

УДК 577.152.6

Сумбаєв В. В., асистент, канд. біол. наук, Ясинська І. М., асп.

Одеський державний університет, кафедра біохімії,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

АКТИВНІСТЬ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ ЗА ВПЛИВУ ДДТ ТА ГЕНІСТЕЇНУ

Встановлено, що ДДТ та геністеїн інгібують активність синтази оксиду азоту (КФ 1.14.13.19) в печінці, легенях та головному мозку щурів, знижуючи кількість ферменту. В дослідях на гомогенатах печінки з'ясовано, що ДДТ ізостерично інгібує синтазу оксиду азоту, а геністеїн не впливає на її активність.

Ключові слова: синтаза оксиду азоту, ДДТ, геністеїн.

Синтаза оксиду азоту (NO-синтаза, КФ 1.14.13.19) каталізує утворення NO та L-цитруліну з аргініну та O_2 , використовуючи НАДФН+ H^+ як донор електронів [1]. Для прояву каталітичної активності NO-синтази необхідний цілий ряд кофакторів та простетичних груп: тіолзв'язаний гем, ФАД, ФМН, кальмодулін та Ca^{2+} , а також (6R)—5,6,7,8-тетрагідро-L-біоптерин. Існують три ізоформи ферменту — дві конститутивні (ендотеліальна та нейрональна) та індукцибельна. Кожна ізоформа складається з двох гомодимерів, представлених трьома доменами: редуктазним, який вміщує ФАД та ФМН, що транспортують електрони від НАДФН+ H^+ до гему; оксигеназним, який аллостерично модулюється (6R)-5,6,7,8-тетрагідро-L-біоптерином і вміщує гем, що окислює субстрат; третім невеликим доменом, що зв'язує кальмодулін. Усі ізоформи мають однаковий механізм каталітичної дії і відрізняються лише молекулярною вагою доменів [1].

З'ясовано, що природні та синтетичні кортикостероїди інгібують експресію генів, які кодують домени NO-синтази [4]. Можливо, що сполуки, які структурно споріднені з кортикостероїдами [9], такі як поліхлорбіфеніли та ізофлавоноїди, можуть викликати такий же ефект [4]. Це цілком імовірно, зважаючи на те, що поліхлорбіфеніли (а саме ДДТ) ізостерично інгібують зв'язування глюкокортикоїдів з відповідними білками-рецепторами головного мозку щурів як *in vitro*, так і *in vivo* [6]. Слід, однак, зазначити, що вплив поліхлорбіфенілів та ізофлавоноїдів на активність синтази оксиду азоту практично не з'ясований. Тому метою наведеної роботи стало вивчення в дослідях *in vivo* та *in vitro* впливу ДДТ (як найбільш розповсюдженого поліхлорбіфенілу) та ізофлавоноїду геністеїну на активність синтази оксиду азоту в органах білих щурів.

Матеріали та методи

Для вивчення впливу ДДТ та геністеїну на активність синтази оксиду азоту *in vivo* використовували 15 однопоночних щурів лінії Вістар у віці трьох місяців вагою 150 ± 20 г. Тварин розподіляли на три групи (по 5 голів). Перша група була інтактною та отримувала по 0,2 мл персикової олії. Друга група отримувала роз-

чин ДДТ в персиковій олії із розрахунку 20 мг ДДТ на 1 кг ваги, а третя — розчин геністеїну в персиковій олії — 500 мкг геністеїну на 1 кг ваги. Ін'єкції робили внутрішньочеревинно протягом трьох діб. Через дві години після останньої ін'єкції тварин декапітували. Печінку, легені та головний мозок гомогенізували в бідистильованій воді у співвідношенні 1 : 5. Активність синтази оксиду азоту визначали в реакційній системі, яка містила 2,5 мл трис-НСІ-буферу (рН 7,4) з 1 М СаСІ₂, 0,3 мл водного розчину аргініну (кінцеві концентрації аргініну в реакційних системах складали 4, 8, 16 та 32 мкМ) та 0,1 мл 1 мМ водного розчину НАДФН+Н⁺. Реакцію запускали доданням 0,1 мл гомогенату відповідних органів, вимірювали екстинкцію проб при довжині світлової хвилі 340 нм (максимум поглинання НАДФН+Н⁺), інкубували протягом 20 хвилин при 40 °С, зупиняли реакцію доданням 0,02 мл 0,02% водного розчину NaN₃ і знову реестрували екстинкцію проб при 340 нм. Контрольні проби обробляли так само, як і дослідні, але замість 0,1 мл 1 мМ водного розчину НАДФН+Н⁺ додавали 0,1 мл бідистильованої води. Крім того, готували контроль на безсубстратне окислення НАДФН+Н⁺. Ці реакційні системи містили замість 0,3 мл водного розчину аргініну 0,3 мл бідистильованої води. Їх обробляли так само, як дослідні. Про активність NO-синтази судили по кількості НАДФН+Н⁺, що окислюється ферментом протягом однієї хвилини на 1 мг білка. Зазначений метод має істотну перевагу перед іншим, в основі якого лежить визначення аніонів NO₂⁻ та NO₃⁻, які утворюються з NO. Утворення цих аніонів цілком залежить не тільки від активності досліджуваного нами ферменту, але й від активності ксантиноксидази, активований молібденовий кофактор якої здатний окислювати NO [8, 5].

Вплив ДДТ та геністеїну на активність NO-синтази *in vitro* вивчали на гомогенатах печінки (саме в цьому органі присутні всі три ізоформи ферменту). Для цього в реакційні системи разом з буфером вносили зазначені вище агенти в кількостях 4, 16 та 64 мкг та визначали активність NO-синтази (концентрація субстрату при цьому становила 32 мкМ). Кінетику NO-синтазної реакції за впливу ДДТ та геністеїну вивчали при концентраціях субстрату 4, 8, 16 та 32 мкМ.

Статистичну обробку результатів провадили у відповідності з *t*-критерієм Стьюдента [3].

Результати дослідження

Встановлено, що ДДТ та геністеїн достовірно знижують активність NO-синтази в печінці, легенях та головному мозку щурів (рис. 1—3).

Дослідження кінетики NO-синтазної реакції показало, що в усіх випадках константа Міхаеліса цього ферменту залишалася постійною незалежно від групи щурів, в той час як максимальна швидкість ($V_{\max}$) NO-синтазної реакції достовірно падала за дії на щурів ДДТ та геністеїну (рис. 1—3, табл. 1).

Дослідження впливу ДДТ та геністеїну на активність NO-синтази *in vitro* показали, що ДДТ інгібує фермент, а геністеїн не впливає на його активність (рис. 4).

Вивчення кінетики інгібування NO-синтазної реакції за участю ДДТ вказує на його ізостеричний характер (рис. 5). Розрахована нами величина K_i [2] складає 9 мкМ.

Як відомо, ДДТ дехлорується та окислюється за участю гемопротеїдів — ци-

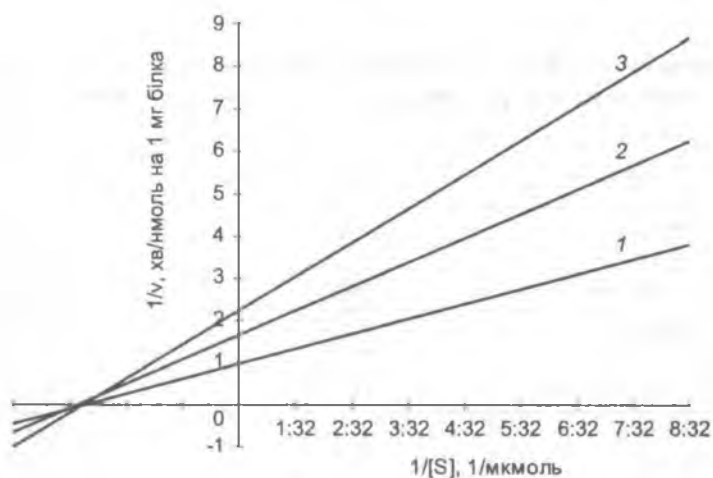


Рис. 1. Залежність швидкості NO-синтазної реакції від концентрації субстрату в гомогенатах печінки контрольних (1), ін'єкованих ДДТ (2) та геністеїном (3) шурів в координатах Лайнуівера-Берка

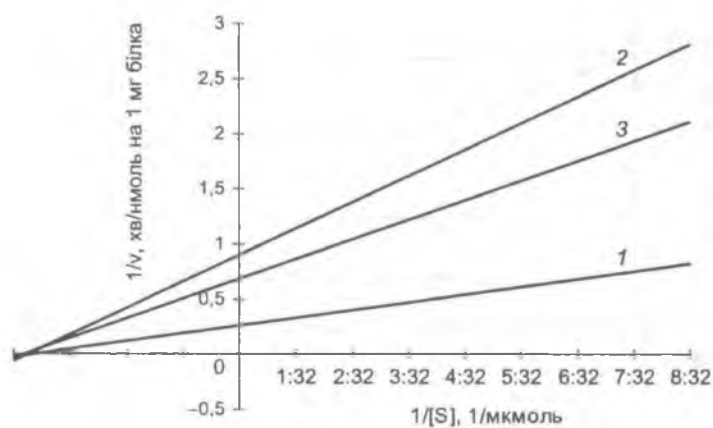


Рис. 2. Залежність швидкості NO-синтазної реакції від концентрації субстрату в гомогенатах легень контрольних (1), ін'єкованих ДДТ (2) та геністеїном (3) шурів в координатах Лайнуівера-Берка

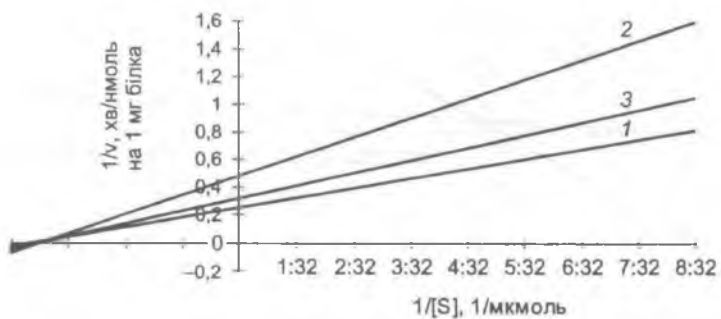


Рис. 3. Залежність швидкості NO-синтазної реакції від концентрації субстрату в гомогенатах головного мозку контрольних (1), ін'єкованих ДДТ (2) та геністеїном (3) шурів в координатах Лайнуівера-Берка

Таблиця 1

K_m та V_{max} синтази оксиду азоту в гомогенатах печінки, легень та головного мозку контрольних та ін'єкованих ДДТ і геністеїном щурів ($n = 5$)

Групи щурів	Органи	K_m NO-синтази, мкМ	V_{max} NO-синтазної реакції, нмоль · хв ⁻¹ на 1 мг білка
Інтактна	Печінка	12,3	$1,1 \pm 0,060$
	Легені	11,0	$3,92 \pm 0,12$
	Головний мозок	10,0	$3,60 \pm 0,14$
Ін'єковано ДДТ	Печінка	12,3	$0,625 \pm 0,020^*$
	Легені	11,0	$1,18 \pm 0,08^*$
	Головний мозок	10,0	$2,00 \pm 0,10^*$
Ін'єковано геністеїн	Печінка	12,3	$0,454 \pm 0,015^*$
	Легені	11,0	$1,55 \pm 0,06^*$
	Головний мозок	10,0	$1,30 \pm 0,07^*$

Примітка: * — розбіжності достовірні у порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

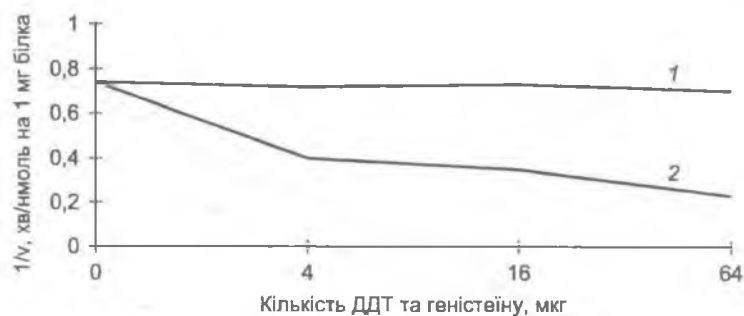


Рис. 4. Залежність швидкості NO-синтазної реакції від кількості ДДТ (1) та геністеїну (2) в реакційній системі

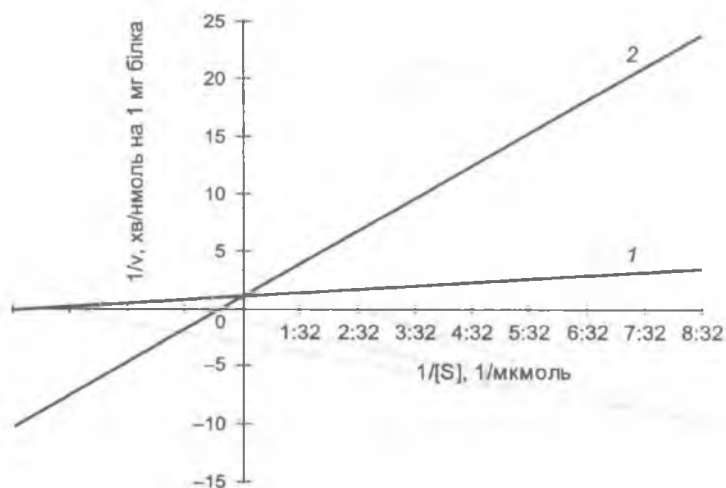


Рис. 5. Залежність швидкості NO-синтазної реакції від концентрації субстрату в гомогенатах печінки щурів у відсутності інгібіторів (1) та у присутності 64 мкг ДДТ (2) в координатах Лайнуївера-Берка

тохромів P450 1A1, 1A2 та 1B1 в 1,1-дихлордифенілоксиацетат. Крім того, він може зв'язуватись з іншими гемопротеїдами, частково дехлоруватись та, відповідно, гідроксильоватись за участю деяких з них [7]. Тому можна вважати, що ДДТ інгібує NO-синтазу як ліганд гему. Геністеїн, який структурно подібний до ДДТ, але не містить хлору, не інгібує NO-синтазу.

Результати, що отримані в дослідях *in vivo*, можна трактувати так. Якщо при інгібуванні K_m не змінюється, а V_{max} знижується, то це може бути наслідком або неконкурентного інгібування, або зменшенням кількості ферменту. Результати, що отримані в дослідях *in vitro*, свідчать про те, що неконкурентне інгібування NO-синтази у присутності ДДТ та геністеїну відсутнє. В зв'язку з цим можна вважати, що ці хімічні сполуки зменшують вміст NO-синтази в печінці, легенях та головному мозку щурів шляхом пригнічення її синтезу. Можна говорити про знижену експресію генів індукцибельної ізоформи NO-синтази, тому що експресія саме цих генів знаходиться під контролем гормонів, радикалів та деяких інших сполук [4]. Щодо конститутивних ізоформ NO-синтази, то їх активність в основному регулюються ковалентними модифікаціями апоферменту, а експресія відповідних генів практично не залежить від гормонів та їм подібних сполук [1, 4].

Література

1. Горрен А. К. Ф., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота // Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 870—880.
2. Диксон Р., Узбб Э. Ферменты — М.: Мир, 1961. — 728 с.
3. Зайцев Г. Н. Методика биометрических расчётов — М.: Наука, 1973. — 256 с.
4. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 1007—1020.
5. Сумбаев В. В., Розанов А. Я. Исследование *in vitro* регуляции активности ксантиноксидазы печени крыс восстановителями-антиоксидантами // Укр. биохим. журн. — 1998. — Т. 70, № 6. — С. 47—52.
6. Сумбаев В. В., Ясинская И. М. Влияние ДДТ на связывание кортизола с глюкокортикоид — связывающими белками (ГКСБ) головного мозга крыс // Укр. биохим. журн. — 2000. — Т. 72, № 5 (в печати).
7. Giordano N. D., Koletsky R. J., Koletsky S. J. DDT and lindane metabolism // Amer. J. Clin. Pathol. — 1976. — V. 66, № 4. — P. 588—597.
8. Hevel S. M., White K. A., Marletta M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein // J. Biol. Chem. — 1991. — V. 266, № 41. — P. 22789—22791.
9. Voskresensky O. N., Sumbayev V. V. XV Int. Symp. on Med. Chem. (Edinburgh), Book of Abstracts. — 1998. — P. 208.

Сумбаев В. В., Ясинская И. М.

Одесский государственный университет, кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

АКТИВНОСТЬ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ДЕЙСТВИИ ДДТ И ГЕНИСТЕИНА

Резюме

Установлено, что ДДТ и геністеїн інгібують активність синтази оксиду азота в печені, легких и головном мозге крыс, снижая количество фермента. В опытах *in vitro* ДДТ изостерически ингибирует синтазу оксиду азота, а геністеїн не влияет на ее активність.

Ключевые слова: синтаза оксиду азота, ДДТ, геністеїн.

Sumbayev V. V., Yasinska I. M.

Odessa State University, Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa 65026, Ukraine

DDT AND GENISTEIN EFFECTS ON NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY

Summary

It has been found out that DDT and genistein inhibit nitric oxide synthase activity in the rat liver, lung and brain by decreasing its quantity. In the rat liver homogenates in vitro DDT isosterically inhibit nitric oxide synthase, but genistein does not change its activity.

Key words: nitric oxide synthase, DDT, genistein.