

# ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

## ВЛИЯНИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

А. К. Мартусевич<sup>1</sup>, А. Г. Соловьева<sup>1</sup>, С. П. Перетягин<sup>1</sup>, А. Ф. Ванин<sup>2</sup>

Изучено влияние динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) на энергетический метаболизм эритроцитов при комбинированной термической травме. Исследование проведено на 30 крысах линии Вистар, 10 из которых были включены в интактную группу, остальным наносили термическую травму. Животным контрольной группы ( $n = 10$ ) лечение осуществляли ежедневными внутривенными инфузиями физиологического раствора. Крысы основной группы ( $n = 10$ ) получали ДНКЖ в физиологическом растворе (1:9). На третьи и 10-е сутки в эритроцитах животных определяли активность лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, уровень лактата, рассчитывали интегральные показатели. Установлено положительное действие ДНКЖ на энергетический метаболизм эритроцитов, реализующееся посредством регуляции активности лактатдегидрогеназы и наблюдающееся уже к третьим суткам послеожогового периода.

**Ключевые слова:** динитрозильные комплексы железа; энергетический метаболизм; эритроциты; лактат; лактатдегидрогеназа

### ВВЕДЕНИЕ

Влияние монооксида азота на состояние энергетического метаболизма осуществляется преимущественно через регуляцию функционирования NO-синтазы [16]. Это показано в исследованиях, в которых используют либо субстраты данного фермента (в частности, L-аргинин), либо специфические ингибиторы фермента (L-NAME и др.) [3], тогда как лишь в единичных работах определяют уровень NO в биосистеме [17]. Было установлено, что свободная окись азота способна дозозависимо модифицировать некоторые параметры энергетического обмена, в том числе, активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и концентрацию лактата в плазме и эритроцитах [8]. В частности, продемонстрирована возможность угнетения активности ЛДГ в крови *in vitro* при воздействии высоких концентраций NO. В то же время, учитывая крайне малое время полужизни NO (1 – 4 с), представляет значительный научный и практический интерес изучение фармакологических эффектов депонированных форм NO, в том числе динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [1, 13, 16, 20].

Термическая травма всегда сопряжена с нарушениями микроциркуляции и системной гемодинамики [4], а также метаболической дисфункцией с гипоксией и энергодефицитом [7, 10]. Спектр средств комплексной коррекции данных патологических процессов, во мно-

гих случаях NO-зависимых, крайне ограничен и представлен генератором воздушного потока, содержащего окись азота, для наружного применения [5, 18] и аппаратом терагерцовой терапии для стимуляции эндогенного синтеза соединения [9]. Лекарственные препараты системного действия в настоящее время в комбустиологии отсутствуют. В этом плане, среди известных доноров NO, привлекают внимание ДНКЖ, отличающиеся способностью постепенно высвобождать окись азота, а также депонироваться в комплексах с белками [1, 13, 14, 20].

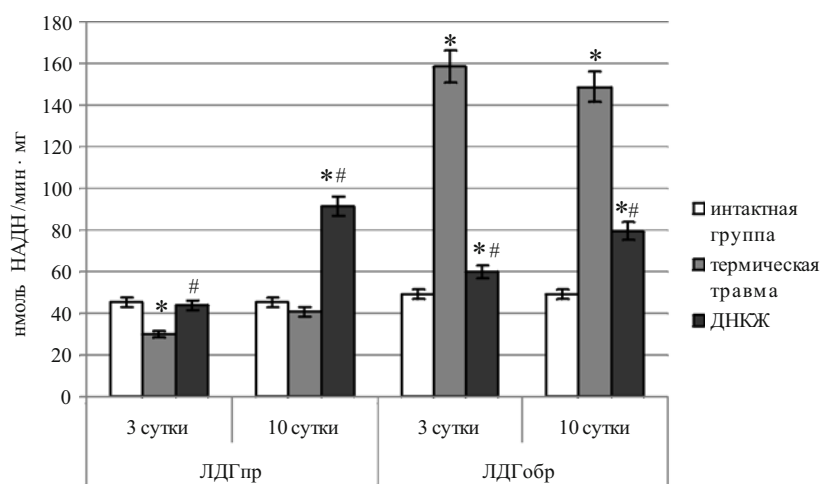
Цель данного исследования — оценка влияния ДНКЖ при системном введении на показатели энергетического метаболизма эритроцитов в модели комбинированной термической травмы.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 30 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 220 – 250 г, 10 из которых были включены в интактную группу (с ними никаких манипуляций не проводили, выполняли лишь однократный забор крови из подъязычной вены). Остальным животным наносили комбинированную травму по разработанной ранее методике [11], включающей контактный термический ожог кожи спины предварительно нагретым телом (площадь — 20 % поверхности тела) в сочетании с термоингаляционной травмой. Содержание животных, экспериментальные вмешательства осуществляли согласно приказу Минздрава СССР № 775 от 12.08.1977 г. Травму наносили животным, находящимся под комбинированным наркозом («золетил» + «ксил»). Затем крыс разделили на

<sup>1</sup> ФГБУ «ННИИТО» МЗ России, 603155, Нижний Новгород, Верхне-Волжская наб, 18/1.

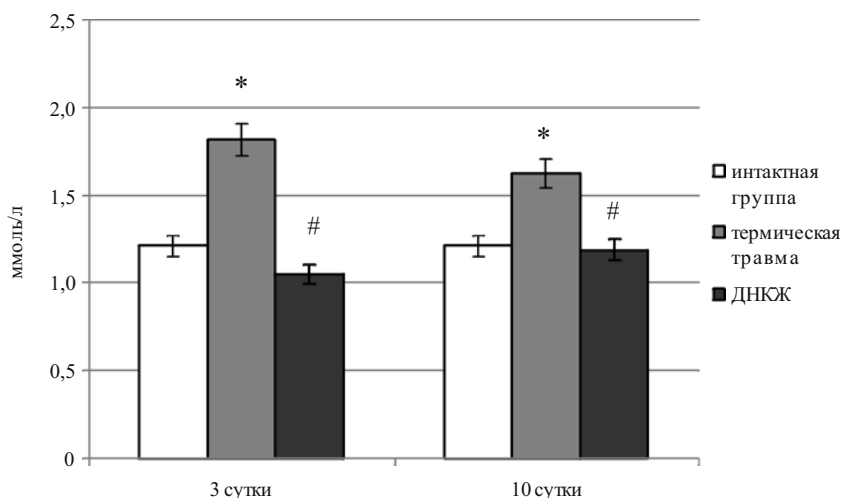
<sup>2</sup> Институт химической физики им Н. Н. Семенова РАН, 119991, Москва, пр. Косыгина, 4.



**Рис. 1.** Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов в норме и при комбинированной термической травме в зависимости от введения динитрозильных комплексов железа.

ЛДГпр — активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции, ЛДГобр — активность лактатдегидрогеназы в обратной реакции, ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа. Здесь и на рис. 2 и 3 различия статистически значимы:

\* — с уровнем у интактных животных,  $p < 0,05$ ; # — с уровнем у животных с комбинированной термической травмой,  $p < 0,05$ .

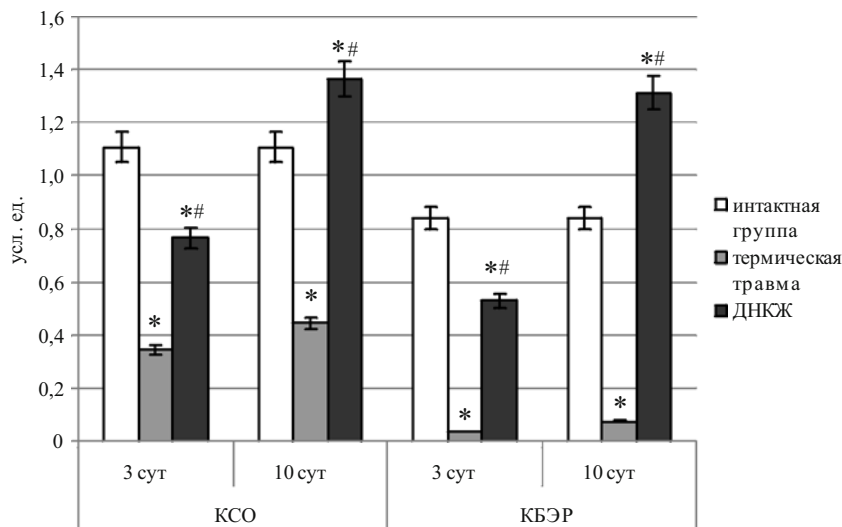


**Рис. 2.** Уровень лактата в эритроцитах в норме и при комбинированной термической травме в зависимости от введения динитрозильных комплексов железа.

Обозначения те же, что на рис. 1.

две равные по численности группы. Животных интактной группы лечили ежедневными внутривенными инфузиями физиологического раствора (1 мл), раны обрабатывали левомеколем. Крысы основной группы ежедневно внутривенно получали ДНКЖ в физиологическом растворе (1:9 (по объему) — суммарно 1 мл), местное лечение аналогично проводимому в контрольной группе. Лечение животных обеих групп проводили в течение 10 сут. ДНКЖ синтезировали по методике А. Ф. Ванина [20], концентрация ДНКЖ, определяемая спектрофотометрически по известной экстинкции при длинах волны 310 и 360 нм, в маточном растворе составляла 3,1 ммоль/л. На основании этого доза, вводимая крысе, составляла 1,55 мкмоль/кг.

Контрольными точками в исследовании были выбраны третьи и 10-е сутки с момента нанесения комбинированной травмы. На третьи (прижизненно) и 10-е (при выведении их из эксперимента, осуществленного под наркозом) сутки выполняли забор крови у животных обеих групп из подязычной вены. Кровь животных стабилизировали 3,8 % водным раствором цитрата натрия в соотношении 1:9 (v:v). Для получения эритроцитарной массы кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Эритроциты трехкратно отмывали изотоническим раствором хлорида натрия. Активность фермента и уровень лактата определяли непосредственно после проведения пробоподготовки.



**Рис. 3.** Производные коэффициенты энергетического метаболизма эритроцитов в норме и при комбинированной термической травме в зависимости от введения динитрозильных комплексов железа.

ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, КСО — коэффициент субстратного обеспечения, КБЭР — коэффициент баланса энергетических реакций. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

В качестве маркера интенсивности энергетического метаболизма использовали активность ЛДГ, а о его направленности судили по соотношению последней в прямой (ЛДГпр) и обратной (ЛДГобр) реакциях. Активность ЛДГ определяли в гемолизате эритроцитов в дистиллированной воде (1:40 по объему) по методу Г. А. Кочетова [6]. Уровень лактата в эритроцитах оценивали с помощью автоматического анализатора SuperGL Ambulance. Исходя из полученных значений параметров, рассчитывали интегральные показатели, характеризующие энергетический метаболизм эритроцитов: коэффициент субстратного обеспечения (КСО) и коэффициент баланса энергетических реакций (КБЭР) [8, 12]. Расчет данных показателей производили по следующим формулам:

$$\text{КБЭР} = \frac{\text{ЛДГпр}^2}{\text{ЛДГобр}^2} \cdot 100,$$

где ЛДГпр — активность ЛДГ в прямой реакции, ЛДГобр — активность ЛДГ в обратной реакции;

$$\text{КСО} = \frac{C(\text{лактат}) \cdot \text{ЛДГпр}}{\text{ЛДГобр}},$$

где  $C(\text{лактат})$  — концентрация лактата в плазме крови.

Данные статистически обрабатывали с использованием программного пакета Statistica 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с применением критерия Шапиро-Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскала-Уоллеса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить, что активность эритроцитарной ЛДГ в обратной реакции у крыс при модельной термической травме существенно изменена относительно животных интактной группы как на третьи, так и на 10-е сутки послеожогового периода ( $p < 0,05$ ). На третьи сутки послеожогового периода ЛДГпр у животных данной группы умеренно снижена, тогда как на 10-е эта тенденция сглаживается (рис. 1). Эти данные полностью соответствуют полученным ранее результатам [2].

Системное введение ДНКЖ животным с комплексным термическим повреждением значительно модифицировало активность фермента как в прямой, так и в обратной реакциях. В частности, каталитические свойства эритроцитарной ЛДГпр у крыс данной группы на третьи сутки практически не отличались от характерных для интактных животных, значимо превосходя уровень контрольной группы ( $p < 0,05$ ). На 10-е сутки послеожогового периода у животных основной группы наблюдали выраженное нарастание активности энзима в прямой реакции, превышающее значения, выявленные для животных как интактной, так и контрольной групп в 2,02 и 2,24 раза, соответственно ( $p < 0,05$ ). С учетом метаболической сущности данной реакции (синтез пирувата с дальнейшей его поставкой в цикл Кребса) подобную динамику показателя следует, на наш взгляд, расценивать как результат положительного воздействия ДНКЖ на исследуемый компонент энергетического метаболизма [12, 15].

Этому заключению в полной мере соответствует характер влияния изучаемого соединения на активность ЛДГ в обратной реакции: на третьи сутки она была лишь минимально повышена относительно уровня ин-

тактных животных (в 1,21 раза;  $p < 0,05$ ), оставаясь значительно ниже значений, зарегистрированных у животных контрольной группы (в 2,64 раза;  $p < 0,05$ ). Аналогичная картина имела место и на 10-е сутки послеожогового периода (к моменту завершения эксперимента). Таким образом, исследования позволили предположить, что изучаемая депонированная форма окиси азота предотвращает избыточную активацию ЛДГобр, потенцирующую синтез лактата, известного молекулярного маркера гипоксии [8, 10].

Результат оценки уровня лактата в эритроцитах в экспериментальных группах животных приведен на диаграмме (рис. 2). Установлено, что, аналогично изменениям каталитических свойств ЛДГ, на третьи сутки после нанесения ожога у животных контрольной группы имело место существенное повышение концентрации лактата в эритроцитах относительно уровня у интактных крыс (в 1,5 раза;  $p < 0,05$ ), сохраняющееся к завершению эксперимента (в 1,35 раза на 10-е сутки;  $p < 0,05$ ). Данная динамика подтверждает формирующееся в результате тяжелой термической травмы смещение активности ЛДГ в сторону обратной реакции [2].

Иная картина регистрируется у животных, получавших инъекции ДНКЖ (рис. 2), у которых отмечена нормализация рассматриваемого звена энергетического метаболизма крови на всех сроках. Динамика концентрации лактата в эритроцитах у животных основной группы косвенно свидетельствовала о повышении адаптационных резервов исследуемого компонента клеточной системы энергообеспечения при действии депонированной формы окиси азота.

Для получения интегральной информации о состоянии рассматриваемого звена энергетического метаболизма был произведен расчет дополнительных параметров: коэффициентов субстратного обеспечения и баланса энергетических реакций (рис. 3). Отмечено выраженное смещение режима функционирования ЛДГ: с существенной активацией обратной реакции на фоне угнетения прямой, наблюдавшееся у крыс контрольной группы, что проявилось в резком снижении уровня КБЭР на третьи и 10-е сутки послеожогового периода (в 23,1 и 11,2 раз соответственно,  $p < 0,05$ ). Этот сдвиг отражает системную метаболическую дезадаптацию, формирующуюся в условиях тяжелой термической травмы. При введении животным с комбинированной термической травмой ДНКЖ на третьи сутки лечения регистрировали лишь умеренное падение КБЭР (в 1,58 раза;  $p < 0,05$ ), сменявшееся его нарастанием ко времени завершения эксперимента (в 1,57 раза;  $p < 0,05$ ), что, в свою очередь, свидетельствовало о медикаментозной стимуляции адаптационных резервов энергетического обмена.

Аналогичная, но менее показательная динамика была выявлена в отношении коэффициента субстратного обеспечения: у животных контрольной группы как на третьи, так и на 10-е сутки регистрировали зна-

чительное снижение КСО (в 3,2 и 2,5 раза соответственно;  $p < 0,05$ ), что указывало на сопряженность сдвигов каталитической активности ЛДГ и эритроцитарной концентрации лактата, а также их декомпенсацию в условиях моделирования комбинированной ожоговой травмы. В то же время модуль сдвигов данного коэффициента при проведении курса инфузионной терапии с включением ДНКЖ был существенно меньше, причем на третьи сутки обнаруживали умеренное снижение показателя (69 % от нормы;  $p < 0,05$ ) с последующим его выраженным приростом (123 % от нормы;  $p < 0,05$ ). Эта тенденция, по нашему мнению, указывает на протективное, адаптогенное действие изучаемого соединения в отношении энергетического метаболизма эритроцитов.

Следует отметить, что представленные данные о ДНКЖ-ассоциированной коррекции метаболических нарушений, вызванных термической травмой, четко коррелирует с результатами эффективности лечения. В частности, в основной группе отсутствовала гибель животных до завершения эксперимента (10-е сутки с момента нанесения травмы), тогда как в контрольной группе 2 крысы погибли до этого времени, а скорость заживления кожной раны у животных основной группы была на 15 – 20 % выше, чем в контрольной группе.

Результаты проведенных исследований указывают на положительное действие ДНКЖ на энергетический метаболизм эритроцитов, которое реализуется посредством регуляции каталитических свойств лактатдегидрогеназы. Следует отметить, что данный адаптивный эффект наблюдали уже к третьим суткам послеожогового периода, полноценно проявляясь к завершению десятых суток с момента нанесения термической травмы.

## ВЫВОДЫ

1. Термическая травма, включающая контактный термический ожог и термоингаляционное поражение, приводила к существенным нарушениям энергетического метаболизма эритроцитов (угнетение активности ЛДГ в прямой реакции на 22 % с параллельным увеличением ЛДГобр на 201 % на третьи сутки послеожогового периода,  $p < 0,05$ ), нарастанию концентрации лактата в эритроцитах крыс (на 50 %,  $p < 0,01$ ).

2. Динитрозильные комплексы железа (1,55 мкмоль/кг, 10 сут, внутривенно) стимулируют энергетический метаболизм эритроцитов крыс с термической травмой за счет: активации ЛДГ в прямой реакции (на 102 %,  $p < 0,01$ ), ЛДГ в обратной реакции (на 21 %,  $p < 0,05$ ), снижения темпов нарастания уровня лактата (12 % против 50 % у крыс контрольной группы,  $p < 0,01$ ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ф. Ванин, О. И. Писаренко, И. М. Студнева и др., *Кардиология*, № 12, 43 – 49 (2009).

2. А. В. Воробьев, А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева и др., *Бюл. эксп. биол.*, **147**(4), 404 – 406 (2009).
3. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств*, Вузовская книга, Москва (2004).
4. М. А. Гольдзон, В. Т. Долгих, *Общая реаниматология*, **8**(1), 11 – 14 (2011).
5. О. И. Кваша, Н. Б. Чеснокова, В. П. Быков и др., *Мед. альманах*, № 3, 54 – 55 (2013).
6. Г. А. Кочетов, *Практическое руководство по энзимологии*, Высшая школа, Москва (1980).
7. А. К. Мартусевич, С. П. Перетягин, И. Е. Погодин, *Пат. физиол.*, № 1, 30 – 32 (2009).
8. А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, С. П. Перетягин, В. Н. Митрофанов, *Биомедицина*, № 1, 103 – 108 (2013).
9. В. Н. Островский, С. М. Никитюк, В. Ф. Киричук и др., *Биомедицинские технологии и радиоэлектроника*, № 11, с. 55 – 61 (2004).
10. Б. А. Парамонов, Я. О. Порембский, В. Г. Яблонский, *Ожог. Руководство для врачей*, СпецЛит, Санкт-Петербург (2000).
11. С. П. Перетягин, А. К. Мартусевич, И. Р. Вазина и др., *Современные технологии в медицине*, № 2, 106 – 109 (2011).
12. А. Г. Соловьева, Ю. В. Зимин, *Современные технологии в медицине*, № 2, 116 – 117 (2012).
13. А. А. Тимошин, С. А. Губкина, Ц. Р. Орлова и др., *Доклады РАН*, **425**(5), 696 – 700 (2009).
14. К. Б. Шумаев, Н. Э. Петрова, И. В. Заббарова, А. Ф. Ванин и др., *Биохимия*, **69**(5), 699 – 705 (2004).
15. A. Almeida, S. Moncada, J. P. Bolanos, *Nat. Cell Biol.*, **6**(1), 45 – 51 (2004).
16. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., *Nitric Oxide*, **26**(3), 148 – 156 (2012).
17. C. N. Hall, J. Garthwaite, *Nitric Oxide*, **21**(2), 92 – 103 (2009).
18. A. B. Shekhter, V. A. Serezhenkov, T. G. Rudenko, et al., *Nitric oxide*, **12**(4), 210 – 219 (2005).
19. Y. Tsuura, H. Shida, T. Shinomura, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **252**(1), 34 – 38 (1998).
20. A. F. Vanin, *Nitric Oxide*, **21**(1), 1 – 13 (2009).

Поступила 24.10.13

## EFFECT OF DINITROSYL IRON COMPLEXES ON ERYTHROCYTE ENERGY METABOLISM UNDER THERMAL TRAUMA CONDITIONS

A. K. Martusevich<sup>1</sup>, A. G. Solov'eva<sup>1</sup>, S. P. Peretyagin<sup>1</sup>, and A. F. Vanin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nizhny Novgorod, Verkhne-Volzhskaia nab. 18/1, 603155, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Science, prosp. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

The effect of dinitrosyl iron complexes (DNIC) on the energy metabolism of erythrocytes under combined thermal trauma conditions has been studied on a group of 30 Wistar rats, which was divided into 3 groups: intact ( $n = 10$ ), control ( $n = 10$ ), and main ( $n = 10$ ). Combined thermal trauma (skin burn + thermoinhalation damage) was modeled in animals of the control and main groups. Rats of control group received infusions of sodium chloride solution ( $n = 10$ ) every day. Rats of the main group obtained infusions of DNIC solution in sodium chloride. Rat blood samples were characterized by the activity of lactate dehydrogenase in direct and reverse reaction, lactate level, and coefficients of the substrate provision and energy reactions balance. It was stated, that DNIC clearly normalized the energy metabolism of erythrocytes beginning with the third day after thermal trauma onset.

**Keywords:** dinitrosyl iron complexes; energy metabolism; erythrocytes; lactate; lactate dehydrogenase