

КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ЭКЗОГЕННЫМ ОКСИДОМ АЗОТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

¹Соловьева А.Г., ²Дударь А.И., ¹Диденко Н.В.

¹ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр»
Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: sannag5@mail.ru;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

Изучены особенности перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы в почках и легких крыс с комбинированной термической травмой (КТТ) под влиянием динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Wistar. КТТ (контактный ожог на площади 20% поверхности тела и термoinгаляционное воздействие) наносили под наркозом. Животным с ожогом ежедневно вводили внутривентриально 10%-ый раствор ДНКЖ. В гомогенатах органов определяли интенсивность перекисного окисления липидов и общую антиоксидантную активность, удельную активность каталазы, супероксиддисмутазы, концентрацию малонового диальдегида на 3 и 10 сутки после ожога. Показано, что введение крысам с комбинированной термической травмой ДНКЖ вызывает нормализующее влияние на процессы липопероксидации в легких. Выявлено уменьшение липопероксидации в почках при КТТ под влиянием ДНКЖ. Под воздействием депонированной формы NO наблюдалось повышение удельной активности супероксиддисмутазы и каталазы на 10 сутки после травмы в легких крыс. Таким образом, ДНКЖ обладают про- и антиоксидантными свойствами и могут быть использованы в коррекции нарушений окислительного метаболизма при КТТ.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), липопероксидация, термическая травма

THE CORRECTION OF METABOLIC DISORDERS BY EXOGENOUS NITRIC OXIDE IN EXPERIMENTAL OXIDATIVE STRESS

¹Soloveva A.G., ²Dudar A.I., ¹Didenko N.V.

¹Privolzhsky Federal Research Medical Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Nizhniy Novgorod, e-mail: sannag5@mail.ru;

²Nizhniy Novgorod Lobachevsky University, Nizhniy Novgorod

The peculiar properties of lipid peroxidation and antioxidant system in kidney and lung of rats with combined thermal trauma (CTT) were studied under the influence of dinitrosyl iron complexes (DNIC). The experiment was carried out on Wistar rats. CTT (contact burns on 20% of the body surface and termoinhalation impact) was applied under anesthesia. Animals with a burn daily received 10% solution of DNIC intraperitoneally. In homogenates of organs the intensity of lipid peroxidation and total antioxidant activity, the specific activity of catalase, superoxide dismutase, concentration of malonic dialdehyde were determined by at 3 and 10 days after burn. It was shown that administration to rats with combined thermal injury DNIC causes a normalizing influence on the processes of lipid peroxidation in the lungs. The decrease of lipid peroxidation in the kidney at CTT under the influence of DNIC was revealed. Under the influence of DNIC the increase in specific activity of superoxide dismutase and catalase for 10 days after injury in the lungs of rats was observed. Thus, DNIC have pro- and antioxidant properties and can be used in correction of disturbances of oxidative metabolism in CTT.

Keywords: dinitrosyl iron complexes (DNIC), lipid peroxidation, thermal trauma

Термические поражения занимают одно из центральных мест в общей структуре травматизма [3]. Активация свободно-радикальных процессов при ожогах приводит к развитию окислительного стресса, являющегося одним из универсальных механизмов повреждения тканей [6]. В связи с этим актуальным является исследование свободнорадикального окисления в различных органах и тканях при ожогах и поиск возможных путей их коррекции. Особый интерес вызывает использование оксид азота (NO) как универсального регулятора различных физиологических процессов в организме животных и челове-

ка [2]. Одним из перспективных источников NO, лишенных недостатков органических нитратов и потенциально приемлемых для биомедицинского применения, являются динитрозильные комплексы железа, в частности ДНКЖ, содержащие тиольные лиганды, например цистеин, глутатион [1]. ДНКЖ формируются в организме эндогенно, выступают в качестве регуляторов разнообразных физиологических процессов: подавляют тромбообразование, оказывают антиоксидантное действие, ускоряют заживление кожных ран, снижают некротическую зону при экспериментальном инфаркте миокарда и др. [10]. При этом

ДНКЖ малотоксичны, обладают пролонгированным действием [8]. Однако остается неясной реакция организма на экзогенное введение ДНКЖ при комбинированной термической травме (КТТ).

Целью работы явилось изучение влияния ДНКЖ на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние антиоксидантной системы в органах крыс с КТТ.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на белых крысах-самцах линии Wistar, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУ «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Москва). Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC. После 14-дневной адаптации к условиям местного вивария и карантина из 45 крыс массой 200–250 г. сформировали следующие группы: 1 – интактные здоровые животные (n = 15); 2 – контрольная (животные с КТТ, n = 15), которым ежедневно внутрибрюшинно вводили 1 мл физиологического раствора; 3 – животные с ожогом, ежедневно получавшие лечение в виде внутрибрюшинных инъекций 10%-ого раствора ДНКЖ (1 мл; 0,3 ммоль/л) (n = 15). ДНКЖ с глутатионом получали по методике Ванина А.Ф. [1]. Концентрацию ДНКЖ определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Power Wave XS (Bio-Tek, USA) в диапазоне длин волн 410–700 нм. КТТ (контактный ожог на площади 20% поверхности тела и термомингаляционное воздействие горячим воздухом и продуктами горения в течение 20–30 сек в условиях камеры ингаляции) наносили под наркозом (Золетил (60 мг/кг) + Ксила (6 мг/кг)). Животных выводили из эксперимента на 3 и 10 сутки после травмы путем декапитации с предварительной перерезкой сонной артерии под наркозом (Золетил + Ксила).

Для оценки ПОЛ использовали 10%-ый гомогенат тканей органов (легкие, почки) на основе среды, содержащей 0,25М раствор сахарозы, 1мМ раствор ЭДТА, 0,01М трис-НСl – буфер (рН = 7,5). Активность ПОЛ изучали с помощью метода индуцированной биохемиллюминесценции на биохемиллюминесцентре БХЛ-06 (Н.Новгород). Оценивались следующие параметры хемиллюминограммы: tg 2a – показатель, характеризующий скорость спада процессов свободно-радикального окисления в плазме и свидетельствующий об общей антиоксидантной активности (АОА); S – светосумма хемиллюминесценции за 30 сек. – отражает потенциальную способность биологического объекта к ПОЛ. Содержание промежуточного продукта ПОЛ, малонового диальдегида (МДА) определяли по методу М. Mihara, М. Uchiyama [9]. Для оценки активности каталазы [4] и супероксиддисмутазы (СОД) [5] использовали спектрофотометрические методы. Концентрацию белка вычисляли по методу Лоури в модификации [7].

Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0. Значимость различий между показателями определялась с помо-

щью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Наиболее частым компонентом, встречающимся при ожоговой болезни, является недостаточность органов дыхания [3]. Проведенные исследования показали, что на 3 сутки после КТТ в гомогенате легких светосумма хемиллюминесценции возросла на 68,5% ($p = 0,009$) по сравнению со здоровыми животными, на 10 сутки показатель S увеличился на 11,5% ($p = 0,021$) (рис. 1). Введение крысам с термической травмой ДНКЖ вызвало статистически значимое снижение процессов свободно-радикального окисления в легких на 45% ($p = 0,011$) на 3 сутки после травмы по сравнению с контролем, способствуя нормализации данного показателя. Отмечена тенденция к снижению ПОЛ под влиянием ДНКЖ в легких на 10 сутки после повреждения на 12% ($p = 0,064$) по сравнению с крысами контрольной группы (рис. 1).

Активация ПОЛ при КТТ сопровождалась незначительным увеличением МДА в легких на 3 сутки после травмы по сравнению с контрольной группой крыс (рис. 2). На 10 сутки после КТТ выявлено снижение данного показателя на 29,1% ($p = 0,007$) по сравнению со здоровыми крысами, что, вероятно, можно объяснить повышением активности ферментов, участвующих в утилизации высокотоксичных альдегидов.

На фоне воздействия ДНКЖ в легких обнаружено снижение МДА на 3 и 10 сутки после травмы на 36% ($p = 0,008$) и 28% ($p = 0,021$) соответственно по сравнению с контрольной группой крыс.

Известно, что при ожоге нарушается прооксидантно-антиоксидантное равновесие, в результате чего интенсифицируются свободно-радикальные реакции и развивается окислительный стресс. Это приводит к гиперпродукции активных форм кислорода, мишенью которых являются различные клетки и клеточные структуры [6]. Показано, что ДНКЖ оказывают нормализующее влияние на ПОЛ в легких при термической травме.

По данным индуцированной биохемиллюминесценции в легких не обнаружено статистически значимых различий в показателях АОА между крысами контрольной группы и здоровыми животными (рис. 3). Однако введение ДНКЖ на фоне КТТ вызвало повышение АОА на 3 сутки после поражения на 28% ($p = 0,076$) по сравнению с контролем.

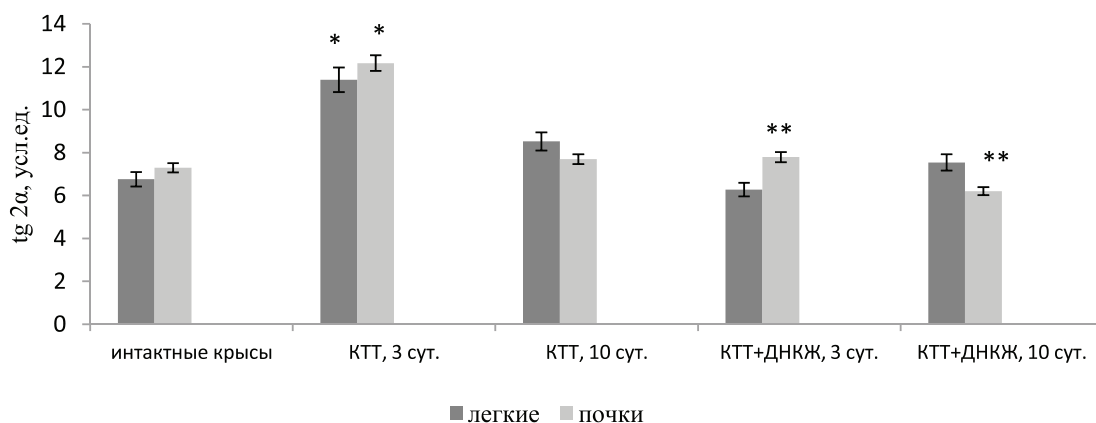


Рис. 1. Динамика изменения светосуммы гемилуминесценции в органах крыс при ожоге и на фоне введения динитрозильных комплексов железа. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

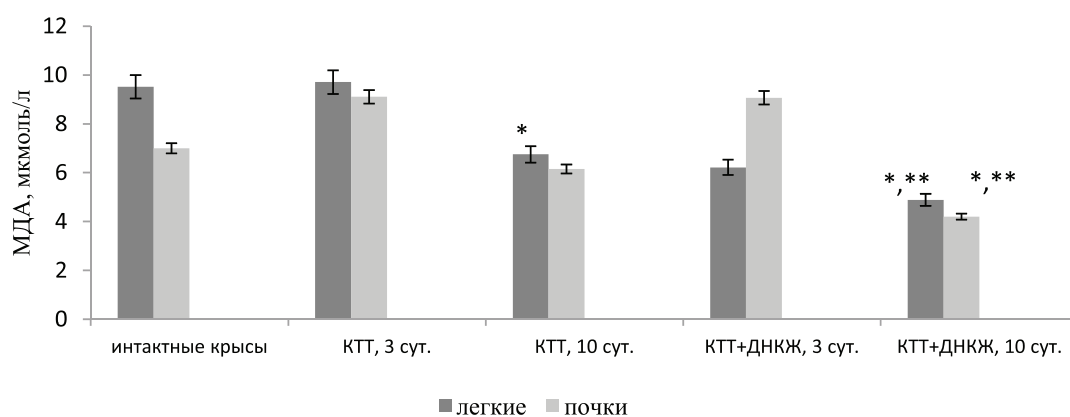


Рис. 2. Динамика изменения концентрации малонового диальдегида в органах крыс при ожоге и на фоне введения динитрозильных комплексов железа. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

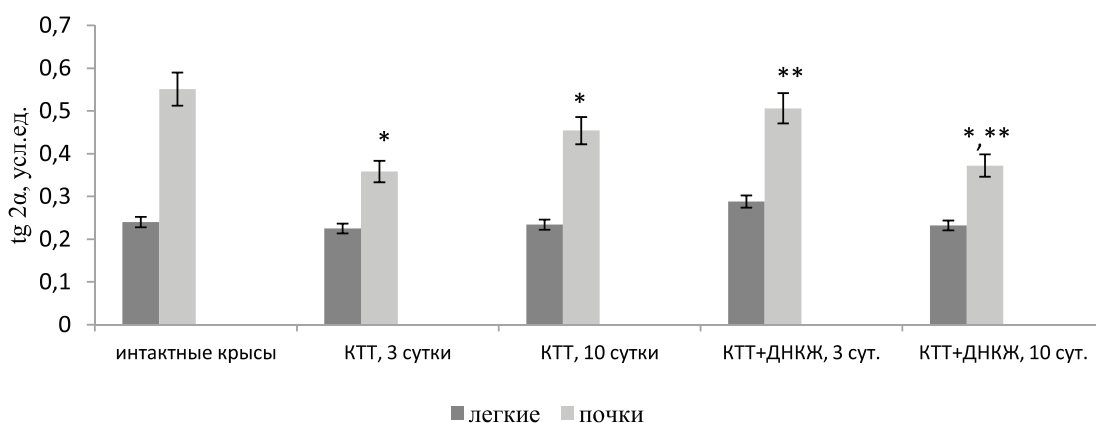


Рис. 3. Динамика изменения показателя tg2α в органах крыс при ожоге и на фоне введения динитрозильных комплексов железа. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Большое значение для поддержания в клетках прооксидантно-антиоксидантного баланса и внутриклеточного восстановительного потенциала имеют реакции, которые катализируют СОД, каталаза. В легких выявлено снижение удельной активности СОД в 1,2 раза ($p = 0,034$) на 3 сутки и в 1,8 раза ($p = 0,004$) на 10 сутки после КТТ по сравнению с показателем здоровых животных (табл.1). Активность каталазы в легких снизилась в 4,5 раза ($p = 0,001$) на 3 сутки и в 1,2 раза ($p = 0,009$) на 10 сутки после КТТ по сравнению с интактными крысами (табл. 2).

Полученные результаты показали, что при введении крысам с ожогом ДНКЖ активность СОД и каталазы в легких оставалась статистически значимо ниже показателей здоровых животных. Однако выявлено увеличение активности каталазы на 3 сутки после травмы при введении ДНКЖ в 2,8 раза ($p = 0,003$) по сравнению с контролем. Отмечена тенденция к повышению удельной активности СОД на 11 % ($p = 0,087$) на 10 сутки после КТТ в легких под влиянием ДНКЖ по сравнению с контрольной группой крыс, способствуя снижению высокореактивного супероксида, который влияет на образование S-нитрозогемоглобина и стимулирует высвобождение NO из S-нитрозоальбумина [8].

Ожоговая травма является тяжелой формой патологии, которая сопровождается формированием синдрома системного воспалительного ответа, пагубным образом влияющего на состояние внутренних органов и вносящего свой вклад в развитие полиорганной недостаточности [3]. Показано, что показатель светосуммы и уровень МДА

в почках увеличились на 3 сутки после ожога на 67 % ($p = 0,014$) и 21 % ($p = 0,034$) соответственно по сравнению с интактными крысами (рис. 1, 2).

ДНКЖ способствовали снижению процессов липопероксидации в почках на 3 сутки после КТТ по сравнению с контрольными животными на 34 % ($p = 0,027$) (рис. 1). Уровень МДА и ПОЛ уменьшились на 10 сутки после травмы под влиянием ДНКЖ на 33 % ($p = 0,021$) и 15 % ($p = 0,039$) соответственно по сравнению с контролем.

В динамике АОА в гомогенате почек крыс наблюдалось ее снижение: на 3 сутки после КТТ – на 35 % ($p = 0,021$), на 10 сутки – на 17,7 % ($p = 0,035$) относительно здоровых животных, что свидетельствует об угнетении антиоксидантной системы защиты (рис. 3). При введении ДНКЖ на 3 сутки происходило повышение АОА на 41,3 % ($p = 0,026$) относительно контроля, однако на 10 сутки исследуемый показатель оказался ниже показателя здоровых и контрольных крыс на 32,5 % ($p = 0,009$) и 18,1 % ($p = 0,021$) соответственно.

В результате проведенных исследований выявлено снижение активности каталазы в почках на 3 сутки в 3,6 раза ($p = 0,007$), на 10 сутки после травмы в 2,5 раза ($p = 0,009$) по сравнению со здоровыми животными. Введение ДНКЖ способствовало статистически значимому падению активности каталазы при КТТ и по сравнению с интактными животными, и по сравнению с контролем (табл. 2). При этом в почках не обнаружено статистически значимых изменений активности СОД при КТТ (табл. 1).

Таблица 1

Удельная активность супероксиддисмутазы (усл.ед./мг белка) в органах крыс с ожогом под влиянием динитрозильных комплексов железа

Органы	интактные крысы (n = 15)	КТТ, 3 сутки (n = 8)	КТТ, 10 сутки (n = 7)	КТТ + ДНКЖ, 3 сутки (n = 8)	КТТ + ДНКЖ, 10 сутки (n = 7)
Легкие	1586,70 ± 64,14	1324,59 ± 53,62*	897,01 ± 43,27*	599,53 ± 31,97 */**	998,23 ± 65,92*
Почки	652,9 ± 39,92	734,51 ± 37,27	697,49 ± 29,76	601,91 ± 26,81 **	583,64 ± 41,05

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 2

Удельная активность каталазы (усл.ед./мг белка) в органах крыс с ожогом под влиянием динитрозильных комплексов железа

Органы	интактные крысы (n = 15)	КТТ, 3 сутки (n = 8)	КТТ, 10 сутки (n = 7)	КТТ + ДНКЖ, 3 сутки (n = 8)	КТТ + ДНКЖ, 10 сутки (n = 7)
Легкие	27,60 ± 2,42	6,35 ± 0,51 *	22,56 ± 0,89 *	17,08 ± 1,20 */**	8,43 ± 0,27 */**
Почки	40,57 ± 6,21	11,18 ± 0,53 *	15,74 ± 1,07 *	9,34 ± 0,36 */**	8,19 ± 0,41 */**

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенные исследования показали, что термическая травма вызывает интенсификацию свободнорадикального окисления на фоне снижения антиоксидантных резервов в легких и почках. В почках и легких крыс с КТТ выявлено усиление ПОЛ, накопление МДА, на фоне угнетения антиоксидантной системы: отмечено уменьшение каталитических свойств каталазы, выявлено снижение удельной активности СОД на 10 сутки после травмы в легких. Установлено, что ДНКЖ оказывают нормализующее влияние на процессы липопероксидации в легких крыс при КТТ. Показано снижение ПОЛ в почках при КТТ под влиянием ДНКЖ. Под воздействием депонированной формы наблюдалось повышение удельной активности СОД и каталазы на 10 сутки после травмы в легких крыс. Поскольку ДНКЖ являются донорами оксида азота можно предположить, что NO действует в исследуемых органах как антиоксидант, перехватывая алкоксильные и алкилпероксильные радикалы, в результате чего обрываются цепные реакции ПОЛ [10]. Кроме того, одним из механизмов антиоксидантного действия NO, возможно, является связывание свободных ионов железа в составе нитрозильных комплексов. При этом ингибируются реакции свободнорадикального окисления, катализируемые редокс-активными ионами железа [8]. Оксид азота может защищать биологические молекулы от окислительной модификации, нитрозилируя и восстанавливая оксофер-

рилформы гемопротеидов, к которым относится каталаза.

Список литературы

1. Ванин А.Ф., Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Бородулин Р.Р., Бургова Е.Н. Моно- и биядерные динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами в различных биосистемах // *Биофизика*. 2015. Т. 60. № 4. С. 735–47.
2. Малахов В.А., Завгородняя А.Н., Лычко В.С., Джанелидзе Т.Т., Волох Ф.А. Проблема оксиду азоту в неврологии. Суми: Видавництво СумДПУ им. А.С.Макаренка, 2009. 242 с.
3. Островский Н.В., Бабкин В.Б., Белянина И.Б., Куспиц Е.В., Тараскин А.Ф., Шулаева Н.М. Неотложная помощь при термической травме. Саратов: Саратовский медицинский университет, 2006. 35 с.
4. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонорова Н.А. и др. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие. Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011. 61 с.
5. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // *Вопросы медицинской химии*. 1999. Т. 45. № 3. С. 109-16.
6. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы индукции свободнорадикального окисления в условиях патологии // *Современные проблемы науки и образования*. 2006. № 6. С. 21-26.
7. Dawson J.M., Heatlic P.L. Lowry method of protein quantification Evidence for Photosensitivity // *Analytical Biochemistry*. 1984. Vol. 2. № 140. P. 391–393.
8. Lewandowska H., Kalinowska M., Brzyska K., Wyjciuk K., Wyjciuk G., Kruszewski M. Nitrosyl iron complexes: synthesis, structure and biology // *Dalton Trans.* 2011. Vol. 40. № 33. P. 8273–8289.
9. Mihara M., Uchiyama M. *Biochemistry*. N.Y.: Medicine, 1980. 271 p.
10. Tsai M.L., Tsou C.C., Liaw W.F. Dinitrosyl iron complexes (DNICs): from biomimetic synthesis and spectroscopic characterization toward unveiling the biological and catalytic roles of DNICs // *Acc Chem. Res.* 2015. Vol. 4. № 48. P. 1184-1193.