

ВЛИЯНИЕ СВОБОДНОГО И ДЕПОНИРОВАННОГО ОКСИДА АЗОТА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ КРОВИ

УДК 577.471:612.1

Поступила 11.04.2013 г.



А.К. Мартусевич, к.м.н., старший научный сотрудник отделения экспериментальной медицины;
А.Г. Соловьева, к.б.н., научный сотрудник отделения экспериментальной медицины;
С.П. Перетягин, д.м.н., профессор, руководитель отделения экспериментальной медицины

Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии Минздрава России, Н. Новгород, 603155, Верхне-Волжская набережная, 18

Цель исследования — сравнительный анализ эффектов воздействия свободного и связанного оксида азота на параметры энергетического метаболизма эритроцитов *in vitro*.

Материалы и методы. Выполняли две серии экспериментов. В первой серии производили прямой барботаж образцов крови (5 мл) газообразным оксидом азота на трех мощностях используемого прибора. Генерацию оксида азота (800 мкг/л) осуществляли аппаратом «Плазон» (Россия). Во второй серии к трем опытным образцам крови добавляли 0,05; 0,1 и 0,2 мл водного раствора динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) соответственно (концентрация соединения — 3 ммоль/л). В крови определяли активность лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, а также уровень лактата в эритроцитах. Для оценки сдвигов энергетического метаболизма использовали ряд производных коэффициентов.

Результаты. Установлено, что высокие концентрации свободного оксида азота ингибируют активность ферментных систем, относящихся к энергетическому метаболизму. Напротив, депонированные формы оксида азота (ДНКЖ) оказывают выраженный стимулирующий эффект в отношении энергетического обмена эритроцитов.

Ключевые слова: оксид азота; динитрозильные комплексы железа; энергетический метаболизм; лактатдегидрогеназа.

English

The Effect of Free and Bound Nitric Oxide on Blood Energy Metabolism

A.K. Martusevich, PhD, Senior Research Worker, the Department of Experimental Medicine;
A.G. Solovyova, PhD, Research Worker, the Department of Experimental Medicine;
S.P. Peretyagin, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Experimental Medicine

Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health of the Russian Federation, Verkhne-Volzhsкая naberezhnaya St., 18, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603155

The aim of the investigation was to perform a comparative analysis of free and bound nitric oxide effects on erythrocyte energy metabolic parameters *in vitro*.

Materials and Methods. Two series of experiments were carried out. In the first series we processed blood samples (5 ml) by gaseous nitric oxide (800 µg/l) using three regimens of "Plazon" apparatus (Russia). In the second series we saturated three aliquot blood samples by 0.05; 0.1 and 0.2 ml of dinitrozyl iron complexes (DNIC) respectively (concentration of the compound was 3 mmol/l). We determined lactate dehydrogenase activity in direct and indirect reactions and lactate level in blood and erythrocytes. A number of derived coefficients were calculated to estimate energy metabolic changes.

Results. High concentrations of free nitric oxide were found to inhibit the activity of enzyme systems related to energy metabolism. On the contrary, DNIC have a stimulating effect on erythrocytes energy metabolism.

Key words: nitric oxide; dinitrozyl iron complexes; energy metabolism; lactate dehydrogenase.

Еще в 1989 г. В. Brune и Е.С. Lapetina показали, что оксид азота (NO) оказывает влияние на процесс рибозилирования некоего цитозольного белка с молеку-

лярной массой 37 кДа [1], позднее идентифицированного как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ключевой фермент гликолиза [2, 3]. Этот эффект был

Для контактов: Мартусевич Андрей Кимович, тел. моб. +7 909-144-91-82; e-mail: cryst-mart@yandex.ru

подтвержден J. Zhang и S.H. Snyder (1992) на культуре нейрональных клеток [4], а в дальнейшем — и в отношении других клеточных пулов и ферментов (в частности, фосфофруктокиназы островковых клеток поджелудочной железы и нейронов) [5, 6]. Ряд работ посвящены участию оксида азота и NO-синтазы в адаптации к гипоксии и гипоперфузии тканей и даже к опухолевому процессу за счет модификации функционирования различных звеньев тканевого дыхания [7–9]. Однако механизм данного влияния до сих пор до конца не изучен. Более того, встречаются противоречивые сведения о характере действия соединения на внутриклеточный транспорт глюкозы и энергетический обмен, в частности на примере скелетной мышцы [9, 10]. Эти и другие данные литературы дают возможность постулировать значимость влияния оксида азота на энергетический метаболизм [10, 11], хотя его особенности пока остаются нераскрытыми. Ситуация осложняется тем обстоятельством, что эксперименты по уточнению реализации биорегуляторной функции NO базируются лишь на косвенном его влиянии на уровень продукции [1, 5, 9–11]. С учетом того, что в организме и модельных биосистемах, используемых для проведения большинства соответствующих исследований (клеточные культуры), присутствует как ферментативный (путем активации NO-синтазы), так и неферментативный синтез оксида азота [11, 10], а также может происходить его высвобождение из естественных депо (S-нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа [12–14]), подобный подход подчас приводит к получению противоречивых результатов. В то же время исследования непосредственного влияния NO на биосистемы единичны [13, 15, 16].

Кроме того, принципиальной проблемой является определение физиологического уровня оксида азота в биологических системах [17], а следовательно, затруднителен адекватный выбор диапазона воздействующих доз NO для оценки их влияния на энергетический обмен и процессы клеточного дыхания [18, 19]. Так, нашими предшествующими исследованиями [20] удалось установить, что непосредственная обработка крови высокими дозами соединения (800 ppm) оказывает угнетающее действие, смещая функционирование лактатдегидрогеназы в сторону обратной реакции и приводя к накоплению лактата. Однако для понимания механизмов этих сдвигов необходимо более детальное изучение вопроса.

Цель исследования — сравнительный анализ воздействия эффектов газообразного (свободного) и связанного (депонированного) оксида азота на параметры энергетического метаболизма эритроцитов *in vitro*.

Материалы и методы. Изучен характер реакции цельной консервированной крови на воздействие свободного и депонированного азота. Выполняли две серии экспериментов: в первой устанавливали характер влияния на показатели энергетического обмена крови газообразного оксида азота, во второй — депонированного (в форме динитрозильных комплексов железа — ДНКЖ).

Для проведения эксперимента в каждой из серий

кровь разделяли на 4 порции (интактную, на которую не оказывали воздействия, и 3 опытных, подвергавшихся обработке). В первой серии производили прямой барботаж опытных образцов крови (5 мл) газообразным NO на трех имеющихся мощностях использованного прибора — минимальной (min), средней (norm) и максимальной (max). Генерацию холодной плазмы, насыщенной NO (концентрация вещества в газовом потоке в выбранных условиях — 800 мкг/л), выполняли аппаратом «Плазон» (Россия). Экспозиция после воздействия составляла 3 мин.

Во второй серии к трем опытным образцам крови добавляли 0,05; 0,1 и 0,2 мл свежеполученного водного раствора ДНКЖ соответственно (концентрация соединения, определенная спектрофотометрически по известным молекулярным экстинкциям при длинах волны 310 и 360 нм, — 3 ммоль/л). Синтез ДНКЖ производили по методике А.Ф. Ванина с соавт. [21]. Экспозиция после введения соединения также составляла 3 мин.

В гемолизате отмытых эритроцитов (1:40) определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в прямой и обратной реакциях по методу Г.А. Кочетова (1980) в нашей модификации [19, 22]. Содержание белка устанавливали по модифицированному методу Лоури. Уровень лактата в плазме крови и эритроцитах определяли с помощью анализатора Super GL Ambulance (Германия).

Для оценки направленности сдвигов энергетического метаболизма крови при действии выбранных физико-химических факторов использовали ряд специализированных коэффициентов: коэффициент баланса энергетических реакций (КБЭР) [22], коэффициент субстратного обеспечения (КСО). Расчет данных показателей производили по следующим формулам:

$$КБЭР = \frac{ЛДГ_{пр}^2}{ЛДГ_{обр}^2} \cdot 100 \quad [11],$$

где $ЛДГ_{пр}$ — активность ЛДГ в прямой реакции, $ЛДГ_{обр}$ — активность ЛДГ в обратной реакции;

$$КСО = \frac{C(лактат) \cdot ЛДГ_{пр}}{ЛДГ_{обр}},$$

где $C(лактат)$ — концентрация лактата в плазме крови.

Результаты обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение. Учитывая то обстоятельство, что наиболее изученным молекулярным механизмом действия NO на биологические системы является модификация каталитических свойств ферментных систем, нами была проведена оценка активности ЛДГ в прямой и обратной реакциях (рис. 1). Установлено, что свободная и связанная формы NO оказывают на рассматриваемый фермент принципиально различное действие. Так, в отношении прямой реакции ЛДГ оксид азота, генерируемый при всех возможных мощностях аппарата «Плазон», способствует умеренному ингибированию активности энзима (на 15–35% по сравнению с контрольными значениями; $p < 0,05$), причем четкой зависимости между использованной мощностью прибора

и выраженностью ингибирующего эффекта не выявлено (рис. 1, а).

Напротив, введение в цельную кровь человека депонированной формы оксида азота (ДНКЖ) приводит к существенной стимуляции каталитических свойств ЛДГ в прямой реакции (на 38; 45,4 и 81,7% относительно интактного образца для 0,05; 0,1 и 0,2 мл ДНКЖ соответственно; $p < 0,05$ для всех случаев). Следует отметить выраженную дозозависимость данной тенденции (уровень корреляции между количеством введенных ДНКЖ и активностью энзима в обратной реакции $r = +0,94$; $p < 0,01$).

Исследование активности ЛДГ в обратной реакции позволило выявить противоположную динамику: обработка биологической жидкости NO-содержащим газовым потоком стимулирует каталитические свойства фермента (рис. 1, б). При этом, как и в прямой реакции, значимой зависимости указанного параметра от мощности генератора не обнаружено. Так, при всех режимах работы аппарата регистрировали прирост активности ЛДГ в обратной реакции на 20,7–24,8% относительно контрольного образца ($p < 0,05$). В то же время введение в образцы крови химического аналога естественной депонированной формы NO — ДНКЖ — не вызывало существенных сдвигов активности ЛДГ в обратной реакции только в случае использования минимальной дозы соединения — 0,05 мл (0,15 мкмоль). При добавлении в биологическую жидкость больших количеств ДНКЖ наблюдали отчетливый ингибиторный эффект ($p < 0,05$).

Подобная динамика функционирования рассматриваемого фермента дает основание предполагать, что применение свободного NO в концентрации 800 ppm оказывает ингибирующее влияние на данный компонент энергетического метаболизма, затрудняя протекание аэробного гликолиза, тогда как введение в биосреду депонированного NO приводит к развитию противоположного эффекта.

Эти результаты подтверждаются данными оценки внутриэритроцитарного уровня одного из субстратов изучаемого энзима — лактата (рис. 2). Установлено, что прямой барботаж образцов цельной крови человека газообразным NO обеспечивает значимое нарастание лактата в эритроцитах, причем выраженность сдвига уровня оцениваемого показателя практически не меняется относительно используемого режима NO-генератора. По нашему мнению, выявленное накопление лактата внутри эритроцитов с учетом данных по модификации каталитических свойств ЛДГ служит признаком формирующегося под влиянием высоких концентраций NO энергодефицита, что подтверждает сведения литературы об ингибировании процессов энергопродукции в митохондриях при косвенной стимуляции синтеза NO [6, 20].

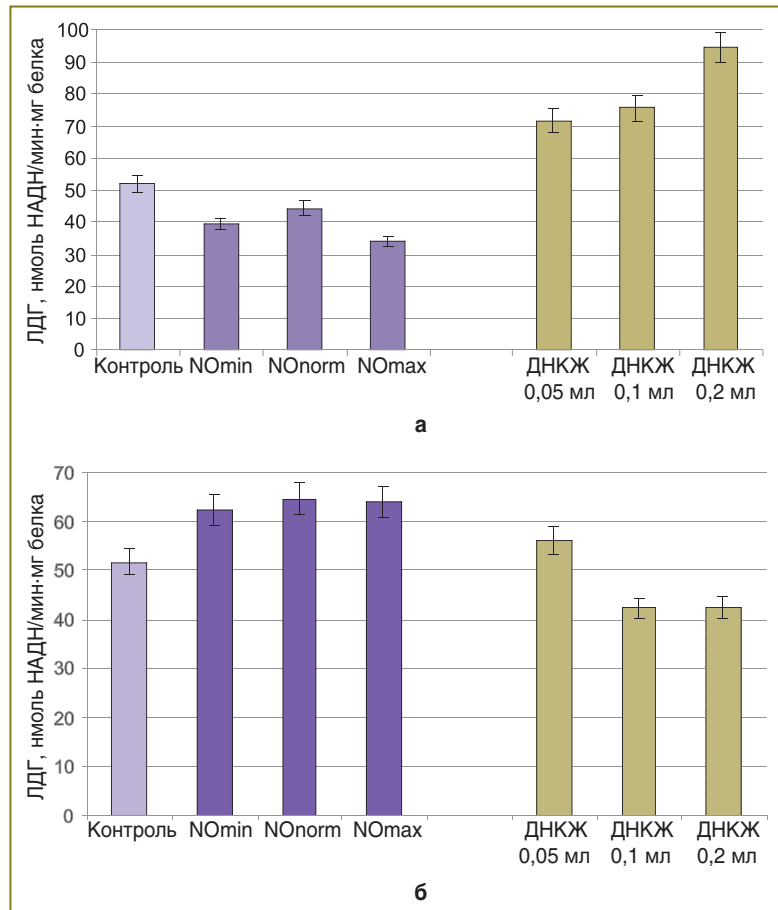


Рис. 1. Активность лактатдегидрогеназы эритроцитов в прямой (а) и обратной (б) реакции при воздействии разных источников оксида азота *in vitro*

Нашими экспериментами установлено, что воздействие депонированной формы NO не оказывает столь значимого влияния на внутриэритроцитарную концентрацию лактата: его уровень существенно повышается лишь при введении в образцы крови максимального количества ДНКЖ (0,2 мл=0,6 мкмоль). В то же время отмечена прямая зависимость между значением указанного параметра и количеством естественного донора NO ($r = +0,93$; $p < 0,01$).

Для получения интегрального представления о направленности изменений энергетического метаболизма эритроцитов при действии различных форм NO был выполнен расчет ряда производных коэффициентов. Так, динамику функционирования ЛДГ оценивали с помощью коэффициента баланса энергетических реакций (рис. 3). Установлено, что обработка цельной крови газообразным NO приводит к умеренному снижению данного параметра (в 2,1–3,5 раза в зависимости от примененной мощности аппарата; $p < 0,01$). Это дополнительно свидетельствует о формировании в этих образцах выраженного энергодефицита со смещением каталитической активности ЛДГ в сторону обратной реакции. Наоборот, насыщение крови депонированной формой NO демонстрирует дозозависимое нарастание КБЭР, темпы которого минимальны при введении в биологическую жидкость 0,05 мл ДНКЖ, а

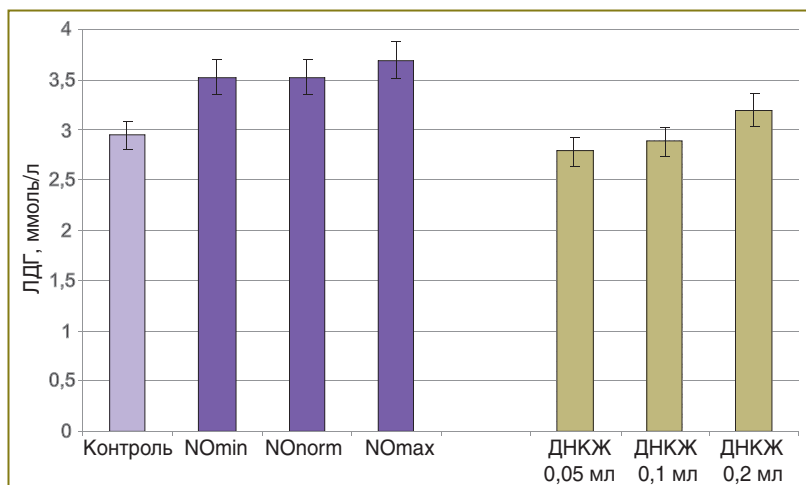


Рис. 2. Уровень лактата в эритроцитах при обработке крови связанным и свободным оксидом азота

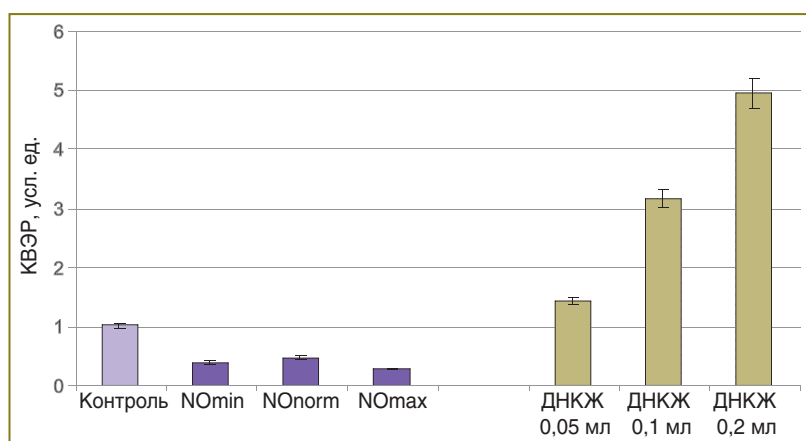


Рис. 3. Характер NO-ассоциированных сдвигов коэффициента баланса энергетических реакций крови в зависимости от источника оксида азота

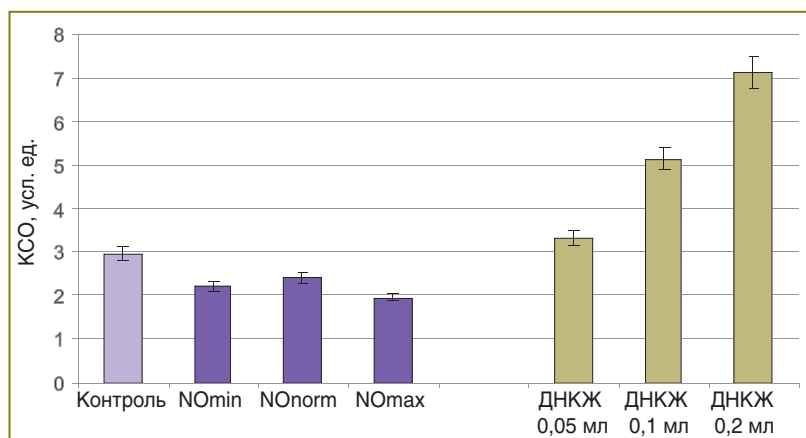


Рис. 4. Уровень коэффициента субстратного обеспечения крови при ее обработке различными источниками NO

в случае использования максимальной из выбранных доз агента (0,2 мл) уровень показателя возрастает практически в 5 раз ($p < 0,01$). Это указывает на стимуляцию оксидом азота энергетического метаболизма, наблюдаемую и другими авторами в условиях физио-

развитии его эффектов. Так, высокие концентрации свободного NO, кроме непосредственного повреждающего действия, обеспечивающегося преимущественно за счет синтеза пероксинитрита [8, 10, 12], ингибируют активность многих ферментных систем, в том числе от-

логической стимуляции активности NO-синтазы [1, 5, 11].

Учет текущего уровня лактата, осуществляемый при анализе КСО, также позволил верифицировать различный эффект сопоставляемых воздействий (рис. 4). Так, после проведения барботаж крови газообразным NO значение данного оценочного критерия практически не отличается от контрольных значений вследствие частичной компенсации выраженного преобладания обратной реакции ЛДГ над прямой накоплением лактата в эритроцитах. При этом мощность NO-генератора, непосредственно влияющая на скорость газового потока, но (по мнению разработчиков аппарата) не на концентрацию NO, лишь незначимо меняет уровень КСО.

В отношении связанной формы NO, как и в случае использования КБЭР, регистрировали дозозависимое увеличение значения параметра, причем существенный прирост рассматриваемого показателя обнаруживали начиная с 0,1 мл (0,3 мкмоль) ДНКЖ. Важно отметить, что, реализуясь на фоне практически неизменного уровня лактата в эритроцитах, эта динамика свидетельствует о преимущественном влиянии постепенно высвобождающихся молекул NO на каталитические свойства ЛДГ, что подтверждается отдельными косвенными данными литературы [10].

Таким образом, анализ интегральных параметров энергетического метаболизма также продемонстрировал различный характер его реакции на экзогенное введение свободной и связанной форм NO *in vitro*, причем в первом случае наблюдали угнетение рассматриваемого компонента энергетического обмена (формирование энергодефицита), тогда как во втором — повышение энергетического потенциала эритроцитов.

Многообразие метаболических путей NO, многие из которых в настоящее время расшифрованы (рис. 5), позволяет говорить о дуализме его молекулярно-клеточных и организменных эффектов. Это в полной мере отражают результаты проведенного исследования, указывающие на ключевую роль концентрации и химической формы соединения при развитии его эффектов. Так, высокие концентрации свободного NO, кроме непосредственного повреждающего действия, обеспечивающегося преимущественно за счет синтеза пероксинитрита [8, 10, 12], ингибируют активность многих ферментных систем, в том числе от-

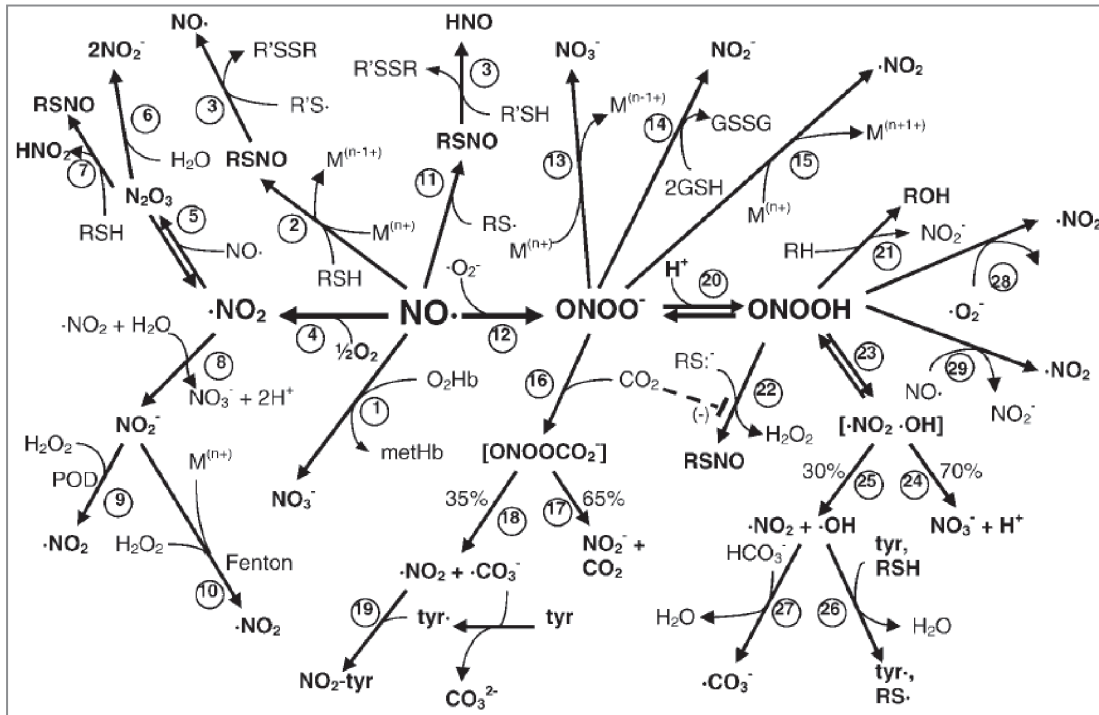


Рис. 5. Биохимия оксида азота (по Е.В. Manukhina et al., 2006 [11])

носящихся к энергетическому метаболизму. Напротив, депонированные формы оксида азота (ДНКЖ), способные вследствие возможности связывания с белковыми макромолекулами к длительному сохранению в крови даже *in vivo* (в биологической жидкости кролика — до нескольких дней [14]) к оптимальному по скорости высвобождению NO, оказывают выраженный стимулирующий эффект в отношении энергетического обмена эритроцитов. Следует отметить, что он носит дозозависимый характер, что позитивно характеризует фармакологические свойства экзогенных ДНКЖ.

Заключение. Результаты эксперимента свидетельствуют о выраженном непосредственном влиянии оксида азота на энергетический метаболизм, направленность и значимость которого детерминированы количеством и формой воздействующего соединения.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках фрагмента государственного задания Министерства здравоохранения РФ за счет средств НИИТО.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Brune B., Lapetina E.G. Activation of cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem* 1989; 264: 8455–8458.
2. Dimmler S., Brune B. Characterization of a nitric oxide-catalysed ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1992; 210: 305–310.
3. Mohr S., Hallak H., de Boitte A., et al. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1999; 274: 9427–9430.

4. Zhang S., Snyder S.H. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1992; 89: 9382–9385.
5. Almeida A., Moncada S., Bolanos J.P. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 45–51.
6. Tsuura Y., Shida H., Shinomura T., et al. Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofructokinase activity in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 34–38.
7. Михайленко В.М. Изменения энергетического статуса опухолевых клеток при действии экзогенных оксидов азота. *Сибирский онкологический журнал* 2009. Приложение 2: 137–138.
8. LeCras T.D., McMurthy I.F. Nitric oxide production in hypoxic lung. *Am J Physiol* 2001; 280(4): 1575–1582.
9. Young M.E., Radda G.K., Leighton B. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle *in vitro*. *Biochem J* 1997; 322: 223–228.
10. Stanley W.C., Recchia F.A., Lopaschuk G.D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85: 1093–1120.
11. Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med* 2006; 231: 343–365.
12. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. *Вестник РАМН* 2000; 4: 3–5.
13. Ванин А.Ф., Писаренко О.И., Студнева И.М. с соавт. Действие динитрозильного комплекса железа на метаболизм и клеточные мембраны ишемизированного сердца крысы. *Кардиология* 2009; 12: 43–49.
14. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology. *Nitric Oxide Biol Chem* 2009; 21: 136–149.
15. Chazov E.I., Rodnenkov O.V., Zorin A.V., et al. Hypotensive effect of Oxacom containing a dinitrosyl iron complex with glutathione. Animal studies and clinical trials on healthy volunteers. *Nitric Oxide Biol Chem* 2012; 26: 148–156.
16. Gilliano N.Ya., Konevega L.V., Noskin L.A., et al. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: Studies

with HeLa cell cultures. *Nitric Oxide Biol Chem* 2011; 24: 151–159.

17. Hall C.N., Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide Biol Chem* 2009; 12: 92–103.

18. Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Молекулярная стереотипия в реализации эффекта некоторых лечебных физико-химических факторов: роль NO. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского* 2012; 2(Часть 3): 205–210.

19. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Митрофанов В.Н. Оценка влияния некоторых физических факторов на энергетический метаболизм крови *in vitro*. *Биомедицина* 2013; 1: 103–108.

20. Tatsumi T., Matoba S., Kawahara A., et al. Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes. *J Am College Cardiol* 2000; 35(5): 1338–1346.

21. Ванин А.Ф., Лозинский В.И., Капелько В.И. Полимерная композиция для создания стабилизированной формы динитрозильного комплекса железа и метод синтеза этой формы. Патент РФ №2291880 от 01.12.2005 г.

22. Соловьева А.Г., Зимин Ю.В. Новый способ оценки динамики метаболизма крови у больных с термической травмой. *Современные технологии в медицине* 2012; 2: 116–117.