

ТЕЗИГРАФИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИБРЮШИННОГО ВВЕДЕНИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОВЫМ ЛИГАНДАМИ

А.К. Мартусевич

д.б.н., Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр (г. Н. Новгород); Кировский ГМУ Минздрава России; Ассоциация российских озонотерапевтов

Изучены особенности тезиграфической картины сыворотки крови крыс при внутрибрюшинном введении им водного раствора динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами (дозы соединения – 0,15; 0,30; 0,45 и 0,60 мМ). Установлено активирующее действие соединения в отношении кристаллогенных свойств биожидкости, наиболее выражено проявляющееся при введении 0,3 и 0,45 мМ вещества.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, тезиграфия, кристаллизация, сыворотка крови, биокристалломик.

Первооткрывателем физиологической депонированной формы монооксида азота, динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), проф. А.Ф. Ваниным (2009) предполагается наличие у этого вещества многочисленных биологических эффектов [1]. Именно ДНКЖ были впервые выявлены как форма оксида азота в биологических системах в первых ЭПР-экспериментах, продемонстрировавших наличие NO в дрожжевых клетках [1], мышечных клетках и нейронах [2]. В то же время действие этого вещества на биосистемы стало активно изучаться лишь в последние десятилетия [1, 3–5].

Следует отметить, что ДНКЖ способны эффективно взаимодействовать с различными веществами, становящимися их лигандами [6, 7]. Наиболее распространенными среди них являются тиолсодержащие соединения, в частности глутатион или цистеин [1, 8]. Лиганды определяют особенности дополнительных эффектов ДНКЖ, детерминируя двухкомпонентность их активности, связанную не только с возможностью постепенного или болсноного высвобождения оксида азота, но и со свойствами функциональных групп лигандов [1, 3, 6].

Ранее для рассматриваемого соединения были описаны биорегулирующие свойства, однако акцент этих изысканий смещен в сторону исследований *in vitro* с изолированными системами [6, 7, 9, 10]. В большей степени эти изыскания касаются раскрытия особенностей влияния ДНКЖ на состояние про- и антиоксидантных систем в разнообразных биологических и абиогенных системах.

На протяжении нескольких последних десятилетий рядом отечественных и зарубежных авторов показана информативность исследования кристаллогенной активности биологических жидкостей человека как альтернативного метода интегральной оценки физико-химических свойств [11, 12]. Указанный тезис в полной мере касается и биосред животных [13].

Ц е л ь р а б о т ы – исследование влияния внутрибрюшинного введения динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами на инициированный кристаллогенез сыворотки крови крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 70 половозрелых крысах-самцах линии Вистар, разделенных на семь равных по численности групп. Первая группа животных была интактной (без каких-либо манипуляций). Крысам, включенным в остальные группы, в течение 10 дней ежедневно осуществляли внутрибрюшинное введение 1 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия. При этом животным третьей–шестой групп во вводимый раствор дополнительно добавляли динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами (концентрации агента – 0,15; 0,30; 0,45 и 0,60 мМ соответственно). Крысы седьмой группы получали 1 мл водного раствора глутатиона (0,15 мМ). У животных всех групп брали образцы крови, причем у крыс первой (интактной) группы – однократно, а у

представителей остальных групп – двухкратно (до и сразу по завершении курса воздействий).

Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами синтезировали по методике А.Ф. Ванина [8, 14]. Концентрация соединения в физиологическом растворе, определяемая спектрофотометрически по известной экстинкции при длинах волн 310 и 360 нм, составляла 3,1 ммоль/л.

Изучение влияния ДНКЖ на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс было выполнено по методу сравнительной тезиграфии с использованием специальной системы критериев [15, 16]. Основные показатели, оцениваемые в балльной шкале, – тезиграфический индекс (отражает соотношение количества кристаллических элементов в фациях, образованных смесью биожидкости и базисного вещества, а также последнего в индивидуальном виде), кристалличность (характеризует сложность структуропостроения элементов), степень деструкции фации (представляет собой индикатор правильности образования структур) и выраженность краевой зоны микропрепарата. В качестве базисного вещества использовали 0,9%-ный раствор хлорида натрия.

Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете Statistica 6.1 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании обнаружено, что по основному количественному параметру описания результата тезиграфического теста – тезиграфическому индексу – различия наблюдаются при всех использованных режимах NO-стимуляции (рис. 1).

Так, для животных интактной и контрольной групп значения показателя лежали в пределах 3,5 баллов, что свидетельствует лишь о двухкратном инициаторном потенциале биосреды (количество структурных элементов в образце-сокристаллизате не более чем в 2 раза превышает их число в контрольном образце базисного вещества). Напротив, при введении ДНКЖ наблюдали выраженное увеличение значения тезиграфического индекса, указывающее на существенное повышение инициаторного потенциала биологической жидкости крыс данных групп ($p < 0,05$ для всех случаев). Наиболее значимые отклонения регистрировали при применении ДНКЖ в концентрации 0,45 мМ. Следует отметить, что у животных, получавших инъекции глутатиона, выступающего лигандом в составе изучаемого варианта ДНКЖ, не выявлено

существенного смещения тезиграфического индекса как относительно крыс интактной, так и контрольной групп.

Кристалличность тезиграмм, характеризующая сложность построения элементов и аналогичная по своей сущности индексу структурности кристаллограммы, полностью подтверждала тенденции к активации инициированного кристаллогенеза, обнаруженные по тезиграфическому индексу, у животных, получавших инъекции ДНКЖ (рис. 1). Аналогичным был и экстремум данной параболической зависимости, соответствующий концентрации 0,45 мМ. Следует подчеркнуть, что при всех использованных дозах соединения по кристалличности отмечены статистически значимые отклонения от уровня, зафиксированного как для крыс интактной, так и контрольной групп ($p < 0,05$ для обоих случаев). Интересно, что использование только глутатиона демонстрировало обратный действию ДНКЖ эффект, проявляющийся в умеренной тенденции к снижению доли дендритных элементов в фации ($p < 0,1$ по сравнению с неинъецированными и инъецированными физиологическим раствором животными).

Общую тенденцию на введение ДНКЖ наблюдали и в отношении параметра, характеризующего правильность структуропостроения элементов микропрепарата – степени деструкции фации (рис. 2), причем различия наблюдали при всех изученных концентрациях соединения ($p < 0,05$). При этом относительно «низкие» и «средние» дозы агента вызывали сопоставимый сдвиг показателя (повышение на 138–150% к уровню, характерному для крыс интактной группы; $p < 0,05$).

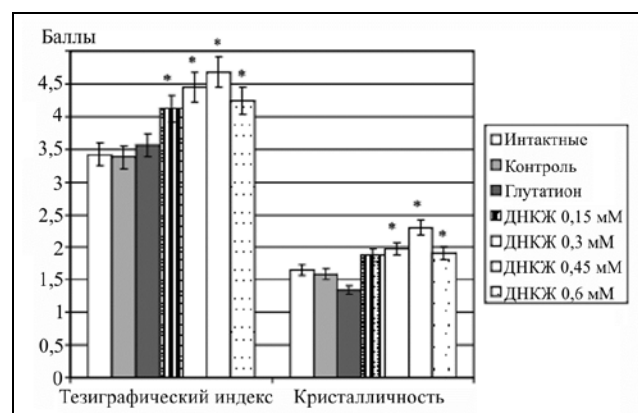


Рис. 1. Основные параметры тезиграфического теста сыворотки крови крыс при введении тиолсодержащих ДНКЖ (* – различия с животными интактной группы статистически значимы; $p < 0,05$)

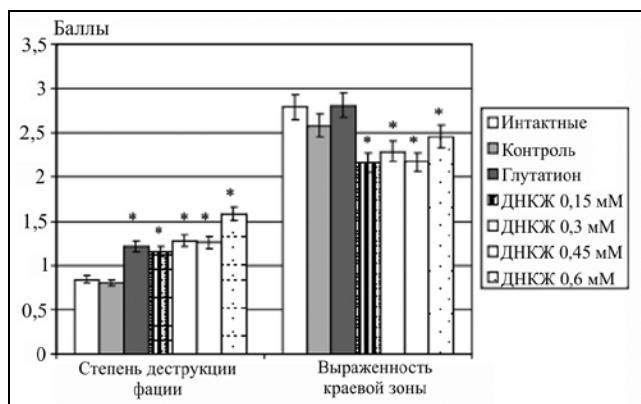


Рис. 2. Дополнительные параметры оценки тезиграфических фаций сыворотки крови крыс при внутрибрюшинном введении тиолсодержащих ДНКЖ (* – различия с животными интактной группы статистически значимы; $p < 0,05$)

Следует отметить, что внутрибрюшинное применение раствора глутатиона оказывает сопоставимый эффект на степень деструкции фации (увеличение на 45%; $p < 0,05$), что указывает на неспецифический характер этих сдвигов. Наиболее существенные вариации степени деструкции фации были зарегистрированы при введении животным ДНКЖ в концентрации 0,6 мМ, что проявилось в ее нарастании в 1,88 раза ($p < 0,05$ по сравнению с крысами интактной группы); это может косвенно свидетельствовать о неоптимальности реакции на данную дозу соединения.

Также был проведен анализ выраженности краевой зоны образцов сыворотки крови крыс сформированных групп (рис. 2). Данный параметр, характеризующий белковый компонент биологической жидкости, находящийся в нативном состоянии, у представителей контрольной группы не отличался от физиологического уровня, представленного интактными животными. Внутрибрюшинное введение водного раствора глутатиона также не вызвало изменений размера краевой зоны микропрепаратов высушенной биологической жидкости. Напротив, у всех крыс, получавших инъекции донора оксида азота, наблюдали умеренное снижение указанного параметра (на 5–15% относительно значений, вычисленных для интактных животных), что потенциально свидетельствовало о незначительных конформационных модификациях белков под влиянием изучаемого воздействия и могло быть обусловлено сменой глутатионовых лигандов ДНКЖ на белковые.

Полученные в результате настоящего исследования сведения указывают на наличие модификации кристаллогенных (иницирующих) свойств

сыворотки крови крыс при курсовом внутрибрюшинном введении животным физиологического донора оксида азота – ДНКЖ, причем данный эффект оказывается дозозависимым и имеющим экстремум в области 0,3–0,45 мМ.

С учетом того, что кристаллогенные свойства являются отображением компонентного состава и одним физико-химических параметров биологической жидкости [12, 13, 15, 16], можно предположить, что дозозависим и метаболический ответ организма на применение соединения. При этом наиболее оптимальным действием на обменные процессы обладают относительно низкие дозы агента, стимулирующие антиоксидантный потенциал сыворотки крови с соответствующим снижением интенсивности процессов липопероксидации, способствующие оптимизации энергетического метаболизма и повышающие активность ферментных систем детоксикации. Это показано нами в экспериментах *in vitro* [17–20], а также на модели тяжелой термической травмы [3] и согласуется с данными других авторов о положительном метаболическом эффекте ДНКЖ [1, 6, 9, 14]. Кроме того, сопоставимые с представленными в статье данными результаты по особенностям модификации метаболизма получены и в отношении здоровых крыс.

ВЫВОДЫ

Результаты тезикристаллоскопической оценки образцов сыворотки крови животных после проведения курса инъекций ДНКЖ в различных концентрациях четко указывают на активирующее действие соединения в отношении кристаллогенных (иницирующих) свойств биожидкости, наиболее выражено проявляющееся при использовании вещества в 0,3- и 0,45-миллимолярных водных растворах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vanin A.F. Dinitrosyl-iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology // *Nitric Oxide Biol. Chem.* 2009. № 21. P. 136–149.
2. Murad F. The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase // *Neurotransmission.* 1994. № 10. P. 1–4.
3. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Давыдюк А.В. Влияние динитрозильных комплексов железа на метаболические параметры крови животных с экспериментальной термической травмой // *Биофизика.* 2014. Т. 59. № 6. P. 1173–1179.
4. Тимошин А.А. и др. Оценка уровня оксида азота в тканях органов крыс и его изменение при длительной ингаляции

- воздуха с повышенным содержанием оксида азота // Доклады РАН. 2009. № 425. P. 110–113.
5. Hall C.N., Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration *in vivo*? // Nitric Oxide Biol. Chem. 2009. V. 12. № 2. P. 92–103.
 6. Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А. и др. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса // Биофизика. 2006. Т. 51. № 3. P. 472–477.
 7. Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В. и др. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа // Биохимия. 2004. Т. 69. № 5. P. 699–705.
 8. Borodulin R.R., Kubrina L.N., Shvydkiy V.O., et al. A simple protocol for the synthesis of dinitrosyl iron complexes with glutathione: EPR, optical, chromatographic and biological characterization of reaction products // Nitric oxide. 2013. № 35. P. 110–115.
 9. Giliano N.Y. et al. Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cells // Nitric Oxide Biol. Chem. 2011. № 24. P. 151–159.
 10. Nitric Oxide. Basic Research and Clinical Application / Ed. R.J. Gryglewsky, P. Minuz. Amsterdam; Berlin; Oxford; Tokyo; Washington: IOS Press, DC. 2001.
 11. Денисов А.Б. Алгоритм оценки кристаллических фигур, полученных при высушивании смешанной слюны // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 136. № 7. P. 37–40.
 12. Кидалов В.Н., Хадарцев А.А., Якушина Г.Н. Тезиографические исследования крови и их практические возможности // Вестник новых медицинских технологий. 2004. Т. 11. № 1–2. С. 23–25.
 13. Громова И.П. Кристаллоскопический способ изучения сыворотки крови в токсиколого-гигиеническом эксперименте методом «открытая капля» // Гигиена и санитария. 2005. № 2. P. 66–69.
 14. Vanin A.F., Chazov E.I. Prospects of desingning medicines with diverse therapeutic activity on the basis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands // Biophysics. 2011. V. 56. № 2. P. 268–275.
 15. Камакин Н.Ф., Мартусевич А.К. Современные подходы к кристаллоскопической идентификации состава биологических жидкостей // Экология человека. 2003. № 5. С. 23–25.
 16. Мартусевич А.К. Биокристалломика в молекулярной медицине / Под ред. В.Л. Эмануэля. СПб: Изд-во СПбГМУ–Тверь: ООО «Издательство «Триада». 2011. 112 с.
 17. Ванин А.Ф., Мартусевич А.К., Перетягин С.П., Давыдюк А.В. Оценка действия динитрозильных комплексов железа на некоторые физико-химические показатели крови *in vitro* // Медицинский альманах. 2013. № 3. С. 37–38.
 18. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П. Влияние свободного и депонированного оксида азота на энергетический метаболизм крови // Современные технологии в медицине. 2013. Т. 5. № 4. С. 33–38.
 19. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П. Влияние различных форм оксида азота на свойства альдегиддегидрогеназы эритроцитов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 11. С. 60–65.
 20. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Ванин А.Ф. Сравнительный анализ действия свободного и депонированного NO на состояние про- и антиоксидантных систем крови // Биофизика. 2015. Т. 60. № 2. С. 348–354.

Поступила 24 февраля 2017 г.

TEZIOGRAPHIC STUDY OF RATS' BLOOD SERUM AFTER INTRAPERITONEAL INJECTION OF DINITROSYL IRON COMPLEXES WITH GLUTATHIONE LIGANDS

© A.K. Martusevich, 2017

A.K. Martusevich

Dr. Sc. (Biol.), Privolzhsky Federal Medical Research Centre (Nizhny Novgorod); Kirov State Medical University; Association of Russian Ozone Theraputists

The aim of this study is estimation study of the effect of intra-peritoneal introduction of dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands on initiated crystallogenesis blood serum of rats. Peculiarities of teziographic picture of blood serum of rats after intraperitoneal introduction of an aqueous solution of dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands (dose of compound – 0.15; 0.30; 0.45 and 0.60 mM) and an aqueous solution of glutathione (0.15 mM). The study of influence of dinitrosyl iron complexes on crystallogenic properties of blood serum of rats was performed according to the method of comparative teziography using a special system of criteria. The main indicators evaluated in point scale, served as teziographic index, crystallinity, facia destruction degree and clarity of facia marginal zone. 0.9% sodium chloride solution was used as crystallizator. The results of teziographic evaluation of serum samples of animals after the course of injections of dinitrosyl iron complexes in various concentrations clearly indicate that the activating effect of the compound against crystallogenic properties of biofluids are most pronounced for 0.3 - and 0.45-millimolar aqueous solutions of substance. This tendency is reflected in the growth of teziographic index and crystallinity of the samples and is accompanied by a moderate increase of the facia destruction degree of degradation and slight narrowing of the marginal zone. Given the fact that crystallogenic properties represent composition and physico-chemical parameters of biological liquids, we can assume the dose-dependent metabolic response of the organism to administration of the compound.

Thus, the optimal effect on metabolic processes have a relatively low dose of an agent that stimulates the antioxidant capacity of blood serum with a corresponding decrease in the intensity of lipid peroxidation processes, optimization of energy metabolism and increases the activity of the enzyme systems of detoxification.

Key words: dinitrosyl iron complexes, teziography, crystallization, blood serum, biocrystalloemics.

REFERENCES

1. Vanin A.F. Dinitrosyl-iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology // Nitric Oxide Biol. Chem. 2009. № 21. P. 136–149.
2. Murad F. The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase // Neurotransmission. 1994. № 10. P. 1–4.
3. Martusevich A.K., Solov'eva A.G., Peretjagin S.P., Davydjuk A.V. Vlijanie dinitrozil'nyh kompleksov zheleza na metabolicheskie parametry krovi zhivotnyh s jeksperimental'noj termicheskoj travmoj // Biofizika. 2014. T. 59. № 6. R. 1173–1179.
4. Timoshin A.A. i dr. Ocenka urovnja oksida azota v tkanjah organov krysa i ego izmenenie pri dlitel'noj ingaljacii vozduha s povyshennym sodержaniem oksida azota // Doklady RAN. 2009. № 425. R. 110–113.
5. Hall C.N., Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo? // Nitric Oxide Biol. Chem. 2009. V. 12. № 2. P. 92–103.
6. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Gubkina S.A. i dr. Vzaimodejstvie dinitrozil'nyh kompleksov zheleza s intermediatami oksislitel'nogo stressa // Biofizika. 2006. T. 51. № 3. R. 472–477.
7. Shumaev K.B., Petrova N.Je., Zabbarova I.V. i dr. Vzaimodejstvie oksoferrilmioglobina i dinitrozil'nyh kompleksov zheleza // Biohimija. 2004. T. 69. № 5. R. 699–705.
8. Borodulin R.R., Kubrina L.N., Shvydkiy V.O., et al. A simple protocol for the synthesis of dinitrosyl iron complexes with glutathione: EPR, optical, chromatographic and biological characterization of reaction products // Nitric oxide. 2013. № 35. P. 110–115.
9. Gilliano N.Y. et al. Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cells // Nitric Oxide Biol. Chem. 2011. № 24. P. 151–159.
10. Nitric Oxide. Basic Research and Clinical Application / Ed. R.J. Gryglewsky, P. Minuz. Amsterdam; Berlin; Oxford; Tokyo; Washington: IOS Press, DC. 2001.
11. Denisov A.B. Algoritm ocenki kristallicheskih figur, poluchennyh pri vysushivanii smeshannoj sljony // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 2004. T. 136. № 7. R. 37–40.
12. Kidalov V.N., Hadarcev A.A., Jakushina G.N. Teziograficheskie issledovanija krovi i ih prakticheskie vozmozhnosti // Vestnik novyh medicinskih tehnologij. 2004. T. 11. № 1–2. S. 23–25.
13. Gromova I.P. Kristalloskopicheskiy sposob izuchenija syvorotki krovi v toksikologo-gigienicheskom jeksperi-mente metodom «otkrytaja kaplja» // Gigiena i sanitarija. 2005. № 2. R. 66–69.
14. Vanin A.F., Chazov E.I. Prospects of desingning medicines with diverse therapeutic activity on the basis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands // Biophysics. 2011. V. 56. № 2. P. 268–275.
15. Kamakin N.F., Martusevich A.K. Sovremennye podhody k kristalloskopicheskoj identifikacii sostava biologičeskih zhidkostej // Jekologija cheloveka. 2003. № 5. S. 23–25.
16. Martusevich A.K. Biokristallomika v molekularnoj medicine / Pod red. V.L. Jemanujelja. SPb.: Izdatel'stvo SPbGMU – Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada». 2011. 112 s.
17. Vanin A.F., Martusevich A.K., Peretjagin S.P., Davydjuk A.V. Ocenka dejstvija dinitrozil'nyh kompleksov zheleza na nekotorye fiziko-himicheskie pokazateli krovi in vitro // Medicinskij al'manah. 2013. № 3. S. 37–38.
18. Martusevich A.K., Solov'eva A.G., Peretjagin S.P. Vlijanie svobodnogo i deponirovannogo oksida azota na jenergeticheskiy metabolizm krovi // Sovremennye tehnologii v medicine. 2013. T. 5. № 4. S. 33–38.
19. Martusevich A.K., Solov'eva A.G., Peretjagin S.P. Vlijanie razlichnyh form oksida azota na svojstva al'degiddegidrogenazy jeritrocitov // Voprosy biologičeskoj, medicinskoj i farmacevtičeskoj himii. 2014. № 11. S. 60–65.
20. Martusevich A.K., Solov'eva A.G., Peretjagin S.P., Vanin A.F. Sravnitel'nyj analiz dejstvija svobodnogo i deponirovannogo NO na sostojanie pro- i antioksidantnyh sistem krovi // Biofizika. 2015. T. 60. № 2. S. 348–354.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

приглашает к сотрудничеству
фармпроизводителей и сельхозпредприятия
для совместного продвижения наших научных разработок.
Мы предлагаем лекарственные фитопрепараты к производству
и агротехнологии лекарственных и ароматических культур
для выращивания в различных регионах России

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Fax: 8(495)712-09-18

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru