

УДК 617.7-681+617.741.1-092:546.1726-031

© Е.И. Курилина, 2012.

ОЦЕНКА УРОВНЕЙ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Е.И. Курилина*Национальный медицинский университет им. А.Богомольца, кафедра офтальмологии (зав. кафедрой - член-кор. АМН Украины, профессор Жабоедов Г.Д.), г. Киев.*

ASSESSING THE STATE OF NITROGEN OXIDES AND ITS METABOLITES IN TEAR LIQUID OF HEALTHY PERSONS OF DIFFERENT AGE GROUPS

E.I. Kurilina

SUMMARY

Study of major biochemical indicators of oxidative metabolism of nitric oxide and of alternative paths of metabolism of L-arginine in tear liquid of healthy persons of different age groups.

ОЦІНКА РІВНІВ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ В СЛІЗІЙ РІДИНІ У ЗДОРОВИХ ОСІБ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП

О.І. Куриліна

РЕЗЮМЕ

Вивчені основні біохімічні показники системи окисного метаболізму оксиду азоту та альтернативних шляхів метаболізму L-аргініну в слюзі здорових осіб різного віку, в процесі фізіологічного старіння органу зору.

Ключевые слова: оксид азота, слезная жидкость.

В процессе эволюции биологических систем с целью сохранения гомеостаза, выработалась специальная система клеточной сигнализации и межклеточного взаимодействия. Она включает процессы модуляции биоэнергетики, субстраты и ферменты конъюгации, ферментативные и неферментативные механизмы антирадикальной и антиперекисной защиты.

В течение жизненного цикла организма система подвергается инволюционным изменениям, которые имеют в какой то степени как физиологический, так и патологический характер.

Процессы биоредукции разнообразны и сложны, и предполагают под собой регрессивные изменения развития и функционирования клеточных элементов, тканей и органов, а также целостного организма. Инволюция протекает как постоянное и прогрессирующее явление в течение всего цикла жизни организма, активизируясь под влиянием филогенетических и внешних факторов и воздействий. Основной характеристикой процесса являются дегенеративные изменения в органах и системах на фоне ослабления их функциональной способности.

Так, в результате изменений в системе микрогемодиализации и развития гипоксии нарушаются метаболические и энергопродуцирующие функции клеток, интенсифицируются процессы

перекисного окисления липидов, ингибируются процессы биотрансформации, усиливается повреждающий эффект токсических соединений, синтезированных в процессе биохимических преобразований.

Согласно современным представлениям одним из маркеров физиологических процессов в организме является газообразный химический мессенджер - оксид азота. В организме человека оксид азота образуется из L-аргинина путем двухстадийной реакции ферментативного окисления. Реакция гидроксилирования является кальмодулинзависимой и ингибируется монооксидом углерода. На конечной стадии стехиометрически образуется оксид азота в свободнорадикальной форме и L- цитруллин. Оксид азота принимает участие в регуляции практически всех функций организма, в том числе органа зрения в норме и патологии [1, 8, 9, 12].

По преимущественной локализации в тканях принято выделять нейрональную, эндотелиальную и макрофагальную формы ферментов - синтаз оксида азота (NOS). Первые две являются конститутивными, последняя функционирует как индуцибельная. Конститутивная (cNOS) обнаруживается в нервных и эндотелиальных клетках [3, 12, 14]. Индуцибельная форма фермента образуется, как правило, в ответ на активацию клеток цитокинами. Исследования

показывают, что источником эндогенного синтеза NO в органе зрения может быть конъюнктива, роговица, эндотелий сосудов сетчатки. В тканях глаза NO синтезируются всеми изоформами NO-синтазы cNOS и iNOS. Так, в эндотелии сосудов хориоидеи и сетчатки, в цилиарных артериях и преламинарном участке зрительного нерва находится эндотелиальная изоформа NO-синтазы. Нейрональная изоформа NO-синтазы представлена в периваскулярных зонах волокон зрительного нерва.

Работами последних лет установлена роль оксида азота как одного из патогенетических факторов при моделировании нейродегенеративных заболеваний, пусковым механизмом которых является ишемия [5, 6]. Образование нитроксильного радикала наряду с другими реактивными формами кислорода (супероксид-анионом, гидроксильным радикалом) является ключевым звеном деструкции биомембран нервных и эндотелиальных клеток и целого ряда патологических состояний органа зрения [7].

В ряде клинических исследований было показано, что показатели химического состава слезы (содержание нитрит- и нитрат-анионов, деновых конъюгатов, малонового диальдегида и др.) коррелируют с изменениями химического состава в сыворотке крови и внутриглазной жидкости (с учетом особенностей разных возрастных групп). Полученные результаты получили подтверждение и при исследовании такой глазной патологии как глаукома, катаракта (на разных стадиях их развития) [1, 3, 5-7].

Таким образом, использование слезной жидкости, как маркера протекания ряда биохимических процессов в норме и патологии в организме человека, является достаточно объективным, безопасным, простым неинвазивным методом и может служить для изучения локальных изменений в глазу и их корреляции с общей соматической патологией [3, 5].

Целью работы стало изучение в слезе «здоровых» лиц различного возраста основных исследуемых биохимических показателей: состояние системы окислительного метаболизма оксида азота и альтернативных путей метаболизма L – аргинина, в процессе физиологического старения органа зрения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе обобщены результаты исследования 60 пациентов различных возрастных категорий. Среди обследованных мужчин было 28, женщин - 32. В первую группу составили пациенты в возрасте от 40 до 50 лет, вторую - лица от 60 до 80 лет.

Для проведения биохимических исследований у пациентов производился забор слезы в количестве 0,1мл в области нижнего свода конъюктивы. Забор

слезной жидкости производился под биомикроскопическим контролем с помощью канюли и инсулинового шприца, Перед определением показателей объем пробы доводился физиологическим раствором до 1мл.

При проведении биохимических исследований были изучены: показатели стабильных метаболитов оксида азота (нитрит- и нитрат-анионы), содержание цитруллина – копродукта окисления аминокислоты L-аргинина (необходимой для синтеза NO), содержание мочевины – продукта метаболизма аминокислоты L- аргинина.

Показатели определяли спектрофотометрически - методом анализа, основанного на измерении поглощения излучения молекулярной средой видимого и УФ-светового излучения. Для работы спектрофотометра (спектрофотометр СФ-46) использовали сурьмяно-цезиевый фотоэлемент предназначенный для измерения в области спектра от 186 до 650 нм.

Количество нитрит-аниона (NO_2^-) определяли в безбелковых пробах колориметрической реакцией с помощью реактива Грисса методом Грина. Содержание нитрат-аниона (NO_3^-) определяли с помощью спектрофотометрического метода в модификации Коцюруба А.В.

Содержание цитруллина определяли методом колориметрии. Содержание мочевины определяли колориметрическим методом в безбелковых растворах с помощью подборки реактивов фирмы «Филист-Диагностика», «Индекс оксигенации», рассчитывали по формуле: индекс оксигенации = [содержание нитрит-аниона] * 1000 / [содержание нитрат-аниона + содержание мочевины] и выражали в условных единицах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В биологических системах оксид азота (NO) является нестабильным и высокореактивным соединением, которое быстро превращается в нитрит-анион (NO_2^-). Последний, в свою очередь, образуется как неферментативно, при окислении NO в водных растворах в присутствии достаточного уровня кислорода, так и ферментативно в процессе ресинтеза более стабильного пула оксида азота – NO_3^- ферментом нитратредуктазой [8, 14].

Пулы NO_2^- и NO_3^- указывают на соотношение этих двух процессов: окисления NO и ресинтез окисленных метаболитов.

Полученные нами данные указывают на то, что с возрастом у здоровых людей повышаются уровни нитрит-аниона (практически в 2 раза) и достоверно понижаются уровни нитрат-аниона, за счет роста неферментативных или/и ферментативных путей образования NO.

Таблица 1

Динамика нитрит- и нитрат-анионов, цитруллина, мочевины и «индекса оксигенации» в слезной жидкости здоровых людей разных возрастных групп, ($M \pm m$, $n=60$).

Показатель	Возраст здоровых доноров (лет)		
	40 – 50	60 – 80	t
NO_2^- пмоль/мг.белка	182,81 \pm 27,55	284,69 \pm 28,91	7,108
NO_3^- нмоль/мг. Белка	56,71 \pm 8,78	34,45 \pm 4,77	2,275
Цитруллин, пмоль/мг.белка	35,17 \pm 2,74	53,40 \pm 7,45	2,253
Мочевина, нмоль/мг. Белка	5,02 \pm 0,26	11,48 \pm 1,75	3,634
Индекс оксигенации, усл.ед.	12,96 \pm 0,26	5,10 \pm 0,42	2,332

Примечание:

t – степень достоверности разницы показателей относительно возрастной группе ($p \leq 0,05$);

n – число наблюдений.

Инволюционные процессы в организме сопровождаются изменениями, которые несут в какой то степени как физиологический, так и патологический характер. В процессе развития патологических процессов синтез NO может происходить за счет неокислительного метаболизма L-аргинина с образованием аминокислоты L-орнитина и мочевины. В норме мочевина является ингибитором ресинтеза аргинина (необходимого для синтеза оксида азота) в таких важных циклах, как орнитинный (орнитин - цитруллин - аргининосукцинат - аргинин) и цитрулиновый (цитруллин - аргининосукцинат - аргинин).

Вместе с мочевиной, одним из метаболитов орнитинового цикла является цитруллин. Синтезированный в этих реакциях цитрулин используется преимущественно индуцибельной NO-синтазой (iNOS) для синтеза большого количества оксида азота, который принимает непосредственное участие в активации свободнорадикальных процессов и образовании токсичного соединения - пероксинитрита (ONOO⁻) [12].

По результатам нашего исследования (Таблица 1), с возрастом в слезе здоровых лиц наблюдается повышение пулов как мочевины, более чем в 2 раза ($11,48 \pm 1,75$ нмоль/мг белка), так и цитруллина $53,40 \pm 7,45$ пмоль/мг белка по отношению к возрастной группе в возрасте 40-50 лет ($5,02 \pm 0,26$ нмоль/мг белка и $35,17 \pm 2,74$ пмоль/мг белка, соответственно).

Это свидетельствует об активации аргиназного пути деградации аргинина и избыточного синтеза индуцибельного NO. Высокие уровни iNOS, могут оказывать токсическое воздействие на структуры органа зрения (источники эндогенного синтеза оксида азота: конъюнктиву, роговицу, цилиарное тело, сосуды хориоидеи и сетчатки, преламинарные участки

зрительного нерва), активируя свободнорадикальные процессы. [3, 10, 13].

Оценивая «Индекс оксигенации» в слезе здоровых доноров (Табл. 1) следует отметить разность показателей в возрастном аспекте. В старшей возрастной группе отмечено значительное снижение (в 2 раза) этого показателя. В тоже время достоверно повышается уровень нитрит-аниона и активации альтернативных путей метаболизма L – аргинина с преимущественным индуцибельным синтезом оксида азота [10].

Указанные выше динамические изменения могут свидетельствовать о возможности развития гипоксии и ишемических состояний в органах и системах тканей всего организма, и в частности органа зрения, инволюционного характера [11].

То обстоятельство, что NO является важным регулятором клеточного и тканевого метаболизма, открывает широкие возможности для использования результатов исследований в клинической медицине [14].

ВЫВОДЫ

В результате изучения уровней метаболитов азота в слезе здоровых лиц разных возрастных групп выявлено повышение уровня нитрит-аниона и продуктов альтернативных путей метаболизма L – аргинина, свидетельствующих о активации преимущественно индуцибельных синтаз оксида азота. Высокие уровни iNOS, способствуют активации свободнорадикальных процессов и могут оказывать токсическое воздействие и вызывать дегенеративные изменения в структурах органа зрения на фоне ослабления их функциональной способности. Регрессивные изменения функционирования клеточных элементов, тканей органа зрения могут иметь как физиологический, так и патологический характер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бунин А.Я. Об участии перекисного окисления липидов в деструкции дренажной системы при первичной открытоугольной глаукоме / А.Я. Бунин, М.А. Бабижаев, А.В. Супрун // Вестн. офтальмологии. – 1985. – С. 13-16.
2. Гулая Н.М. Изменение уровня оксида азота на разных стадиях первичной открытоугольной глаукомы / Н.М. Гулая, Г.Д. Жабоедов, О.В. Петренко // Український біохімічний журнал. – 2003. – Т. 75, № 5. – С. 85-89.
3. Жабоедов Г.Д. Исследования уровня оксида азота в слезе, водянистой влаге и плазме крови у больных с первичной открытоугольной глаукомой / Г.Д. Жабоедов, Е.И. Курилина, О.В. Петренко // Современные технологии лечения глаукомы : сб. науч. ст. / Под ред. Х.П. Тахчиди. – М., 2003. – С. 403-406.
4. Курышева Н.И. Метаболическая концепция патогенеза глаукоматозной оптической нейропатии / Н.И. Курышева, Н.А. Маркичева, А.М. Деев // Федоровские чтения – 2003: Научно-практическая конференция «Современные технологии лечения глаукомы. – Москва, 2003. – С. 87-96.
5. Курышева Н.И. Роль свободнорадикальных реакций камерной влаги в развитии первичной открытоугольной глаукомы / Н.И. Курышева, М.И. Винецкая М.Л. Демчук // Вестн. офтальмологии. — 1996. – №4. – С. 3-5.
6. Курышева Н.И. О проницаемости барьера кров - водянистая влага при первичной открытоугольной глаукоме / Н.И. Курышева, М.И. Винецкая // Вестн. офтальмо. 1998. – №2. - С. 8.
7. Макашова Н.В. Антиоксидантная активность слезной жидкости у больных первичной глаукомой / Н.В. Макашова, И.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин // Вестн. офтальмологии. — 1999. — №5. - С. 3-4.
8. Машина С.Ю. Выявление и оценка депо NO в организме бодрствующей крысы/ С.Ю.Машина, А.Ф. Ванин, В.А. Сереженков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины - 2003.- Т.136, № 7.- С.32-36
9. Северина И.С. Оксид азота. Роль растворимой гуанилатциклазы в механизмах физиологических эффектов. //Вопр. Мед. химии, 2002. – Т.48, вып.1. – С.4-30.
10. Haefliger I. Nitric oxide and Endothelin in the pathogenesis of glaucoma / I. Haefliger, E. Dettmann, R. Liu// Surv Ophthalmol –1999. – Vol. 43, №9. – S. 51-58
11. Lamping K. Interactions Between NO and cAMP in the Regulation of Vascular Tone // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2001. –Vol. 21. – P. 729-730.
12. Osborne N.N. A hypothesis to suggest that light is a risk factor in glaucoma and mitochondrial optic neuropathies // Br. J. Ophthalmol. - 2006. - № 2. - P. 237-241.
13. Oshida E. Free radicals in the aqueous humor of patients with glaucoma / E. Oshida, Y. Matsumoto, K. Arai // Clin Ophthalmol. – 2010 -Vol 30, №4. – P.653-660.
14. Tsai D.C., Significant variation of the elevated nitric oxide levels in aqueous humor from patients with different types of glaucoma / D.C. Tsai, W.M. Hsu, C.K. Chou // Ophthalmologica – 2002 – Vol. 216, №5. – P. 346-350.