	1,72±0,21
GSH	2,25±0,09	4,95±0,65*	4,18±0,32*	4,66±0,54*	2,16±0,53	2,93±0,68
СОД	2188±69	3012±187*	3092±102*	1893±142	2641±16*	2031±143
КАТ	837±79	571±39*	651±102	519±50*	685±108	709±85

Попереднє введення SNP спричинило більш раннє підвищення вмісту ГПЛ у печінці (у 2,1 рази через 2 год після ін'єкції $CdCl_2$), а за добу цей показник повертався до контрольного рівня. В печінці (аналогічно як і у сироватці крові) введення тільки SNP призвело до зростання вмісту гідропероксидів ліпідів через 2 год після ін'єкції, яке зберігалось і через добу. Введення L-аргініну не впливало на базальний рівень гідропероксидів ліпідів і не змінювало динаміку вмісту ГПЛ в печінці після ін'єкції $CdCl_2$.

Інтенсивність спонтанного ПОЛ в печінці не змінювалась в жодний з термінів після введення $CdCl_2$, в тому числі на фоні донорів NO. За введення L-аргініну базальний рівень цього показника в печінці не відрізнявся від контролю, але підвищувався в 2,2 рази через 24 год за введення SNP.

Відновлений глутатіон є основним низькомолекулярним клітинним антиоксидантом, який бере участь в окисно-відновних процесах, у підтриманні тіол-дисульфідного стану білків. У зв'язку з високою спорідненістю іонів кадмію до сульфгідрильних груп, GSH розглядається як перша лінія захисту від кадмієвої токсичності (Kukongviriyapan et al., 2016). За нашими даними (табл. 2), вміст відновленого глутатіону зберігався на контрольному рівні через 2 год після введення $CdCl_2$, а через добу підвищився більш ніж у 2 рази, в тому числі за попереднього введення донорів NO. Можна припустити, що зростання вмісту GSH через добу відбулося у результаті активації його синтезу. Відомо, що індукція ферментів синтезу GSH здійснюється через антиоксидантні елементи відповіді ARE і це розглядається як адаптивна реакція клітин на зниження рівню глутатіону (Bell et al., 2011).

Ще однією мішенню іонів кадмію вважаються ферменти антиоксидантної системи. Супероксиддисмутазна активність в печінці не змінювалась в перші години після введення хлориду кадмію, а через добу збільшилась в 1,4 рази у порівнянні з контрольною групою тварин. Це

підвищення активності СОД, ймовірно, обумовлено синтезом ферменту *de novo* в результаті накопичення його субстрату, супероксиданіону (Меньщикова и др., 2006).

Попереднє введення SNP спричинило зростання СОД активності вже через 2 год після ін'єкції $CdCl_2$, а за добу цей показник перевищував контрольний рівень у 1,4 рази. Подібна динаміка активності СОД спостерігалась і після введення тільки SNP. Аналогічні дані щодо активуючого впливу SNP на базальний рівень СОД активності були отримані нами раніше (Nikitchenko et al., 2005). Введення L-аргініну, напроти, не впливало на цей показник і запобігало підвищенню СОД активності під впливом $CdCl_2$. Різні ефекти донорів NO на активність СОД можна пов'язати з появою АФК за введення SNP, під час спонтанного розкладання якого разом з NO утворюються також іони заліза, пероксид водню і супероксид-аніон (Quan et al., 2017).

Каталазна активність не змінювалась у печінці через 2 год після введення хлориду кадмію, а через 24 год знизилась на 32 % у порівнянні з контролем. Донори NO виявили різні ефекти на активність каталази. L-аргінін не впливав на динаміку активності ферменту після ін'єкції $CdCl_2$, але викликав зниження (на 35 %) базальної активності через 2 год після введення. Нітропрусид, напроти, запобігав зниженню активності каталази під дією кадмію, але не змінював базальну активність ферменту. Зменшення активності каталази, що є гемопротеїном, може бути обумовлене дефіцитом нативного гему внаслідок зменшення його синтезу *de novo* та/або нітрозилювання гему за введення L-аргініну (Меньщикова и др., 2006).

Відомо, що активність СОД і каталази регулюються активними формами кисню: високі концентрації цих метаболітів спричинюють індукцію ферментів, однак ті самі АФК можуть пошкоджувати та інактивувати молекули цих антиоксидантних ферментів (Меньщикова и др., 2006). Зниження активності СОД і каталази в печінці, що також супроводжувалось підвищенням вмісту МДА, показано за умов хронічного надходження іонів кадмію до організму щурів (Jurczuk et al., 2004). Виявлене в нашій роботі підвищення активності СОД на фоні інгібування каталази може підсилювати окисне пошкодження клітин печінки за введення $CdCl_2$ через накопичення пероксиду водню і активації ліпопероксидації (Меньщикова и др., 2006).

Іони кадмію накопичуються в нирках внаслідок переважного поглинання зв'язаного з металотіонеїном кадмію в ниркових проксимальних канальцях. Інтерналізований комплекс металотіонеїн-Cd розпадається в лізосомах, вивільнюючи іони кадмію у цитозоль, де вони можуть активувати процеси вільно-радикального окиснення (Sabolić et al., 2010).

В наших дослідах не виявлено змін вмісту гідропероксидів ліпідів у нирках після ін'єкції $CdCl_2$ в жоден із досліджуваних термінів, в тому числі на фоні попереднього введення донорів NO (табл. 3). Рівень спонтанного ПОЛ не змінювався за введення кадмію та за сумісного введення L-аргініну і хлориду кадмію. Однак попереднє введення нітропрусиду натрію призводило до зростання інтенсивності спонтанного ПОЛ в 1,9 рази через 2 год після ін'єкції $CdCl_2$ з подальшою нормалізацією цього показника через добу.

Обидва донори NO спричинювали підвищення базального рівня спонтанного ПОЛ вже в перші години дії: за введення L-аргініну інтенсивність ПОЛ зростала в 1,6 рази, а SNP – в 1,5 рази. Підвищення під впливом ніпропрусиду натрію цього показника зберігалось і за добу. Відомо, що NO може виявляти не тільки антиоксидантні, але й прооксиданті властивості (Меньщикова и др., 2006). Вважається, що основні прооксидантні ефекти оксиду азоту обумовлені його взаємодією з супероксид-аніоном з утворенням потужного окислювального агенту пероксинітриту (Radi, 2013).

Вміст відновленого глутатіону у нирках не змінювався в жодній з експериментальних груп тварин (табл. 3).

Введення хлориду кадмію не впливало на активність СОД у нирках в перші години дії, але викликало підвищення активності через добу (в 1,5 рази), що аналогічно змінам у печінці. Введення SNP не змінювало динаміку СОД активності за дії $CdCl_2$, в той час як L-аргінін викликав зростання активності ферменту (в 1,5 рази) у перші години після сумісного введення з $CdCl_2$, з подальшим поверненням до контрольного рівня за добу. L-аргінін не впливав на базальний рівень СОД. Нітропрусид натрію, напроти, викликав підвищення активності ферменту за добу після ін'єкції. Останні результати узгоджуються з даними, отриманими нами раніше (Nikitchenko et al., 2005).

Дані літератури щодо впливу іонів кадмію на рівень оксиду азоту суперечливі, показано як підвищення, так і зниження його вмісту (Fouad et al., 2013; Chen et al., 2003). Один із шляхів накопичення оксиду азоту під впливом $CdCl_2$ в нирках – це індукція ферментів NO-синтаз (Soyupek et al., 2012). Введення субстрату L-аргініну в цих умовах може призводити до різкого підвищення

концентрації NO в клітинах і, як наслідок, до посилення генерації АФК, зокрема супероксид-аніону (Меньщикова и др., 2006).

Таблиця 3.

Вміст ГПЛ (нмоль МДА/мг білка), рівень спонтанного ПОЛ (нмоль МДА/мг білка), вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини), активність СОД (ум.од./мг білка за хв) та каталази (КАТ, мкмоль H_2O_2/мг білка за хв) у нирках щурів після введення $CdCl_2$ та сумісного введення $CdCl_2$ і нітропрусиду натрію (SNP) або L-аргініну (*M*±*m*, *n*=5–6, * – $p \leq 0,05$ відносно контролю)

Показник	Контроль	$CdCl_2$	SNP+$CdCl_2$	L-Arg+$CdCl_2$	SNP	L-Arg
2 год						
ГПЛ	0,55±0,04	0,56±0,06	0,55±0,05	0,44±0,04	0,62±0,08	0,61±0,08
СПОЛ	1,26±0,21	1,69±0,15	2,33±0,30*	1,79±0,45	1,86±0,14*	2,03±0,22*
ГSH	2,76±0,10	2,67±0,10	2,45±0,30	2,65±0,18	2,68±0,16	2,76±0,25
СОД	1999±191	2141±120	2477±342	3019±135*	2460±198	2348±197
КАТ	296±22	254±26	311±17	285±36	268±33	188±17*
24 год						
ГПЛ	0,55±0,04	0,47±0,05	0,53±0,04	0,59±0,04	0,56±0,05	0,57±0,05
СПОЛ	1,26±0,21	1,15±0,23	1,54±0,12	1,28±0,18	1,84±0,12*	1,68±0,12
ГSH	2,76±0,10	3,12±0,23	2,55±0,13	2,87±0,20	2,73±0,09	2,88±0,34
СОД	1999±191	2979±247*	2861±148*	2024±135	3267±65*	2269±150
КАТ	296±22	285±24	226±74	269±39	289±743	290±32

Каталазна активність в нирках не змінювалась після ін'єкції $CdCl_2$ в жоден із досліджуваних термінів, в тому числі на фоні попереднього введення донорів NO (табл. 3). Нітропрусид натрію також не впливав на базальну активність ферменту. Динаміка каталазної активності в нирках після введення L-аргініну була подібна до динаміки активності цього ферменту у печінці: зниження каталази на 36 % в перші години дії донору NO і нормалізація активності ферменту за добу.

Таблиця 4.

Вміст ГПЛ (нмоль МДА/мг білка), рівень спонтанного ПОЛ (нмоль МДА/мг білка), вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини), активність СОД (ум.од./мг білка за хв) та каталази (КАТ, мкмоль H_2O_2/мг білка за хв) у селезінці щурів після введення $CdCl_2$ та сумісного введення $CdCl_2$ і нітропрусиду натрію (SNP) або L-аргініну (*M*±*m*, *n*=5–6, * – $p \leq 0,05$ відносно контролю)

Показник	Контроль	$CdCl_2$	SNP+$CdCl_2$	L-Arg+$CdCl_2$	SNP	L-Arg
2 год						
ГПЛ	0,23±0,02	0,34±0,09	0,45±0,06*	0,41±0,04*	0,292±0,060	0,20±0,03
СПОЛ	1,63±0,08	1,31±0,22	1,66±0,58	1,90±0,23	1,54±0,33	2,15±0,37
ГSH	2,74±0,11	2,21±0,21	2,04±0,12*	2,56±0,24	2,37±0,21	2,64±0,28
СОД	817±71	647±63	793±103	898±65	719±61	891±37
Кат	50±10	52±5	46±5	76±6	71±7	69±8
24 год						
ГПЛ	0,23±0,02	0,48±0,08*	0,50±0,06*	0,34±0,05	0,38±0,06*	0,36±0,07
СПОЛ	1,63±0,08	1,66±0,40	2,33±0,38	1,34±0,25	1,68±0,31	1,17±0,12*
ГSH	2,74±0,11	2,35±0,26	2,16±0,15*	2,47±0,33	2,31±0,14	2,72±0,23
СОД	817±71	747±103	881±65	967±17	681±34	739±57
Кат	50±10	56±1	67±7	61±12	84±4*	76±2

У селезінці вміст гідропероксидів ліпідів не відрізнявся від контролю через 2 год після введення хлориду кадмію, але зростав у 2,2 рази за добу (табл. 4). Сумісне введення кадмію з донорами NO вже через 2 год призводило до підвищення рівня ГПЛ (у 2 і 1,8 рази відповідно після ін'єкції SNP і L-аргініну), який зберігався за добу тільки після введення нітропрусиду натрію. Слід зазначити, що введення тільки SNP, на відміну від L-аргініну, призводило до збільшення базального рівня ГПЛ у 2,2 рази та підвищення активності каталази за добу. Накопичення ГПЛ у селезінці може свідчити про посилене надходження до селезінки еритроцитів, які мають окисні пошкодження внаслідок дії іонів кадмію та вільного гему (Павиченко, Калиман, 2003).

Інтенсивність спонтанного ПОЛ в селезінці не змінювалась після ін'єкції $CdCl_2$ в жоден із досліджуваних термінів, в тому числі на фоні попереднього введення донорів NO. Лише через 24 год після введення L-аргініну спостерігалось зниження інтенсивності ПОЛ на 35 % у порівнянні з контролем (табл. 4).

В селезінці відзначено зниження вмісту відновленого глутатіону через 2 год після введення хлориду кадмію на фоні SNP (на 26 %), яке зберігалося і через добу (табл. 4). У інших експериментальних групах цей показник не відрізнявся від контрольного рівня. Активності СОД і каталази в селезінці не змінювались після ін'єкції хлориду кадмію в жоден із досліджуваних термінів, в тому числі на фоні попереднього введення донорів NO.

Отже, нітропрусид натрію посилював у селезінці розвиток оксидативного стресу під впливом іонів кадмію, про що свідчить більш раннє накопичення ГПЛ і зниження рівню відновленого глутатіону, які зберігались і через добу після дії металу. Аргінін спричинював аналогічне підвищення вмісту ГПЛ у перші години дії кадмію без змін інших показників.

Висновки

Введення хлориду кадмію спричинило низку порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу, більшість з яких відбувались через добу. Накопичення продуктів ліпопероксидації встановлено у сироватці крові, печінці та селезінці щурів. Посилення прооксидантних процесів у цих тканинах може бути результатом надходження до них іонів кадмію та продуктів гемолізу. В антиоксидантній системі суттєві зміни спостерігались під впливом кадмію лише в печінці: збільшення вмісту відновленого глутатіону та СОД активності і зниження активності каталази.

Попередник монооксиду нітрогену L-аргінін не змінював базальний рівень прооксидантно-антиоксидантних показників, а також у більшості випадків не впливав на їх динаміку після введення хлориду кадмію в органах, що досліджувались.

Прямий донор NO нітропрусид натрію діяв у печінці та селезінці значною мірою як прооксидант. В печінці введення тільки нітропрусиду, так само як і сумісне введення SNP і $CdCl_2$, призводило до активації вільнорадикальних процесів вже в перші години. У селезінці сумісне введення SNP і солі кадмію також спричинювало більш ранній розвиток оксидативного стресу, про що свідчило збільшення рівню гідропероксидів ліпідів і зниження вмісту відновленого глутатіону.

Отже, введення нітропрусиду натрію та L-аргініну в обраних дозах не мало вираженого коригувального впливу на кадмій-індукований оксидативний стрес у печінці, нирках та селезінці. Однак у крові обидва донори NO ефективно запобігали накопиченню продуктів ліпопероксидації за введення $CdCl_2$, крім того, L-аргінін суттєво зменшував вихід лактатдегідрогенази, що може свідчити про захист клітин крові та судин від пошкоджень за дії іонів кадмію.

Список літератури / References

Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. (1972). Перекисное окисление липидов в биомембранах. М.: Наука. 252 с. [Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. (1972). *Lipid peroxidation in biomembranes*. Moscow: Nauka. 252 p.]

Иванов И.И., Коровкин Б.Ф., Маркелов И.М. (1974). Введение в клиническую энзимологию. Л.: Медицина. 350 с. [Ivanov I.I., Korovkin B.F., Markelov I.M. (1974). *Introduction to clinical enzymology*. Leningrad: Medicina. 350 p.]

Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. (2006). Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма «Слово». 556 с. [Menshchikova Ye.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. et al. (2006). *Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants*. Moscow: The company "Slovo". 556 p.]

Павиченко О.В., Калиман П.А. (2003). Влияние хлорида кадмия на развитие оксидативного стресса в легких крыс. *Современные проблемы токсикологии, 3*, 39–42. [Pavychenko O.V, Kaliman P.A.

(2003). Effect of cadmium chloride on development of oxidative stress in rat lung. *Modern Problems of Toxicology, 3*, 39–42.]
Beavchamp C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay appliciable to acrylamide gels. *Anal. Biochem., 44*(1), 276–287. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8
Bell K.F., Fowler J.H., Al-Mubarak B. et al. (2011). Activation of Nrf2-regulated glutathione pathway genes by ischemic preconditioning. Oxid. Med. Cell. Longev., 2011, 689524. https://doi.org/10.1155/2011/689524
Bloodsworth A., O'Donnell V.B., Freeman B.A. (2000). Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20*(7), 1707–1715. https://doi.org/10.1161/01.atv.20.7.1707
Chamulitrat W. (1998). Nitric oxide inhibited peroxyl and alkoxyl radical formation with concomitant protection against oxidant injury in intestinal epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys., 355*(2), 206–214. https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0731
Chen L., Zhou J., Gao W., Jiang Y.Z. (2003). Action of NO and TNF-alpha release of rats with cadmium loading in malfunctiion of multiple system organ. *Sheng Li Xue Bao, 55*(5), 535–540.
Chiabrando D., Vinchi F., Fioritoet V. al. (2014). Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in Pharmacology, 5*, 24. https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00061
Djukic-Cosic D., Jovanovic M.C., Bulat Z.P. et al. (2008). Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *J. Trace Elem. Med. Biol., 22*(1), 66–72. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.024
Ejnik J., Shaw C.F.3rd, Petering D.H. (2010). Mechanism of cadmium ion substitution in mammalian zinc metallothionein and metallothionein alpha domain: kinetic and structural studies. *Inorg. Chem., 49*(14), 6525–6534. https://doi.org/10.1021/ic1003148
Fouad A.A., Al-Mulhim A.S., Gomaa W. (2013). Protective effect of cannabidiol against cadmium hepatotoxicity in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol., 27*(4), 355–363. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.07.001
Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica, 4*(1), 9.
Jurczuk M., Brzóska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J. et al. (2004). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem. Toxicol., 42*(3), 429–438. https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.10.005
Kaliman P., Nikitchenko I., Pavychenko O. (2008). Action of cadmium chloride on some parameters of heme metabolism in rats under modulation of NO radicals level. *Annales Universitatatis Mariae Curie-Sklodowska, XIX*(2), 125–128.
Karim M.R., Petering D.H. (2017). Detection of Zn^{2+} release in nitric oxide treated cells and proteome: dependence on fluorescent sensor and proteomic sulfhydryl groups. *Metallomics, 9*(4), 391–401. https://doi.org/10.1039/C6MT00220J
Katakai K., Liu J., Nakajima K. et al. (2001). Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc bound to MT. *Toxicol. Lett., 119*(2), 103–108. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(00)00301-5
Kukongviriyapan U., Apaijit K., Kukongviriyapan V. (2016). Oxidative stress and cardiovascular dysfunction associated with cadmium exposure: beneficial effects of curcumin and tetrahydrocurcumin. *Tohoku J. Exp. Med., 239*(1), 25–38. https://doi.org/10.1620/tjem.239.25
Liu J., Qu W., Kadiiska M.B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol., 238*(3), 209–214. https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.029
Miller G.L. (1959). Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem., 31*(5), 964–966. https://doi.org/10.1021/ac60149a611
Nazari Q.A., Mizuno K., Kume T. et al. (2012). In vivo brain oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice. *J. Pharmacol. Sci., 120*(2), 105–111. https://doi.org/10.1254/jphs.12143FP
Nikitchenko I., Strel'chenko K., Inshina N., Kaliman P.A. (2005). Effect of sodium nitroprusside on heme oxygenase activity in some organs of rats. *Annales Universitatatis Mariae Curie-Sklodowska, XVIII*(2), 105–108.
Ohkawa H., Ohahi N., Jadi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem., 95*(2), 351–358. https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3
Patterson J.W., Lazarow A. (1955). Determination of glutathione / In: D.Glick, editor. *Methods of biochemical analysis, 2*, 259–279. https://doi.org/10.1002/9780470110188.ch9

Quan Y.Y., Liu Y.H., Lin C.M. et al. (2017). Peroxynitrite dominates sodium nitroprusside-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget, 8*(18), 29833–29845. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16164
Radi R. (2013). Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J. Biol. Chem., 288*(37), 26464–26472. https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472936
Sabolić I., Breljak D., Skarica M., Herak-Kramberger C.M. (2010). Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals, 23*(5), 897–926. https://doi.org/10.1007/s10534-010-9351-z
Soyupek S., Oksay T., Sütçü R. et al. (2012) The effect of cadmium toxicity on renal nitric oxide synthase isoenzymes. *Toxicol. Ind. Health, 28*(7), 624–628. https://doi.org/10.1177/0748233711420467
Swiergosz-Kowalewska R. (2001). Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc. Res. Tech., 55*(3), 208–222. https://doi.org/10.1002/jemt.1171
Tokumoto M., Lee J.Y., Satoh M. (2019). Transcription factors and downstream genes in cadmium toxicity. *Biol. Pharm. Bull., 42*(7), 1083–1088. https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00204
Zhu J., Meeusen J., Krezoski S., Petering D.H. (2010). Reactivity of Zn-, Cd-, and apo-metallothionein with nitric oxide compounds: in vitro and cellular comparison. *Chem. Res. Toxicol., 23*(2), 422–431. https://doi.org/10.1021/tx900387k

The effect of nitrogen monoxide donors on the indexes of cadmium-induced oxidative stress in different rat tissues

I.V. Nikitchenko, T.P. Rybalchenko, T.V. Barannik, O.V. Pavychenko

Oxidative stress is considered to be the main mechanism of cadmium ions toxic effect on the cells and is caused by cadmium, as a non-transition metal, indirectly. Oxidative damage to cells due to the action of cadmium ions is tissue-specific and is associated with the antioxidant system inhibition, free heme accumulation and essential metals substitution in metalloproteins. Nitrogen monoxide (NO) exhibits high affinity for heme and proteins and peptides sulfhydryl groups, known to be the main molecular targets for cadmium ions. Taking all the above-mentioned into account, the aim of this work was to study the effect of NO radicals donors on the prooxidant-antioxidant state of mammalian tissues under oxidative stress caused by cadmium chloride administration *in vivo*. Male Wistar rats weighing 160–200 g were used in the study. $CdCl_2$ was administered subcutaneously at a dose of 14 mg/kg body weight. The direct donor of the NO radical sodium nitroprusside (SNP, 1 mg/kg mass) and the substrate of the NO synthase reaction L-arginine (600 mg/kg mass) were administered intraperitoneally. In order to study the corrective action, donors of the NO radical were injected 0.5 h before the cadmium salt. The objects of investigation were blood plasma and liver, kidneys and spleen homogenates of rats. The cadmium chloride treatment caused a number of prooxidant-antioxidant balance disorders, most of which were revealed a day after injection. The accumulation of lipid peroxidation products was found in rat serum, liver, and spleen. The enhancement of prooxidant processes in these tissues may originate from cadmium ions and hemolysis products entry. In the antioxidant system, significant changes were observed under cadmium action only in the liver: an increase in the reduced glutathione content and SOD activity and a decrease in catalase activity. The precursor of nitric oxide L-arginine did not change the basal level of prooxidant-antioxidant parameters, and in most cases did not affect their dynamics in the organs studied after cadmium chloride administration. A direct NO donor, sodium nitroprusside, acted in liver and spleen mostly as a prooxidant. In liver, the injection of only nitroprusside, as well as the combined administration of SNP and $CdCl_2$, led to free radical processes activation just in two hours. In spleen, the combined treatment by SNP and cadmium salt also caused an earlier development of oxidative stress, as witnessed by an increase in lipid hydroperoxides level and a decrease in reduced glutathione content. Therefore, the injection of a direct NO donor, sodium nitroprusside, and a substrate of NO synthase, L-arginine, in selected doses has insignificant corrective action on cadmium-induced oxidative stress in the liver, kidneys and spleen. However, in blood both donors of NO effectively prevented the accumulation of lipid peroxidation products under $CdCl_2$ treatment; in addition, L-arginine significantly reduced the lactate dehydrogenase release, which may indicate blood cells and blood vessels protection from the damage caused by cadmium ions.

Key words: *cadmium, oxidative stress, nitrogen monoxide, antioxidant system.*

About the authors:
I.V. Nikitchenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, https://orcid.org/0000-0001-5858-3382
T.P. Rybalchenko – Kharkiv State Academy of Physical Culture, Klochkivska str, 99, Kharkiv, Ukraine, 61022, tanyusic@ukr.net, https://orcid.org/0000-0003-3107-0290
T.V. Barannik – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, tbarannik@karazin.ua, http://orcid.org/0000-0002-8123-3871

O.V. Pavychenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, olga.pavichenko@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-1396-790X

Влияние доноров монооксида азота на показатели кадмий-индуцированного оксидативного стресса в разных органах крыс

И.В. Никитченко, Т.П. Рыбальченко, Т.В. Баранник, О.В. Павиченко

Основным механизмом токсического действия ионов кадмия на клетки считают оксидативный стресс, который кадмий, не являясь переходным металлом, вызывает опосредованно. Окислительные повреждения клеток при действии ионов кадмия являются тканеспецифическими и связаны с ингибированием антиоксидантной системы, накоплением свободного гема, замещением эссенциальных металлов в металлопротеинах. Монооксид азота (NO) проявляет высокое сродство к гему и сульфгидрильным группам белков и пептидов, которые являются основными молекулярными мишенями для ионов кадмия. В связи с вышесказанным, целью данной работы было исследование влияния доноров NO-радикалов на прооксидантно-антиоксидантное состояние тканей млекопитающих в условиях оксидативного стресса, вызванного введением *in vivo* хлорида кадмия. Исследования проводились на крысах-самцах линии Вистар массой 160–200 г. $CdCl_2$ вводили подкожно в дозе 14 мг/кг массы тела. Прямой донор NO-радикала нитропруссид натрия (SNP, 1 мг/кг массы) и субстрат NO-синтазной реакции L-аргинин (600 мг/кг массы) вводили внутрибрюшинно. Для исследования корректирующего влияния доноры NO-радикала вводили за 0,5 ч до инъекции соли кадмия. Объектами исследования были плазма крови и гомогенаты печени, почек и селезенки крыс. Введение хлорида кадмия вызвало ряд нарушений прооксидантно-антиоксидантного баланса, большинство из которых происходили через сутки. Накопление продуктов липопероксидации установлено в сыворотке крови, печени и селезенке крыс. Усиление прооксидантных процессов в данных тканях может быть результатом поступления в них ионов кадмия и продуктов гемолиза. В антиоксидантной системе существенные изменения наблюдались под влиянием кадмия только в печени: увеличение содержания восстановленного глутатиона и СОД активности и снижение активности каталазы. Предшественник оксида азота L-аргинин не изменял базальный уровень прооксидантно-антиоксидантных показателей, а также в большинстве случаев не влиял на их динамику после введения хлорида кадмия в органах, которые исследовались. Прямой донор NO нитропруссид натрия действовал в печени и селезенке в значительной степени как прооксидант. В печени введение только нитропруссида, так же, как и совместное введение SNP и $CdCl_2$, приводило к активации свободнорадикальных процессов уже в первые часы. В селезенке совместное введение SNP и соли кадмия также вызывало более раннее развитие оксидативного стресса, о чем свидетельствовало возрастание уровня гидроперекисей липидов и снижение содержания восстановленного глутатиона. Следовательно, введение прямого донора NO нитропруссида натрия и субстрата NO-синтазы L-аргинина в выбранных дозах не имело выраженного корректирующего воздействия на кадмий-индуцированный оксидативный стресс в печени, почках и селезенке. Однако в крови оба донора NO эффективно предотвращали накопление продуктов липопероксидации при введении $CdCl_2$, кроме того, L-аргинин существенно уменьшал выход лактатдегидрогеназы, что может свидетельствовать о защите клеток крови и сосудов от повреждений при действии ионов кадмия.

Ключевые слова: *кадмий, оксидативный стресс, монооксид азота, антиоксидантная система.*

Об авторах:
И.В. Никитченко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, https://orcid.org/0000-0001-5858-3382
Т.П. Рыбальченко – Харьковская государственная академия физической культуры, ул. Клочковская, 99, Харьков, Украина, 61022, tanyusic@ukr.net, https://orcid.org/0000-0003-3107-0290
Т.В. Баранник – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tbarannik@karazin.ua, http://orcid.org/0000-0002-8123-3871
О.В. Павиченко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, olga.pavichenko@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-1396-790

Представлено: Н.І.Горбенко / **Presented by: N.I.Gorbenko**
Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky
Подано до редакції / *Received: 10.04.2020*