

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС

А.К. Мартусевич<sup>1,2\*</sup>, Л.К. Ковалева<sup>2</sup>, А.А. Мартусевич<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ПФМИЦ Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> Кировская ГМА Минздрава, г. Киров, России

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия

**РЕЗЮМЕ.** Целью данной работы явилась оценка влияния инъекций различных концентраций динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) на собственную кристаллизацию сыворотки крови крыс. Эксперимент выполнен на 60 половозрелых крысах-самцах линии Вистар, разделенных на шесть равных по численности групп. Первая группа животных была интактной (без 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 (концентрация агента – 0,15; 0,30; 0,45 и 0,60 мМ соответственно). Изучение влияния ДНКЖ на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс сформированных групп выполнено по методу тезиокристаллоскопии с использованием специальной системы полуколичественных критериев. Установлено активирующее действие инъекций глутатионсодержащих ДНКЖ на кристаллогенный потенциал сыворотки крови здоровых крыс, которое проявилось в увеличении плотности кристаллических элементов и их усложнении, причем максимальная выраженность данной тенденции соответствовала концентрациям 0,3 и 0,45 мМ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** оксид азота, динитрозильные комплексы железа, кристаллизация, сыворотка крови.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что способность биологического субстрата к дегидратационной структуризации – одна из интегральных характеристик его компонентного состава и физико-химических свойств (Денисов, 2004; Кидалов и др., 2004; Громова, 2005; Мартусевич, Перетягин, 2013). При этом кристаллоскопическое исследование информативно для физиологических и патологических состояний как в отношении организма человека (Шабалин, Шатохина, 2001; Денисов, 2004; Кидалов и др., 2004; Савина и др., 2006), так и животных (Громова, 2005). Следовательно, изучение кристаллогенных свойств биологических жидкостей может отображать и влияние оксида азота и его производных на биосистемы *in vitro* и *in vivo* (Тимошин и др., 2009; Hall, Garthwaite, 2009; Титов и др., 2012; Мартусевич, Перетягин,

2013), однако подобные данные в литературе, отсутствуют. Нашим исследовательским коллективом впервые было показано, что обработка газобразным NO в высокой концентрации негативно трансформирует результат кристаллизации образцов сыворотки крови человека преимущественно за счет стимуляции нитрозилирования белковых макромолекул (Мартусевич, Перетягин, 2013), тогда как в экспериментах *in vivo* подобные эффекты ранее не изучались.

**Ц е л ь р а б о т ы** – оценка влияния инъекций различных концентраций ДНКЖ на собственную кристаллизацию сыворотки крови крыс.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 60 половозрелых крысах-самцах линии Вистар, разделенных на

\* Адрес для переписки:

Мартусевич Андрей Кимович  
E-mail: cryst-mart@yandex.ru

шесть равных по численности групп. Первая группа животных была интактной (без каких-либо манипуляций). Крысам, включенным в остальные группы, в течение 10 дней ежедневно осуществляли внутривентральное 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 (концентрация агента – 0,15; 0,30; 0,45 и 0,60 мМ соответственно (Мартусевич и др., 2014)). У животных всех групп проводили получение образцов крови, причем у крыс первой (интактной) группы – однократно, а у представителей остальных групп – двукратно (до и сразу по завершении курса воздействий).

Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ) синтезировали по методике А.Ф. Ванина (2009, 2011). Концентрация соединения в физиологическом растворе, определяемая спектрофотометрически по известной экстинкции при длинах волны 310 и 360 нм, составляла 3,1 ммоль/л.

Изучение влияния ДНКЖ на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс сформированных групп было выполнено по методу тезиокристаллоскопии с использованием специальной системы полуколичественных критериев (Мартусевич, Перетягин, 2013). Основными показателями, оцениваемыми в балльной шкале, служили кристаллизуемость – отражает плотность кристаллических элементов в фации, индекс структурности – характеризует сложность структуропостроения), степень деструкции фации – представляет собой индикатор правильности образования структур, а также выраженность краевой зоны микропрепарата.

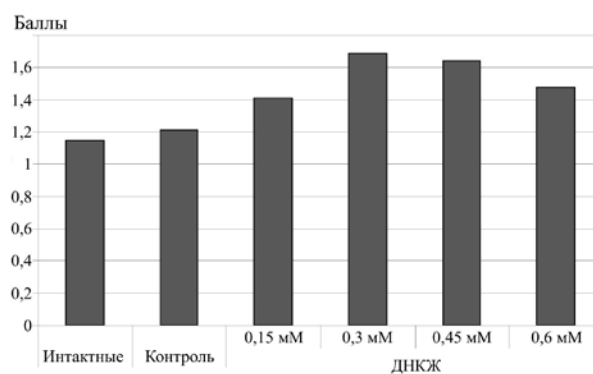
Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете Statistica 6.1 for Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

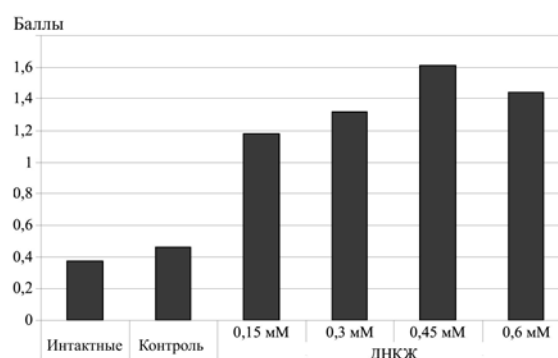
Установлено, что введение животным физиологического раствора, не содержащего естественного донора оксида азота, не оказывало значимого воздействия на параметры собственной кристаллизации биологической жидкости (рис. 1–4). В то же время применение растворов ДНКЖ модифицировало уровень этих показателей. В частности, минимальная из использованных доз соединения (0,15 мМ) умеренно, но значимо повышала индекс структурности фаций сыворотки крови по сравнению с интактными животными ( $p < 0,05$ ). Этот параметр отражает сложность структуропостроения элементов фации, а диапазон от 1 до 2 усл. ед. характеризуется

присутствием в микропрепарате как одиночно-кристаллических, так и дендритных элементов, причем увеличение значения показателя свидетельствует о повышении доли последних в кристаллограмме.

Максимальное нарастание индекса структурности определялось при введении крысам физиологического раствора, включающего 0,3 мМ ДНКЖ (рис. 1). В этом случае уровень параметра превышал физиологические значения в 1,47 раза ( $p < 0,05$ ), а значение показателя, достигнутое при концентрации агента 0,15 мМ – в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Интересно, что дальнейшее увеличение концентрации соединения приводило к менее выраженному повышению индекса структурности. Следует отметить, что при концентрации ДНКЖ 0,6 мМ данный показатель, с одной стороны, был на 28,7% выше уровня, характерного для интактных крыс ( $p < 0,05$ ), с другой стороны – на 14,2% ниже цифр, выявленных для 0,3 мМ соединения ( $p < 0,05$ ). Таким образом, стимулирующее действие изучаемого вещества на индекс структурности также параболически дозозависимо.

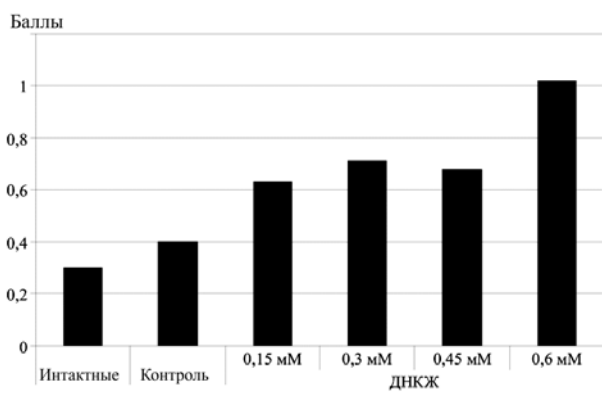


**Рис. 1.** Влияние инъекций динитрозильных комплексов железа на индекс структурности фаций сыворотки крови крыс

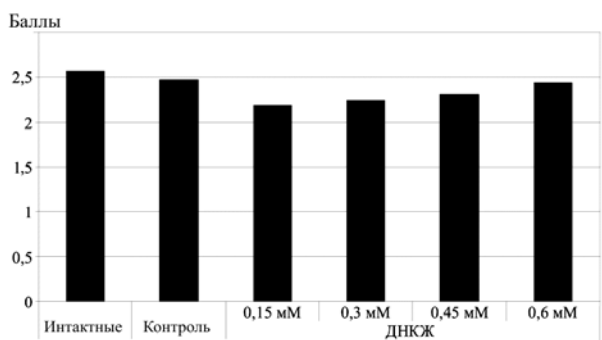


**Рис. 2.** Влияние инъекций динитрозильных комплексов железа на кристаллизуемость фаций сыворотки крови крыс

Сходная динамика изменения была зафиксирована и в отношении кристаллизующести фаций сыворотки крови – основного количественного критерия оценки собственной кристаллизации последней (рис. 2). В этом плане значимо, что сдвиги индекса структурности и кристаллизующести, выражающиеся в повышении обоих параметров при внутривенном введении животным ДНКЖ, однонаправлены и указывают на активацию кристаллогенных свойств биологической жидкости. В то же время, если максимальный градиент индекса структурности отмечен при использовании ДНКЖ в концентрации 0,3 мМ, то наиболее выраженное увеличение кристаллизующести было зарегистрировано при введении 0,45 мМ ДНКЖ (+335% по сравнению с интактными животными;  $p < 0,05$ ). Заметим, что и при применении иных концентраций агента сдвиги параметра существенны и составляют более 3,2 раза ( $p < 0,05$  для всех рассмотренных воздействий).



**Рис. 3.** Влияние инъекций динитрозильных комплексов железа на степень деструкции фаций сыворотки крови крыс



**Рис. 4.** Влияние инъекций динитрозильных комплексов железа на выраженность краевой зоны в фациях сыворотки крови крыс

Единственной монотонной зависимостью для изученных концентраций физиологического донора оксида азота является его влияние на степень деструкции кристаллоскопических фаций (рис. 3). Установлено, что данный показатель умеренно нарастает с увеличением действующей дозы ДНКЖ, однако остается в пределах 0,7 усл. ед. при всех концентрациях, кроме 0,6 мМ. Подобный уровень параметра свидетельствует о слабой выраженности деструктивных процессов при формировании кристаллических элементов фации, косвенно указывая на отсутствие значимого токсического эффекта соединения (Жидалов и др, 2004; Громова, 2005; Мартусевич, Перетягин, 2013). Умеренное разрушение структур образца отмечается лишь при введении крысам наиболее высокой из примененных концентраций вещества (0,6 мМ).

Однотипность выявлена авторами и для выраженности краевой белковой зоны микропрепарата при действии различных концентраций ДНКЖ (рис. 4).

Так, при всех используемых дозах соединения регистрировали умеренное снижение значения данного показателя, выраженность которого постепенно уменьшалась по мере нарастания концентрации вводимого агента. При этом лишь при применении 0,6 мМ раствора ДНКЖ отличия от животных интактной и контрольной групп не имели статистической значимости.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом установлено активирующее действие инъекций глутатионсодержащих ДНКЖ на кристаллогенный потенциал сыворотки крови здоровых крыс. Оно проявилось в увеличении плотности кристаллических элементов и их усложнении, причем как и для метаболических показателей максимальная выраженность данной тенденции соответствовала концентрациям 0,3 и 0,45 мМ.

*Исследование поддержано грантом Президента РФ для молодых ученых-докторов наук (грант МД-7256.2015.7).*

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Громова И.П. Кристаллоскопический способ изучения сыворотки крови в токсиколого-гигиеническом эксперименте методом «открытая капля». Гигиена и санитария. 2005. № 2. С. 66–69.

(Gromova I.P. Crystalloscopic technology of blood serum study in toxicological and hygienic experiment with «open drop» method. Hygiene and sanitary. 2005, 2: 66–69 [in Russ.].)

Денисов А.Б. Алгоритм оценки кристаллических фигур, полученных при высушивании смешанной слюны. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 136. № 7. С. 37–40.

(Denisov A.B. Algorithm of study crystalloscopic figures formed at dehydration of mixed saliva. Bulletin of experimental biology and medicine. 2004, 136(7): 37–40 [in Russ.]).

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.

(Kidalov V.N., Khadartsev A.A. Yakushina G.N. Teziographic studies of the blood and its practice possibilities. Journal of new medical technologies. 2004, 11(1–2): 23–25 [in Russ.]).

Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Модификация дегидратационной структуризации сыворотки крови при ее обработке оксидом азота. Биофизика. 2013. Т. 58. № 6. С. 1038–1042.

(Martusevich A.K., Peretyagin S.P. Modification of dehydration structurization of blood serum under its processing with nitric oxide. Biophysics. 2013, 58(6): 1038–1042 [in Russ.]).

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. С. 1173–1179.

(Martusevich A.K., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Davyduk A.V. The influence of dinitrosyl iron complexes on metabolic parameters of the blood in animals with experimental thermal trauma. Biophysics. 2014, 59(6): 1173–1179 [in Russ.]).

Савина Л.В., Клименко Е.Ф., Яковенко М.С. и др. Метаболические структуры сыворотки крови – маркеры острого панкреатита. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2006. № 3. С. 62–67.

(Savina L.V., Klimenko E.F., Yakovenko M.S. et al. Metabolic structures of blood serum as a marker of acute pancreatitis. Experimental and clinical gastroenterology. 2006, 3: 62–67 [in Russ.]).

Тимошин А.А., Губкина С.А., Орлова Ц.Р., Рууге Э.К., Ванин А.Ф., Чазов Е.И. Оценка уровня оксида азота в тка-

нях органов крыс и его изменение при длительной ингаляции воздуха с повышенным содержанием оксида азота. Доклады РАН. 2009. Т. 425. № 5. С. 110–113.

(Timoshin A.A., Gubkina S.A., Orlova C.R., Ruuge E.K., Vanin A.F., Chazov E.I. estimation of nitric oxide level in the tissues of rats organs and its changes under prolonged inhalations of the air with elevated concentration of nitric oxide. Proceeding of Russian Academy of Sciences. 2009, 425(5): 110–113 [in Russ.]).

Титов В.Ю., Иванова А.В., Петров В.А., Сerezhenkov В.А., Микоян В.Д., Ванин А.Ф., Осипов А.Н. Может ли суммарное содержание нитрита и нитрата служить показателем интенсивности синтеза оксида азота (NO) в тканях организма? Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 153. № 6. С. 816–819.

(Titov V.Yu., Ivanova A.V., Petrov V.A., Serezhenkov V.A., Mikoyan V.D., Vanin A.F., Osipov A.N. Could a summary concentration of nitrite and nitrate be a indicator of intensity of nitric oxide (NO) synthesis in organism tissues?. Bulletin of experimental biology and medicine. 2012, 153(6): 816–819 [in Russ.]).

Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М.: Хризопраз. 2001. 304 с.

(Shabalin V.N., Shatokhina S.N. Morphology of human biological fluids. Moscow: Chrizopraz. 2001. 304 p. [in Russ.]).

Hall C.N., Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo? Nitric Oxide Biol. Chem. 2009, 12(2): 92–103.

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

Vanin A.F., Chazov E.I. Prospects of designing medicines with diverse therapeutic activity on the basis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands. Biophysics. 2011, 56(2): 268–275.

## STUDY OF THE INFLUENCE OF DINITROSYL IRON COMPLEXES ON SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF RATS' BLOOD SERUM

*A.K. Martusevich<sup>1,2</sup>, L.K. Kovaleva<sup>2</sup>, A.A. Martusevich<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Privolzhsky Federal Medical research Centre, Verhnevolzhskaya emb., 18/1, Nizhny Novgorod 603159, Russia

<sup>2</sup> Kirov State Medical University, Karl Marx st., 112, Kirov 610027, Russia

<sup>3</sup> National Research Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky, Gagarin av., 23, Nizhny Novgorod 603950, Russia

**ABSTRACT.** The aim of this work was estimation of dinitrosyl iron complexes (DNIC) influence on own crystallization of blood serum of the rats. Our experiment was carried out on 60 male Wistar rats, divided into 6 equal groups. First group was intact (without any manipulations). Rats of other groups got a course of intraperitoneal administration of 1 ml. of saline during 10 days. For rats of third to sixth groups saline additionally contained the dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands (concentration – 0,15; 0,30; 0,45 and 0,60 mM, respectively). Crystallogenic properties of rats' blood serum were tested by classic crystalloscopy method with calculation of special semiquantitative criteria. They included crystallizability, structure index, facia destruction degree and clarity of marginal zone and were estimated in four-point scale. It was stated that glutathione-containing DNIC has a proactivating effect on crystallogenic potential of blood serum of healthy rats. This tendency realized in elevation of crystals density to control and intact groups. We also observed the appearance of numerous dendrite elements in facias of blood serum in rats injected with DNIC solution. Facia destruction degree in biological fluid specimens was elevated moderately in rats of main groups. Clarity of marginal zone is indicating the state of blood serum proteome was registered in constant level. Maximal changes of all parameters was fixed at the use of 0,3 and 0,45 mM of DNIC.

**KEYWORDS:** nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, crystallization, blood serum.