

ОКСИД АЗОТА В МОДУЛЯЦИИ КРИСТАЛЛОГЕННЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

© 2016 г. А.К. Маргусевич* **, Л.К. Ковалева***, А.В. Давыдюк**

*Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр МЗ РФ,
603155, Нижний Новгород, Верхне-Волжская набережная, 18;

**Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия,
603107, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 97;

***Кировская государственная медицинская академия Минздрава России, 610027, Киров, ул. К. Маркса, 112

E-mail: cryst-mart@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.07.15 г.

Проведен сравнительный анализ влияния различных форм оксида азота на характер дегидратационной структуризации образцов сыворотки крови человека. У 15 практически здоровых доноров изучено влияние на образцы крови газового потока от аппарата «Плазон», содержащего NO (800 и 80 ppm), экспериментального генератора NO (20, 50, 75 и 100 ppm), а также глутатионсодержащих динитрозильных комплексов железа (3 мМ/л). Проводили оценку влияния собственного натрия на кристаллообразование сыворотки интактной и обработанной NO крови. Установлено, что результат влияния монооксида азота на кристаллогенные свойства сыворотки крови непосредственно определяется концентрацией NO и его формой (свободной или депонированной), а также наличием примесей активных форм кислорода. При этом наиболее выраженный стимулирующий эффект выявлен для депонированной формы оксида азота – динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами. Низкие концентрации монооксида азота оказывают модулирующее действие на кристаллогенные свойства сыворотки крови человека, причем наиболее оптимальным стимулирующим эффектом обладает газовый поток с концентрацией оксида азота 20 ppm. Напротив, высокие концентрации NO (800 ppm) способствуют ингибированию кристаллогенной активности биосреды, многократно повышая степень деструкции структурных элементов и приводя к формированию дополнительной полосы в краевой зоне микропрепарата.

Ключевые слова: оксид азота, динитрозильные комплексы железа, кровь, кристаллогенные свойства, биокристалломик.

В настоящее время убедительно показано, что монооксид азота (NO) – один из основных мессенджеров межклеточной сигнализации – способен оказывать многочисленные биологические эффекты [1–4]. Однако до сих пор существует определенный «разрыв» между данными о клинической значимости изменений уровня рассматриваемого метаболита в биосредах и результатами модельных экспериментов по оценке его физико-химических свойств. Это связано с малочисленностью исследований, посвященных действию NO на организм здоровых и имеющих различную патологию животных [5,6], а также на биосистемы, в том числе культуры клеток, изолированные биологические жидкости и др. [7,8].

С учетом того, что влияние оксида азота на биообъекты носит ярко выраженный дозо-

зависимый характер [1,4,7,9], а также определяется формой доставки соединения в биосистему (в свободном или депонированном виде [8,10]), роль данных факторов должна быть уточнена при изучении его биологических эффектов.

В связи с вышеуказанным, нами начата систематическая работа по сравнительной оценке метаболических эффектов монооксида азота в свободном и депонированном виде. В том числе проведен анализ влияния NO на окислительный и энергетический метаболизм [8,11] и состояние некоторых детоксикационных ферментов крови [11]. Опубликованы также результаты исследований действия высоких доз свободного NO (газовый поток с концентрацией соединения 800 ppm) на кристаллогенные свойства сыворотки крови [12]. В них продемонстрировано, что указанное воздействие вызывает достаточно специфическую модификацию дегидратацион-

Сокращение: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа.

ной структуризации биологической жидкости с формированием одной или нескольких дополнительных полос в краевой зоне микропрепарата. Данный феномен может быть объяснен образованием в плазме крови значимой фракции нитрозилированных белков, о чем свидетельствует повышение в ней концентрации 3-нитротирозина [12], известного маркера нитрозативного стресса [13].

С другой стороны, как в отечественной, так и в зарубежной литературе отсутствуют сведения о характере действия низких доз оксида азота, обладающих, согласно нашим предшествующим изысканиям [10], более благоприятным влиянием на метаболизм крови. В связи с этим целью данной работы явился сравнительный анализ влияния различных форм NO на характер дегидратационной структуризации образцов сыворотки крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили образцы крови 15-ти практически здоровых людей-доноров. Был изучен характер реакции цельной консервированной крови на воздействие свободного и депонированного оксида азота. Для проведения эксперимента кровь разделяли на восемь порций (интактную, на которую не оказывали воздействий, и семь опытных, подвергшихся обработке). Объем каждой порции составлял 5 мл.

Производили прямой барботаж шести опытных образцов крови газообразным оксидом азота, генерированным аппаратом «Плазон» при стандартной мощности (концентрация NO – 800 ppm) и десятикратно разведенным потоком от данного прибора (80 ppm), а также экспериментальным аппаратом (NO-генератор) для синтеза оксида азота, созданным в РФЯЦ [8] (при концентрациях 20, 50, 75 и 100 ppm). Время барботирования – 3 мин, экспозиция после воздействия – 5 мин.

В седьмой опытный образец крови добавляли 0,1 мл свежеполученного водного раствора динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) (концентрация соединения, определенная спектрофотометрически по известным экстинкциям при длинах волны 310 и 360 нм, – 3 мМ/л). Синтез ДНКЖ производили по методике А.Ф. Ванина (2009) [14]. Экспозиция после введения соединения также составляла 5 мин.

По завершении экспозиции производили центрифугирование всех образцов при 1500 об/мин в течение 15 мин. Полученную сыворотку крови в объеме 100 мкл наносили на

предметное стекло и приготавливали микропрепараты высушенной биологической жидкости в соответствии с методом кристаллоскопии, позволяющим оценивать собственную кристаллогенную активность биосреды [15]. Высушенные микропрепараты оценивали морфологически (путем описания особенностей структуризации высушенного образца биологической жидкости) и визуаметрически (с применением собственной системы параметров) [15]. Основными визуаметрическими показателями, оцениваемыми в балльной шкале, служили кристаллизуемость (отражает количественную сторону кристаллизации – плотность кристаллических элементов в фации), индекс структурности (характеризует сложность структуропостроения), степень деструкции фации (представляет собой индикатор качественной стороны процесса – правильности образования структур) и выраженность краевой зоны микропрепарата.

Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете Statistica 6.1 for Windows. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли *H*-критерий Краскала–Уоллеса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологически для контрольного (без каких-либо воздействий) микропрепарата высушенной биологической жидкости был характерен типичный физиологический рисунок фации с умеренными признаками кристаллизации в центральной зоне и многочисленными регулярными аркообразными разломами в краевой зоне (рис. 1а). В то же время некоторые признаки белкового дисбаланса имели место и в этом случае. В частности, обнаруживалась относительно малая ширина краевой зоны, формируемой белковым компонентом биологической жидкости, причем в этой части препарата присутствовали неоднородности текстуры.

Наиболее низкая из использованных концентраций газообразного оксида азота (20 ppm) способствовала умеренной оптимизации кристаллоскопической картины биосубстрата (рис. 1б). Это проявлялось в формировании регулярных центростремительных разломов, имеющих сопоставимую глубину и длину. Кроме того, следует обратить особое внимание на существенное расширение радиуса краевой зоны в целом. С учетом того, что именно в данной части образца могут происходить наиболее значимые преобразования [16,17], связан-

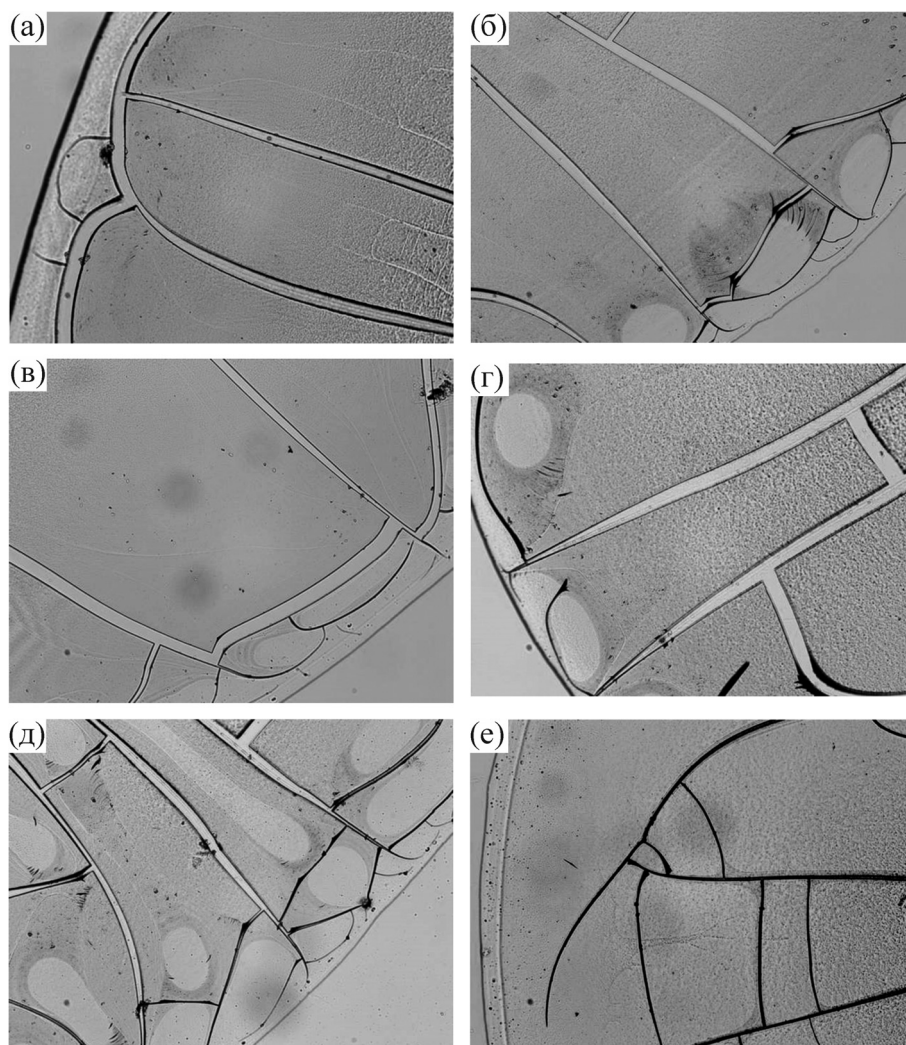


Рис. 1. Картины кристаллизации образцов сыворотки крови при ее обработке различными дозами газообразного оксида азота. (а) – Контрольный образец. Обработка крови газообразным NO в концентрации: (б) – 20 ppm, (в) – 50 ppm, (г) – 75 ppm, (д) – 100 ppm, (е) – 800 ppm.

ные с возможностью нитрозилирования белков под воздействием свободного оксида азота [12,13], подобные сдвиги нужно однозначно трактовать как позитивные.

Нарастание действующей концентрации оксида азота до 50 ppm обуславливает дальнейшую трансформацию результата дегидратационной структуризации сыворотки крови (рис. 1в). В этих образцах наблюдали умеренное обеднение кристаллического компонента фации с одновременным сужением краевой зоны микропрепарата, сопоставимым с выявленным в контрольном образце высушенной биологической жидкости.

Более высокие концентрации NO (75 и 100 ppm), хотя и способствовали оптимизации сети разломов картины (в случае воздействия 100 ppm оксида азота – с формированием ду-

гообразных разломов), стимулировали непосредственное кристаллообразование в центральной и промежуточной зонах фации, а также обеспечивали относительную неоднородность текстуры образца. Следует подчеркнуть умеренную тенденцию к хаотизации «дополнительных» разломов краевой зоны микропрепарата, соединяющих основные между собой. В то же время формирование выраженной полосы, характерной для действия высоких концентраций изучаемого соединения (800 ppm) [12], не происходит при действии ни одной из использованных в данном исследовании концентраций оксида азота. Это служит косвенным отражением отсутствия нитрозилирующего эффекта в отношении белковых компонентов плазмы крови и, следовательно, возникновения нитрозилирующего стресса [13].

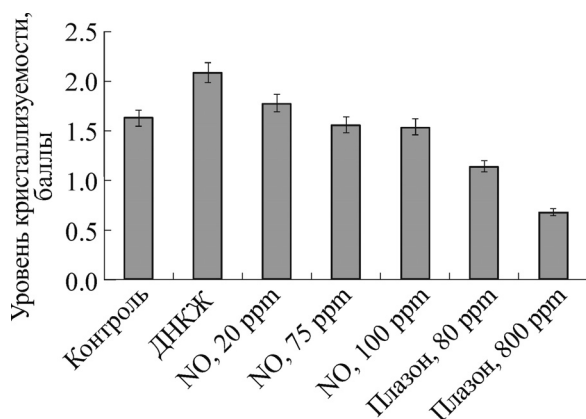


Рис. 2. Уровень кристаллизуемости образцов сыворотки крови при обработке различными формами оксида азота (ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами).

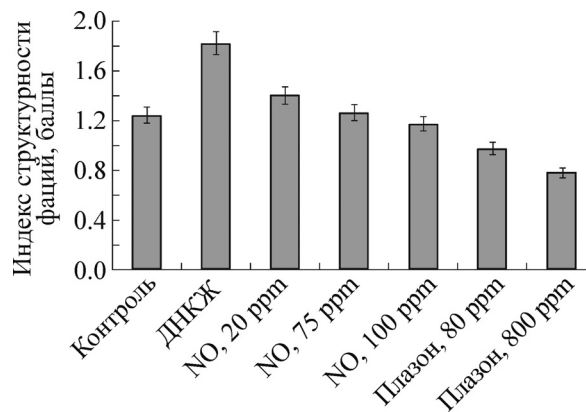


Рис. 3. Индекс структурности кристаллоскопических фаций сыворотки крови при обработке различными формами оксида азота (ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами).

Морфологическое описание особенностей структуризации сыворотки крови позволило установить, что обработка крови высокими дозами NO (800 ppm) приводит к образованию в краевой зоне микропрепарата рельефной полосы, отчетливо выступающей над поверхностью образца (рис. 1е). Данная полоса обнаруживается как при собственной кристаллизации биожидкости, так и при сокристаллизации с изотоническим базисным веществом – 0,9% раствором хлорида натрия. Происхождение данной полосы рассматривается нами на основании общих представлений о физико-химической природе процессов, происходящих в высыхающей капле [15,18–20]. Согласно сформировавшемуся в литературе мнению, краевая зона является местом сосредоточения белковых макромолекул, входящих в состав дегидратируемой биосреды [15–20]. В условиях обработки цельной крови NO в газовой фазе, учитывая его концентрацию (800 мкг/л), может происходить нитрозилирование белков [12].

Наиболее выраженной прокристаллогенной активностью обладает водный раствор ДНКЖ, при введении которого в биологическую жидкость наблюдали как стимуляцию образования одиночно-кристаллических и дендритных структур в целом, так и их усложнение. Следует отметить, что в этом случае большинство элементов имеют правильную конфигурацию.

В целом на основании морфологической оценки кристаллограмм установлено, что ДНКЖ способствуют максимальному повышению кристаллогенной активности сыворотки крови, а газообразный оксид азота обладает стимулирующим действием на нее, обратно пропорциональным примененной концентрации соединения. Особо среди последней группы воз-

действий следует выделить газовый поток от аппарата «Плазон», трансформирующий кристаллоскопическую картину биологической жидкости не только количественно, но и качественно (с выраженным нарастанием деструктивных изменений элементов образца).

Выявленные с помощью визуального анализа микропрепаратов сыворотки крови тенденции, характеризующие дозозависимость его действия, были подтверждены результатами анализа кристаллогенных свойств сыворотки крови с использованием полуколичественных параметров (рис. 2 и 3). Так, при обработке образцов биологической жидкости газовым потоком от аппарата «Плазон» имеет место отчетливое ингибирование собственной кристаллизации биосреды, что проявляется в значимом снижении как кристаллизуемости, так индекса структурности кристаллограмм ($p < 0,05$ для обоих случаев). Это косвенно подтверждает ранее показанные нами негативные эффекты данного газового потока [8,11]. Десятикратное разведение последнего воздухом снижает выраженность указанного эффекта, однако оба показателя не достигают уровня контрольного образца ($p < 0,05$). Напротив, при воздействии газового потока от другого генератора, содержащего аналогичное количество оксида азота (75 против 80 ppm) без примеси активных форм кислорода, прежде всего – озона, результат кристаллизации практически не отличается от фаций интактной биологической жидкости. Это позволяет предположить, что ингибирование структуризации, наблюдаемое при обработке крови потоком от «Плазона», определяется не только концентрацией NO, но и образованием пероксинитрита, оказывающего негативное

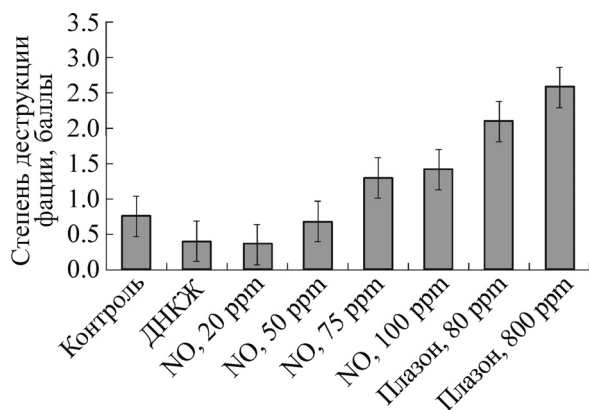


Рис. 4. Степень деструкции элементов высушенных образцов сыворотки крови при ее обработке различными дозами газообразного оксида азота.

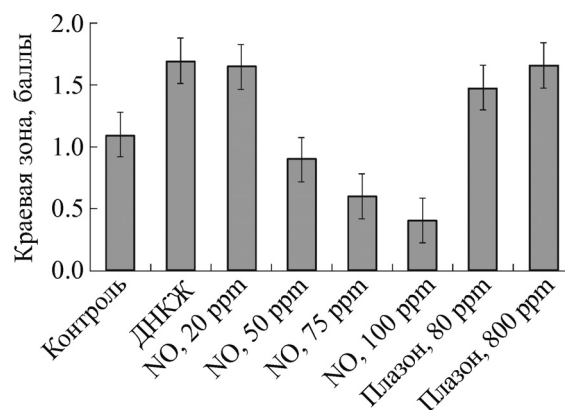


Рис. 5. Выраженность краевой зоны образцов сыворотки крови при ее обработке различными дозами газообразного оксида азота.

влияние на конформацию и структуру макромолекул плазмы крови.

С учетом приведенных выше данных интересным представляется стимулирующее действие низких концентраций оксида азота (20 ppm) без примесей активных форм кислорода на кристаллизацию сыворотки крови, что четко просматривается как морфологически, так на основании оценки визуаметрических параметров, в частности кристаллизуемости и индекса структурности (рис. 2 и 3). В большей степени усиливает кристаллогенную активность биосреды введение водного раствора ДНКЖ. По-видимому, подобный эффект обусловлен присутствием в составе комплекса атомов железа, высвобождаемых при частичном его разрушении, имеющем место при попадании в образцы крови [14,21]. Этот тезис косвенно подтверждается тем, что сульфат железа (II) применяется многими исследователями в качестве базисного соединения для выполнения тизиграфического теста именно вследствие его способности к комплексообразованию [16,17,22]. Кроме того, полученный эффект может быть связан с частичным высвобождением из комплекса небольших количеств NO и NO⁺ [23], имитирующих действие низких концентраций свободного экзогенного оксида азота на кристаллогенную активность биологической системы. Следует подчеркнуть, что ион нитрозония (NO⁺) дополнительно обладает способностью к нитрозилованию белковых макромолекул плазмы крови [23,24], что также оказывает модулирующее влияние на кристаллогенез последней.

Установлено, что минимальная среди использованных концентраций оксида азота (20 ppm) снижает выраженность деструктивных

изменений кристаллов с $0,76 \pm 0,15$ балла до $0,36 \pm 0,14$ балла ($p < 0,01$; рис. 4). Повышение концентрации приводит к дозозависимому нарастанию параметра, практически выходящему на плато при воздействии на образцы цельной крови 75 ppm NO. Следует подчеркнуть, что даже наиболее высокая концентрация оксида азота (100 ppm) не вызывает значительного увеличения значения степени деструкции фазии, остающейся в пределах 1,5 баллов.

Анализ сформированности краевой зоны микропрепарата высушенной биологической жидкости при действии различных концентраций оксида азота также продемонстрировал двухфазную зависимость (рис. 5). Так, выявленные на основании морфологической оценки кристаллограмм сыворотки крови особенности краевой зоны фазии выразились при визуаметрии в повышении значения параметра (с $1,10 \pm 0,12$ до $1,65 \pm 0,14$ балла при концентрации NO, равной 20 ppm; $p < 0,05$). Дальнейшее увеличение воздействующей дозы оксида азота приводило к резкому сужению краевой зоны с соответствующим падением уровня показателя, достигающим максимума ($0,41 \pm 0,12$ балла) при барботаже образцов крови наивысшей из использованных концентраций соединения (100 ppm). Важно отметить, что наиболее значимые изменения, обнаруживаемые при действии газового потока от аппарата «Плазон», также проявляются в краевой зоне фазии в форме особой дополнительной полосы. В целом результаты исследования подтверждают исходные предположения о превалирующем влиянии газообразного оксида азота на белковую фракцию плазмы крови здоровых доноров при обработке *in vitro* [12,25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволили установить, что результат влияния монооксида азота на кристаллогенные свойства сыворотки крови непосредственно определяется концентрацией NO и его формой (свободной или депонированной), а также наличием примесей активных форм кислорода. При этом наиболее выраженный стимулирующий эффект выявлен для депонированной формы оксида азота – динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами.

Низкие концентрации монооксида азота оказывают модулирующее действие на кристаллогенные свойства сыворотки крови человека, причем их влияние реализуется преимущественно в модуляции свойств белков. Установлено, что наиболее оптимальным эффектом, проявляющимся в расширении краевой зоны и формировании в ней регулярных центростремительных разломов, обладает газовый поток с концентрацией оксида азота 20 ppm.

Напротив, высокие концентрации NO способствуют ингибированию кристаллогенной активности биосреды, многократно повышая степень деструкции формирующихся структурных элементов и способствуя формированию дополнительной полосы в краевой зоне микропрепарата.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых-докторов наук (грант МД-7256.2015.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ф. Ванин, Вестн. РАМН **4**, 3 (2000).
2. В. Г. Граник и Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств* (Вузовская книга, Москва, 2004).
3. *Nitric Oxide. Basic Research and Clinical application*, Ed. by R. J. Gryglewsky and P. Minuz. (IOS Press, Amsterdam; Berlin; Oxford; Tokyo; Washington, 2001).
4. *Radicals for Life: The Various forms of Nitric Oxide*, Ed. by E. van Faassen and A. F. Vanin. (Elsevier, Amsterdam, 2007).
5. А. Ф. Ванин, Г. Н. Можоккина, Н. А. Ткачев и др., *Биофизика* **58** (2), 295 (2013).
6. Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов, В. С. Июдин и др., *Биофизика* **58** (2), 276 (2013).
7. А. Ф. Ванин, Р. Р. Бородулин, Л. Н. Кубрина и др., *Биофизика* **58** (1), 126 (2013).
8. А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, С. П. Перетягин и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **158** (7), 40 (2014).
9. M. I. Remizova, N. I. Kochetygov, K. A. Gerbout, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **66**, 240 (2011).
10. А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева и С. П. Перетягин, *Современные технологии в медицине* **5** (4), 33 (2013).
11. А. К. Мартусевич, С. П. Перетягин, А. Г. Соловьева и А. Ф. Ванин, *Биофизика* **58** (5), 871 (2013).
12. А. К. Мартусевич и С. П. Перетягин, *Биофизика* **58** (6), 1038 (2013).
13. A. van der Vliet, et al., *J. Biol. Chem.* **272**, 7617 (1997).
14. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).
15. А. К. Мартусевич и Н. Ф. Камакин, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **143** (3), 358 (2007).
16. М. Г. Залеский, *Вестн. новых мед. технологий* **12** (2), 93 (2005).
17. М. Г. Залеский, В. Л. Эмануэль и М. В. Краснова, *Клин. лаб. диагностика* **8**, 20 (2004).
18. Ю. Ю. Тарасевич, О. П. Исакова, В. В. Кондухов, А. В. Савицкая, *Журн. техн. физики* **80** (5), 45 (2010).
19. Т. А. Яхно, В. В. Казаков, О. А. Санина и др., *Журн. техн. физики* **80** (7), 17 (2010).
20. Т. А. Yakhno, *Natural Sci.* **3**, 220 (2010).
21. К. В. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **18**, 37 (2008).
22. В. Н. Кидалов и А. А. Хадарцев, *Тезисы географии крови и биологических жидкостей* (Тульский полиграфист, Тула, 2009).
23. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 4 (2013).
24. Y. Surio Rahmanto, D. S. Kalinowski, D. J. Lane, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 6960 (2012).
25. A. F. Vanin and E. I. Chazov, *Biophysics* **56**, 268 (2011).

Nitric Oxide in Modulation of Crystallogenic Properties of Biological Fluid

A.K. Martusevich* **, L.K. Kovaleva*, and A.V. Davyduk****

**Volga Federal Medical Research Center, Verhne-Voljskaya nab. 18, Nizhny Novgorod, 603155 Russia*

***Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, prosp. Gagarina 97, Nizhny Novgorod, 603107 Russia*

****Kirov State Medical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation,
ul. K. Marksa 112, Kirov, 610027 Russia*

The aim of this work was a comparative analysis of the influence of different NO forms on dehydration structurization of human blood serum. Blood specimens from 15 healthy people were treated by NO-containing gas flow (800 and 80 ppm) generated with the «Plazon» unit, experimental NO-generator (20, 50, 75 and 100 ppm) and by water solution of thiol-containing dinitrosyl iron complexes (3 mM/L). The influence of blood sodium on blood serum crystallization in original and NO-treated blood specimens was estimated. It was found, that the effect of NO on crystallogenic properties of blood serum depends directly on its concentration and form (free or bound), as well as on the presence of reactive oxygen species in gas flow. The most pronounced stimulating effect was observed for the bound form of NO – dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands. Low NO concentrations modulated crystallogenic properties of blood serum and the most optimal stimulating action was demonstrated in gas flow containing 20 ppm nitric oxide. In contrast, high NO concentration (800 ppm) inhibited the crystallogenic activity of biological fluid with multiply increasing of structural elements destruction leading to the formation of an additional belt in marginal zone of dehydrated specimens.

Key words: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, blood, crystallogenic properties, biocrystallogics