

МОДИФИКАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЗВЕНЬЕВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ЭКЗОГЕННЫМ ОКСИДОМ АЗОТА

Мартусевич Андрей Кимович, доктор биологических наук, профессор кафедры «Физиология и биохимия животных»¹, старший научный сотрудник, отделения экспериментальной медицины²

Самоделкин Александр Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Физиология и биохимия животных»¹

Соловьева Анна Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отделения экспериментальной медицины²

¹ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»
603097, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 97.

²ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России

603155, г. Нижний Новгород, Верхне-Волжская наб., д. 18;

Тел. (831) 436-25-31,

e-mail: cryst-mart@yandex.ru

Ключевые слова: оксид азота, ингаляции, энергетический обмен, лактатдегидрогеназа

Целью исследования служило изучение действия курса ингаляций оксида азота (NO) на некоторые параметры энергетического метаболизма крови здоровых крыс. Установлено, что проведение курса ингаляций низких концентраций NO (20 ppm) активирует промежуточное звено энергетического метаболизма.

Введение

Представления о многогранной роли монооксида азота (NO) как универсального биорегулятора преимущественно касаются его функционирования при модуляции экзогенного синтеза или высвобождения [1-3]. С другой стороны, результат влияния на различные системы организма человека и животных экзогенного NO остается до конца не раскрытым. В предшествующих исследованиях нами было показано, что результат действия газообразного оксида азота на метаболические параметры крови *in vitro* непосредственно зависит от концентрации соединения [4-6]. Так, если высокие дозы NO (800 ppm) вызывают целый ряд негативных эффектов, в том числе развитие окислительного стресса, энергодефицита, накопление лактата, гиперсинтез метгемоглобина и др. [4], то использование в тех же условиях бо-

лее низких концентраций агента (100 ppm) обеспечивает стимуляцию некоторых звеньев энергетического метаболизма и ферментных детоксикационных систем крови, умеренный антиоксидантный эффект [5, 6]. Однако указанные данные нуждаются в подтверждении *in vivo*. В связи с этим целью данного исследования служило изучение действия курсовых ингаляций низких концентраций NO на некоторые параметры энергетического метаболизма крови здоровых крыс.

Объекты и методы исследований

В эксперимент было включено 20 крыс-самцов линии Вистар (масса тела 200-250 г). Было сформировано 2 группы животных: контрольная группа (n=10), включающая животных, которым не выполняли манипуляций; и основная группа (n=10), животные которой получали ингаляции га-

зовой смеси, содержащей оксид азота (концентрация – 20 ppm). Ингаляции осуществляли ежедневно в течение 10 дней, их продолжительность составляла 10 мин., а скорость подачи газовой смеси – 2 л/мин.

Синтез NO-содержащей воздушной смеси осуществляли с помощью экспериментального генератора, разработанного в РФЯЦ-ВНИИЭФ (г. Саров). Выведение животных из эксперимента проводили путем декапитации под наркозом после завершения полного курса ингаляций.

В качестве маркера состояния энергетического метаболизма использовали активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в прямой (ЛДГпр) и обратной (ЛДГобр) реакциях. Активность ЛДГ определяли в гемолизате эритроцитов по модифицированному методу Г.А. Кочетова [5, 6]. Уровень лактата в эритроцитах оценивали с помощью автоматического анализатора SuperGL Ambulance. Рассчитывали интегральные показатели энергетического метаболизма эритроцитов: коэффициент субстратного обеспечения (КСО) и баланса энергетических реакций (КБЭР) [5].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты исследований

Выявлено, что рассматриваемое воздействие оказывает выраженное стимулирующее действие на активность эритроцитарной ЛДГ, реализующееся в отношении прямой и обратной реакции фермента (рис. 1).

С другой стороны, важно отметить, что данный эффект в большей степени касает-

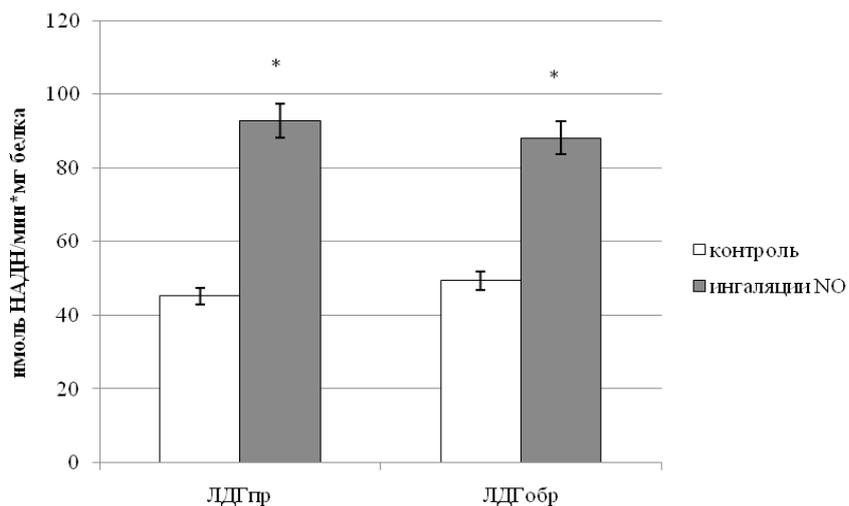


Рис. 1 – Влияние курса ингаляций оксида азота на активность лактатдегидрогеназы (ЛДГпр) эритроцитов в прямой (ЛДГпр) и обратной (ЛДГобр) реакциях («*» – уровень значимости различий по сравнению с уровнем, характерным для интактных животных $p < 0,05$)

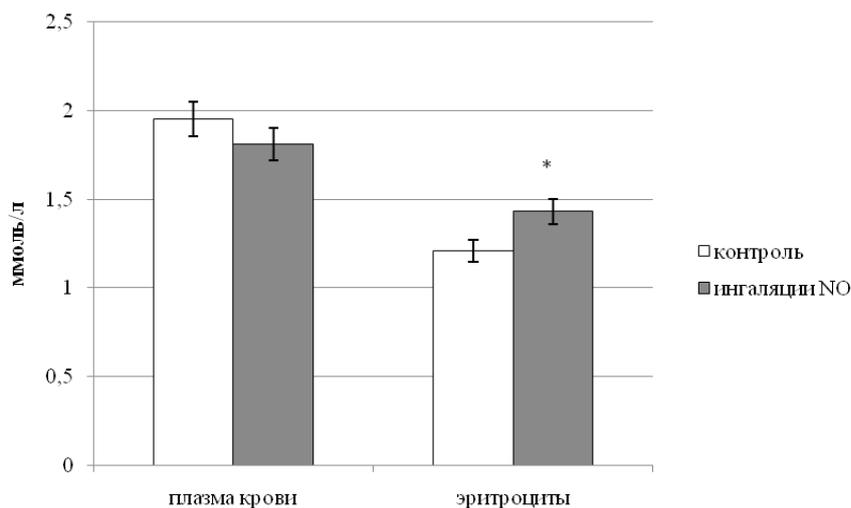


Рис. 2 – Концентрация лактата в эритроцитах и плазме крови крыс, получавших ингаляции оксидом азота («*» – уровень значимости различий по сравнению с уровнем, характерным для интактных животных $p < 0,05$)

ся прямой реакции фермента (+105% против +78% для обратной реакции в отношении интактных животных; $p < 0,05$). Это дает возможность положительно охарактеризовать действие ингаляционного введения низких доз оксида азота на изучаемый показатель энергетического метаболизма эритроцитов.

Оценка концентрации одного из субстратов рассматриваемого фермента – лактата, - позволила установить (рис. 2), что в

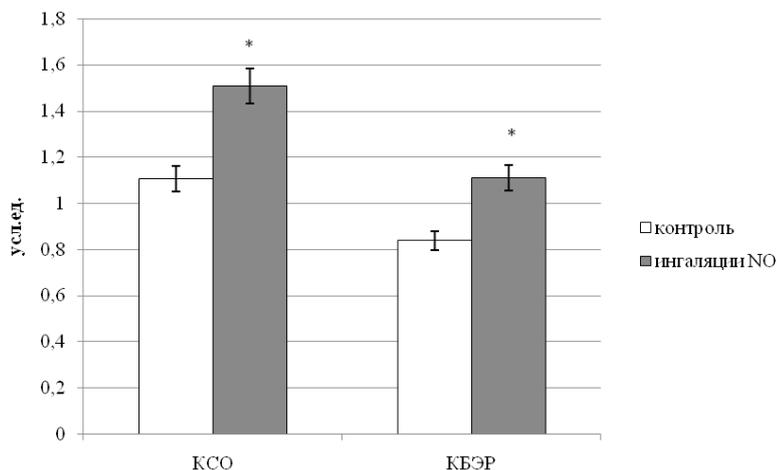


Рис. 3 – Производные коэффициенты энергетического метаболизма эритроцитов животных, получавших ингаляции оксида азота (КСО – коэффициент субстратного обеспечения, КБЭР – коэффициент баланса энергетических реакций; «*» – уровень значимости различий по сравнению с уровнем, характерным для интактных животных $p < 0,05$)

плазме крови крыс уровень данного метаболита по завершении курса воздействий незначительно снижается (на 7%; $p < 0,1$ по сравнению с интактными животными). В то же время в эритроцитах указанный параметр умеренно возрастает (на 18%, $p < 0,05$). Данная динамика, по нашему мнению, может быть обусловлена продемонстрированной выше активацией фермента, а также перераспределением между плазмой крови и внутриэритроцитарным пространством.

Комплексный анализ состояния изучаемого компонента энергетического обмена был выполнен путем расчета коэффициента субстратного обеспечения (КСО) и коэффициента баланса энергетических реакций (КБЭР). Выявлено, что по завершении 10-дневного курса ингаляций NO оба параметра существенно возрастают (рис. 3).

В частности, КБЭР, характеризующий только каталитическую активность ЛДГ, увеличивается на 32% относительно уровня интактных крыс ($p < 0,05$), а КСО, дополнительно учитывающий текущую концентрацию лактата, нарастает еще более значительно – на 36% ($p < 0,05$). Данная тенденция указывает на оптимизацию энергетического обмена в условиях курсового ингаляционного применения низких доз оксида азота.

Еще в 1989 г. В. Brune и E.G. Lapetina по-

казали, что монооксид азота (NO) оказывает влияние на процесс рибозилирования особого цитозольного белка с молекулярной массой 37 кДа [7], позднее идентифицированного как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ключевой фермент гликолиза [8]. Этот эффект был подтвержден J. Zhang и S.H. Snyder (1992) на культуре нейрональных клеток [9], а в дальнейшем – и в отношении других клеточных пулов и иных ферментов (в частности, фосфофруктокиназы клеток островковых клеток поджелудочной железы и нейронов) [10, 11]. Ряд работ посвящен 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 [12]. Хотя механизм данного влияния до сих пор слабо изучен, эти и другие данные позволяют постулировать значимость NO в регуляции энергетического метаболизма [6, 7-11]. Более того, имеют место противоречивые сведения о характере действия соединения на внутриклеточный транспорт глюкозы и энергетический обмен, в частности, на примере скелетной мышцы [9, 11]. Таким образом, данные литературы дают возможность заключить о наличии влияния оксида азота на энергетический метаболизм, однако его особенности пока остаются нераскрытыми.

Согласно полученным в данном исследовании результатам действие низких концентраций NO на энергетический обмен эритроцитов складывается из нескольких взаимосвязанных компонентов. Так, на функционирование ЛДГ ингаляции оксида азота оказывают общее стимулирующее влияние, активируя как прямую, так и обратную реакцию фермента. При этом более существенно нарастает активность энзима в прямой реакции, что можно рассматривать как позитивный метаболический эффект. В то же время динамика концентрации лактата неоднозначна – в плазме крови она

снижается, а во внутриэритроцитарном пространстве, напротив, увеличивается. Данные тенденции, с нашей точки зрения, обусловлены повышением утилизации соединения лактатдегидрогеназой в сочетании с его транспортом внутрь эритроцитов вследствие нарастания проницаемости их мембран. Кроме того, обнаруженные сдвиги четко согласуются с производными коэффициентами энергетического метаболизма (коэффициенты баланса энергетических реакций и субстратного обеспечения), существенно нарастающих по завершении воздействия (на 32 и 36% соответственно). Это указывает на NO-зависимую активацию рассматриваемого звена энергетического обмена эритроцитов при проведении ингаляций низкими концентрациями оксида азота.

Выводы

В целом, проведение 10-дневного курса ингаляций низких концентраций монооксида азота (20 ppm) повышает адаптивные резервы организма здоровых крыс, оказывая тренирующее действие на про- и антиоксидантные системы крови (интенсификация процессов липопероксидации на фоне превалирующей активации ферментного антиоксиданта - супероксиддисмутазы), а также активирует промежуточное звено энергетического метаболизма. Данные метаболические эффекты создают предпосылки для успешного применения ингаляций NO при коррекции патологических состояний, сопровождающихся гипоксией, окислительным стрессом и энергодефицитом.

Библиографический список

1. Ванин, А.Ф. Действие динитрозильного комплекса железа на метаболизм и клеточные мембраны ишемизированного сердца крысы / А.Ф. Ванин, О.И. Писаренко, И.М. Студнева с соавт. // Кардиология. – 2009. - №12. – С. 43-49. (непонятно слово с соавт., если авторов больше трех, то вначале автор не пишется)
2. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms / B. Kalyanaraman // Redox biology. – 2013. – №1. – P. 244-257.

3. Vanin, A.F. Dinitrosyl-iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology / A.F. Vanin // Nitric Oxide Biol. Chem. – 2009. – Vol. 21. – P. 136-149.

4. Оценка некоторых молекулярных эффектов газообразного оксида азота на кровь человека in vitro / А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.Г. Соловьева, А.Ф. Ванин // Биофизика. – 2013. – Том 58, №5. – С. 871-875.

5. Мартусевич, А.К. Влияние свободного и депонированного оксида азота на энергетический метаболизм крови / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин // Современные технологии в медицине. – 2013. – Том 5б, №4. – С. 33-38.

6. Мартусевич, А.К. Влияние NO-содержащего газового потока на некоторые параметры энергетического метаболизма эритроцитов / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Том 158, №7. – С. 40-42.

7. Brune, B. Activation of cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents / B. Brune, E.G. Lapetina // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol. 264. – P. 8455-8458.

8. Dimmler, S. Characterization of a nitric oxide-catalysed ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / S. Dimmler, B. Brune // Eur. J. Biochem. – 1992. – Vol. 210. – P. 305-310.

9. Zhang, S. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / S. Zhang, S.H. Shyder // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 9382-9385.

10. Mohr, S. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / S. Mohr, H. Hallak, A. de Boitte et al // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – P. 9427-9430.

11. Almeida, A. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway / A. Almeida, S. Moncada, J.P. Bolanos // Nat. Cell Biol. – 2004. – Vol. 6. – P. 45-51.

12. Manukhina, E.B. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia / E.B. Manukhina, H.F. Downey, R.T. Mallet // Exp. Biol. Med. – 2006. – Vol. 231. – P. 343-365.