

УДК 612.111.11+612.71.28

## ВПЛИВ КАРНОЗИНУ НА ВМІСТ МІОГЛОБІНОВОЇ м-РНК У СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГЕМІЧНОЇ ГІПОКСІЇ

В.Коробов, О.Коробова, М.Великий

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського,4, м. Львів 79005 Україна*

Розвиток гемічної гіпоксії зумовлений зменшенням кисневої ємності крові та м'язів у результаті переходу дихальних гемопротейнів у нефункціональний стан. У випадку гемічної гіпоксії, індукованої поступанням в організм нітриту натрію, спостерігається метгемоглобіно- та мет-міоглобіноутворення. У разі збільшення вмісту окислених форм переносників кисню спостерігають метаболічні порушення транспортної та утилізуючої систем кисню, оскільки ланцюговий процес окислення  $\text{HbO}_2$  та  $\text{MbO}_2$  супроводжується генерацією активних метаболітів кисню:  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В значній мірі глибина порушень залежить від токсичної дії таких вільних радикалів як  $\text{NO}^\bullet$  і  $\text{NO}_2^\bullet$ , що утворюються при відновленні нітрит-іонів. Зміна стаціонарних концентрацій вільних радикалів супроводжується інтенсифікацією процесів перекисного окислення ліпідів [3, 5], пошкодженням білків, порушенням цілостності клітинних і субклітинних структур, роз'єднанням дихання і окисного фосфорилування мітохондрій, інгібуванням транспорту електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій, зниженням рівня АТФ у крові і клітинах тканин [12].

Серед продуктів трансформації оксиду азоту надзвичайну токсичність має пероксинітрит ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), утворений при взаємодії  $\text{O}_2^-$  з  $\text{NO}$ , який здатний викликати одноланцюгові розриви в ДНК [20, 16].

Суттєвий внесок у цитотоксичну дію пероксинітриту вносить  $\text{OH}^-$ -радикал, який утворюється в результаті нефентоновської реакції при зниженні рН [17], що має місце при гострих нітритних інтоксикаціях [13].

Ці факти свідчать про широкий спектр негативної дії  $\text{NO}$  і продуктів його трансформації на біомакромолекули і, без сумніву, на процеси їхнього утворення. Проте до сих пір це питання залишається невивченим. Враховуючи ключову роль матричного синтезу біополімерів у процесах формування стрес-лімітуючих механізмів, ми вважали за доцільне провести дослідження впливу гемічної гіпоксії на рівень міоглобінової мРНК і оцінити ефективність протекторної дії карнозину, враховуючи його антиоксидантні властивості.[3].

Механізми розвитку та компенсації гемічної форми гіпоксії за участю системи транспорту газів досліджені достатньо повною мірою лише на рівні метгемоглобіноутворення [13]. У літературі нема даних про вплив

метгемоглобіноутворювачів на процеси міоглобіногенезу і функціональний стан цього дихального гемопротеїну м'язів. Проте очевидним є той факт, що, крім зниження кисневої ємності крові, метміоглобіноутворення приводить до дезактивації ланки депонування кисню і створює передумови для розвитку критичних гіпоксичних станів в організмі. Запобігання розвитку таких станів і корекція відповідних метаболічних порушень є одним з актуальних завдань сучасної біохімії та медицини. Оскільки гемічна гіпоксія супроводжується посиленою активністю вільнорадикальних процесів, то, є перспективно використовувати за таких умов природні антиоксиданти. Для корекції функціональних порушень у системі транспорту газів у разі нітритної інтоксикації ми використовували співлокалізований з міоглобіном м'язовий дипептид карнозин ( $\beta$ -аланіл-L-гістидин), антиоксидантні властивості якого показані в працях [3-5].

Дослідження проводили на статевозрілих безпородних білих щурах-самцях, масою 220-260 г, які утримували в умовах віварію.

Дослідних тварин ділили на такі групи: контрольні тварини; тварини з експериментальною гемічною гіпоксією, яку спричинювали підшкірним введенням водного розчину  $\text{NaNO}_2$  з розрахунку 20, 50 і 60 мг/кг маси тварини за 50 хв до декапітації; тварини, які отримували карнозин внутрішньочеревно дозою 70 мг/кг маси тіла за 30 хв до декапітації; тварини, яким після отримання водного розчину карнозину вводили розчин  $\text{NaNO}_2$  у поданих вище концентраціях.

Сумарну РНК виділяли з використанням гуанідинізоціанату із гомогенатів тканини (попередньо заморожених у рідкому азоті) [6].

Дот-гібридизацію ДНК-РНК на нейлонових фільтрах ("Amersham", Англія) проводили між кДНК міоглобінового гена у складі плазмиди pBR-322 (люб'язно наданої лабораторією Бланштота) [15] та полі-А-РНК, міченими термінальною кіназною реакцією радіоактивним  $^{32}\text{P}$  АТР [10].

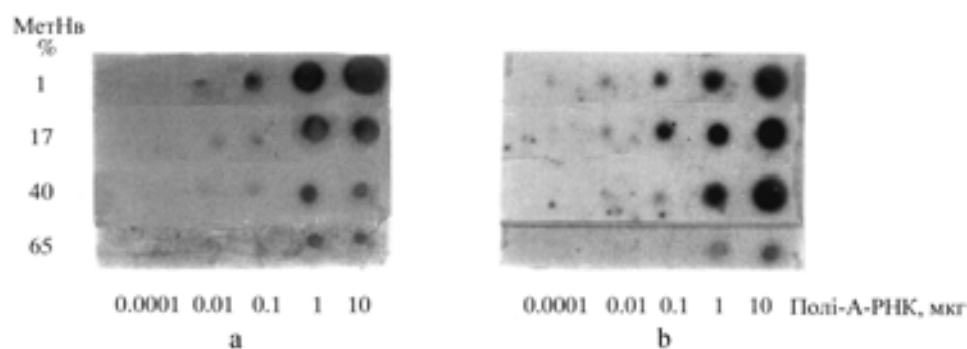
Використовуючи прийом молекулярної гібридизації ми дослідили вміст міоглобінової м-РНК в міоцитах скелетних м'язів щурів, яких піддавали нітритній інтоксикації. Результати гібридизаційного аналізу показані на рисунку а. Як видно радіоавтографів, кількість міоглобінової м-РНК у міоцитах зменшується із збільшенням відсоткового вмісту метгемоглобіну. Радіоактивний сигнал зникає в гібридизаційному матеріалі у всіх випадках досліду, якщо використано полі-А-РНК у концентрації  $1 \cdot 10^{-4}$  мкг. У разі досягнення 40%-го вмісту метHb в еритроцитах піддослідних тварин значно зменшується інтенсивність радіоактивного сигналу в продуктах гібридизації при концентрації полі-А-РНК 0,01 мкг. У випадку досягнення 65%-го вмісту метгемоглобіну простежується значне зменшення інтенсивності радіоактивного сигналу для всіх використаних у гібридизації концентрацій полі-А-РНК. Отже, у міру інтенсифікації процесів метгемоглобіноутворення у міоцитах зменшується кількість міоглобінової мРНК. Відомо, що активація процесів деградації біополімерів є однією з ранніх реакцій відповіді організму на дію стресових чинників [2]. Така короткочасна стадія катаболізму є суттєвим моментом у формуванні адаптації до стресорних впливів, за яким настає стадія активації синтезу біополімерів [1].

Зменшення вмісту міоглобінової мРНК у міоцитах у разі нітритної інтоксикації може бути результатом як вибіркової, так і дисперсної активації РНКаз, що було виявлено при інших типах гіпоксії [9]. Можливо, однією з причин активації

РНКаз є лактоцидоз і зниження рН, якщо вводити в організм  $\text{NaNO}_2$  [11]. Ці процеси ускладнюються надмірним утворенням оксиду азоту за умов нітритної інтоксикації, що супроводжується вазоконстрикцією судин через активацію утворення ендотеліну [12]. Компенсаторна вазоконстрикція обмежує процеси вимивання лактату з міоцитів, унаслідок цього виникає стійкий ацидоз.

Очевидно, що зменшення вмісту міоглобінової мРНК у міоцитах у випадку гемічній гіпоксії, індукованої  $\text{NaNO}_2$ , відбувається в результаті пригнічення процесів транскрипції через модифікацію як транскрипційних транс-факторів, так і РНК-полімерази II.

Зіставлення інтенсивності радіоактивних сигналів гібридизаційного матеріалу кДНК міоглобінового гена з фракцією полі-А-РНК з м'язів тварин, яким вводили  $\text{NaNO}_2$  і за 30 хв до декапітації - розчин карнозину, свідчить про те, що дипептид запобігає зменшенню вмісту міоглобінової мРНК. Досить високу інтенсивність радіоактивного сигналу спостерігали у гібридизаційному матеріалі для всіх використаних в експерименті доз  $\text{NaNO}_2$ . У разі нітритної інтоксикації, коли відносний вміст окисненого нефункціонального гемоглобіну у крові піддослідних тварин становив 17%, інтенсивність радіоактивних сигналів контрольних і дослідних гібридів була однаковою. З досягненням у крові 40%-го вмісту метгемоглобіну інтенсивність сигналів зберігалась на високому рівні при концентрації полі-А-РНК 1 і 10 мкг у гібридизаційній суміші. Навіть у випадку досягнення 65%-го вмісту метгемоглобіну інтенсивність синтезу при цих концентраціях полі-А-РНК була дещо вищою, ніж у відповідних зразках без використання карнозину.



Радіоавтографи гібридів  $^{32}\text{P}$  cDNA міоглобінового гена і полі-А-РНК м'язів щурів у разі збільшення відсоткового вмісту метHb, індукованого уведенням  $\text{NaNO}_2$ .

а - без карнозину; б - з попереднім уведенням карнозину внутрішньочеревно.

На підставі результатів гібридизаційного аналізу можна зробити такий висновок: карнозин за умов гемічній гіпоксії забезпечує зберігання високого рівня міоглобінової м-РНК, про що свідчить утворення молекулярних гібридів з порівняно високою інтенсивністю радіоактивного сигналу в продуктах гібридизації (див. рисунок б).

Виявлений захисний ефект дипептиду можна пояснити як його антиоксидантними властивостями, що відображено нашими попередніми дослідженнями [8], так і його здатністю перехоплювати NO, подібно до здатності дипептиду вловлювати інші вільні радикали, наприклад, O<sub>2</sub><sup>-</sup> [14]. Вірогідно, що карнозин може втручатись у процеси трансформації NO, кількість якого зростає за умов нітритної інтоксикації в організмі ссавців і регулювати тривалість перебування цього радикала у вільному стані [7]. Отже, карнозин гальмує процеси утворення пероксинітриду, який, модифікуючи макромолекули, ініціює процеси їхньої деградації.

Антиоксидантна активність карнозину і його аналогів забезпечується наявністю імідазольного кільця. Оскільки імідазол пригнічує активність NO-синтази у скелетних м'язах [15], подібно до 7-нітраіндазола у нейронах мозку [18, 19], то можливо, що виявлена нами протекторна дія дипептиду зумовлена його здатністю обмежувати загальну генерацію NO і у такий спосіб стримувати негативну дію цього радикалу і продуктів його трансформації.

Отже, виявлена нами здатність карнозину підтримувати базальний рівень міоглобінової мРНК у міоцитах скелетних м'язів за умов гемічної гіпоксії, може проявлятися як на рівні синтезу, так і деградації РНК. Причому цей ефект може проявлятися не тільки антиоксидантними властивостями дипептиду, але й можливістю регулювати діапазон активації NO-синтази, обмежуючи генерацію токсичного NO. Який з можливих шляхів протекторної дії карнозину за умов гемічної гіпоксії, індукованої введенням NaNO<sub>2</sub>, буде з'ясовано у наших подальших експериментах.

Виявлено, що гістидинмісний дипептид карнозин (β-аланил-L-гістидин) запобігає деградації міоглобінової мРНК за умов гемічної гіпоксії, індукованої нітритом натрію. Це явище, очевидно, можна пояснити антиоксидантними властивостями карнозину, а також здатністю гістидина у складі дипептида обмежувати продукцію NO-радикала шляхом інгібування NO-синтази.

1. *Блехман Г.И.* Синтез белка в условиях стресса // *Успехи совр. биологии.* 1987. Т. 103. Вып. 3. С.340-353.
2. *Блехман Г.И.* Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // *Успехи совр. биологии.* 1992. Т. 112. Вып. 2. С.281-297.
3. *Бурлакова Е.Б., Крашанов С.А., Храпова Н.Г.* Роль токоферолов в пероксидном окислении липидов биомембран // *Биол. мембраны.*-1998.-Т. 15, N 2.-С.137-167
4. *Гуляева Н.В., Обидин А.Б., Левшина И.П. и др.* Влияние карнозина на показатели свободнорадикального окисления липидов при остром стрессе у крыс // *Биохимия.* 1989. № 8. С.5-16.
5. *Евстигнеева Р.П., Волков И.М., Чудинова В.В.* Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран // *Биол. мембраны.*1998.-Т. 15, № 2. С.119-136.
6. *Коробов В.Н., Рачков А.Э., Стародуб Н.Ф.* Выделение поли-А-содержащей РНК из скелетных мышц ондатры // *Молекулярная генетика и биофизика.* 1989. № 14. С.15-17.

7. *Коробов В.М., Крисько О.М., Бойко М.М. та ін.* Вплив карнозину на утворення комплексів гемоглобіну з оксидом азоту у крові щурів при нітритній інтоксикації // *Наук. зап. Тернопільськ. держ. ун-ту ім.В.Гнатюка. Сер. хім.* 1999. Вип. 3. С.56-60.
8. *Крисько О.М., Климишин Н.І., Коробов В.М., Великий М.М.* Вплив карнозину на перебіг перекисних процесів у тканині печінки щурів за умов нітритної іртоксикації // *Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія.* 1999. № 1. С.23-26.
9. *Леонов А.Н.* Метаболические механизмы компенсации при циркуляторно-анемической гипоксии // *Молекулярные аспекты адаптации к гипоксии* Сб. науч. тр., К., 1979. С. 74-81.
10. *Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж.* Молекулярное клонирование. М., 1994. С. 348-350.
11. *Маньковська І.М., Середенко М.М., Нагнибіда Н.М. та ін.* Особливості механізмів інтенсифікації перекисного окислення ліпідів у тканинах щурів при гіпоксії різного типу // *Фізіол. журн.* 1993. Т.39. № 4. С.25-33.
12. *Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г.* Физиологическая роль окиси азота в организме человека и животных. // *Физиология человека.* 1994. Т. 20. №3. С.165-173.
13. *Середенко М.М., Дударев В.П., Лановенко И.И. и др.* Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии., К., 1987.
14. *Стволинский С.Л., Котлобай А.А., Болдирев А.А.* Фармакологическая активность карнозина // *Эксперим. клинич. фармакология.* 1995. Т.58. № 2. С.66-74.
15. *Урзаев А.Х., Магсумов С.Т., Полетаев Г.И. и др.* Имидазолсодержащие биологические соединения - естественные факторы, снижающие активность NO-синтазы в скелетных мышцах крысы // *Нейрохимия.* 1996. Т.12. №3. С.46-50.
16. *Beckman J.S., Beckman K.M., Chen J. et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite. Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 86. P.1620-1624.
17. *Kroncke K.D., Fehsel K., Sommer A. et al.* // *Biol. Chem. Hoppeseyler.* 1995. Vol. 376. P.179-185.
18. *Milsch A., Busse R., Mordvintcev P.I. et al.* Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats // *NeuroReport.* 1994. Vol.5. №17. P.2325-2328.
19. *Moore P.K., Babbedge R.C., Wallace P. et al.* 7-nitrozo inidazole, an inhibitor of nitric oxide synthase exhibits anti-nociceptive activity in the mous with ont increasing blood pressure // *Br. J. Pharmacol.* 1993. Vol.108. P.296-297.
20. *Salgo M.G., Stone K., Squadrito G.L. et al.* Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. Vol. 210. P.1025-1030.
21. *Wood D., Blanchetot A., Jeffrey A.* Molecular cloning of seal myoglobin mRNA // *Nucl. Acids Res.* 1982. Vol.10. № 22. P.7133-7144.

**THE PREVENTION OF MYOGLOBIN MRNA DEGRADATION BY CARNOSINE  
AT THE HEMIC HYPOXIA****V.Korobov, O.Korobova, M. Velykyi***Ivan Franko National University of Lviv, Hrushevskiyi st.4, UA-79005 Lviv, Ukraine*

It is shown that histidine containing dipeptide carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) is prevented the degradation of mioglobin mRNA at the hemic hypoxia induced by sodium nitrite. This fact is explained by antioxidant properties of carnosine.

*Key words:* myoglobin mRNA, carnosine, hemic hypoxia.

Стаття надійшла до редколегії 10.02.2000  
Прийнята до друку 06.09.2000