

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ МИКРОГЕМОДИНАМИКИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА КРОВИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНГАЛЯЦИОННОГО ОКСИДА АЗОТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Перетягин П.В., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Бояринов Г.А., Сергиенко В.И.

Приволжский исследовательский медицинский университет

Верхне-Волжская наб., 18, г. Нижний Новгород, 603155, РФ; e-mail: peretyaginpv@gmail.com

Поступила в редакцию: 28.07.2019

Аннотация. В работе представлены результаты исследования микроциркуляторного русла и параметров окислительного метаболизма крови интактных животных, подвергнутых продолжительному ингаляционному воздействию оксида азота при концентрациях 20ppm, 50ppm и 100ppm. Эксперимент выполнен на крысах линии Wistar. Ингаляции NO осуществляли в течение 30 дней. Состояние микроциркуляции и окислительного метаболизма крови оценивали через 30 суток и спустя восстановительный период после отмены окислительных нагрузок NO (60 суток). Методом лазерной доплеровской флоуметрии исследовали функционирование микрососудов кожи по уровню перфузии. В плазме крови и эритроцитах изучали интенсивность перекисного окисления липидов с помощью метода индуцированной биохемиллюминесценции и уровня малонового диальдегида. В гемолизате эритроцитов определяли активность супероксиддисмутазы. Установлено, что оптимальной концентрацией для ингаляционного применения NO является 20ppm, при использовании которой отмечено увеличение перфузии, а также максимальное повышение общей антиоксидантной активности через 30 суток и нормализация перекисного окисления липидов в крови через 60 суток после использования NO. Большие концентрации оксида азота (50ppm и 100ppm) оказали иницирующее влияние на микроциркуляцию и перекисное окисление липидов в эритроцитах и плазме крови после отмены воздействия NO на протяжении 60 суток, активируя при этом каталитические свойства супероксиддисмутазы.

Ключевые слова: оксид азота, ингаляции, микроциркуляция, перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза.

Патогенез большинства заболеваний включает избыточную активацию свободно-радикальных процессов, нарушение функционирования систем антиоксидантной защиты, что неизбежно приводит к формированию в организме окислительного стресса. В связи с этим поиск и разработка способов коррекции окислительного стресса являются крайне актуальной проблемой современной медицины. С саногенетическими целями в биологии и медицине применяют активные формы кислорода, в том числе оксид азота (NO) [1]. В настоящее время показано, что NO – важный регулятор активности внутриклеточных ферментов, функций ряда органов и тканей, в том числе свертывания крови и защитных реакций организма. Выявлено, что NO является нейромедиатором центральной и периферической нервных систем, участвует в регуляции сосудистого тонуса, как медиатор вазодилатации, а также в регуляции общего объема циркулирующей крови, скорости системного кровотока и уровня артериального давления. [2]. Биологические эффекты оксида азота зависят от его концентрации, наличия ферментов-мишеней в клетке, продуктов, которые образуются в результате взаимодействия NO с кислородом [3]. Однако, ингаляция оксида азота – процедура, которая при передозировке NO может привести к развитию тяжелых осложнений за счет образования ряда высокотоксичных соединений (альдегидов, кетонов, спиртов), накопление которых вызывает повреждение мембраносвязанных ферментов, нарушение мембранного транспорта и гибель клеток [4]. Токсический эффект оксида азота обусловлен тем, что его применение как и любых активных форм кислорода инициирует свободно-радикальное окисление (СРО), активирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран, направленных на адаптивное повышение клеточной проницаемости. Поэтому использование окислительных методов терапии, в частности, NO неразрывно связано с необходимостью исследования процессов липопероксидации, так как изменение баланса про- и антиоксидантных систем организма является одним из диагностических критериев тяжести патологического состояния, характеризуя формирование и прогрессирование окислительного и нитрозативного стресса [1].

В связи с этим, целью данной работы явилась оценка влияния длительного применения оксида азота в концентрациях 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm на параметры окислительного метаболизма и состояние микроциркуляторного русла крыс.

Исследование проведено на 38 крысах-самцах Wistar, разделенных на группы: группа 1 (n = 8) – интактные животные, без воздействий, группы 2, 3, 4 (n = 5 в каждой) – животные, подвергнутые ежедневному ингаляционному воздействию оксида азота (экспозиция = 10 мин.) с концентрацией 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm соответственно в течение 30 дней, группы 5, 6 и 7 – опытные (по n=5 в каждой), животные которых на протяжении 30 суток ежедневно ингалировали по 10 минут NO в концентрациях 20ppm, 50ppm и 100ppm и затем 30 суток не подвергали манипуляциям. Крыс 2, 3 и 4 групп выводили из эксперимента на 30-е сутки путем декапитации под наркозом (Золетил + Ксила), животных 5, 6, 7 групп – на 60-е сутки. Синтез газовой смеси производили с помощью экспериментального аппарата для генерации NO (РФЯЦ-ВНИИЭФ, г. Саров).

Таблица 1. Значения параметров микроциркуляции животных при длительных ингаляциях оксида азота

| Параметр | Интактные крысы | 20 ppm | | 50 ppm | | 100 ppm | |
|--------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 30 суток | 60 суток | 30 суток | 60 суток | 30 суток | 60 суток |
| ПМ, перф.ед. | 9,6 | 11,3* | 12,1* | 10,8* | 11,5* | 10,2 | 10,9* |
| Э, усл.ед. | 12,9 | 13,7 | 14,5* | 13,4 | 13,8 | 13,5 | 13,9 |
| Н, усл.ед. | 9,1 | 10,2* | 10,7* | 9,8 | 10,3* | 9,6 | 10,2* |
| М, усл.ед. | 8,4 | 9,6* | 9,8* | 9,3 | 9,6* | 9,1 | 9,5* |
| Д, усл.ед. | 5,8 | 5,7 | 5,2* | 6,1 | 5,9 | 6,0 | 5,8 |
| С, усл.ед. | 3,3 | 4,1* | 4,4* | 3,8* | 4,2* | 3,9* | 4,3* |
| ПШ, перф.ед. | 1,1 | 1,3* | 1,2 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,1 |

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$)

Посредством анализатора кровотока ЛАКК-М (исп.2) (НПП «ЛАЗМА», Россия) были получены значения показателя микроциркуляции (ПМ), регуляторных факторов (эндотелиального (Э), нейрогенного (Н), миогенного (М), дыхательного (Д), сердечного (С)), а также показателя шунтирования (ПШ). В крови, стабилизированной цитратом натрия, исследовали интенсивность свободно-радикального окисления (СРО) и общую антиоксидантную активность (ОАА) на БХЛ-10 (Н.Новгород), определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Результаты обрабатывали с помощью Statistica 6.0.

Длительное применение оксида азота (на протяжении 30 суток) путём ежедневного ингаляционного воздействия разными дозами NO (20 ppm, 50 ppm, 100 ppm) сопровождалось интенсификацией объёмного микрокровотока. Применение для ингаляций оксида азота в концентрации 20 ppm через 30 суток привело к возрастанию микроциркуляции на 17% от физиологических значений (табл. 1). При увеличении концентрации NO в ингаляционном потоке ответные сосудистые реакции дозозависимо убывали: при концентрации NO 50 ppm показатель микроциркуляции составлял 112%, а при концентрации 100 ppm – 106% от уровня, характерного для интактных животных.

Большинство регуляторных факторов возрастало в ответ на применение всех концентраций оксида азота, однако наиболее явным был рост нейрогенного, миогенного и сердечного компонентов на 12%, 14% и 24%, соответственно, при воздействии соединения с концентрацией 20 ppm. Увеличение амплитуд миогенной и сердечной регуляции свидетельствовало о происходящих процессах вазодилатации на фоне возрастающего притока артериальной крови. Роль шунтирующих микрососудов не получила явного проявления при всех изучаемых концентрациях, что свидетельствовало об оптимальном задействовании нутритивных сосудов микроциркуляторного звена. После отмены воздействий (60 суток) отмечено минимальное снижение показателей активной и пассивной регуляции микрокровотока.

Исследование процессов липопероксидации в плазме крови животных показало снижение светосуммы хемилюминесценции при использовании NO на протяжении 30 суток в концентрации 20 ppm на 10%, при 50 ppm – на 24% по сравнению с интактными животными (табл. 2). На протяжении восстановительного периода после отмены окислительных нагрузок NO (60 суток) отмечено усиление процессов липопероксидации при использовании всех концентраций NO: при 20 ppm показатель S увеличился на 22%, при 50 ppm – на 71%, при 100 ppm – на 44% по сравнению с аналогичными параметрами на 30-е сутки. Перекисное окисление в плазме под влиянием ингаляций оксида азота через 60 суток оказалось выше показателя здоровых животных при 20 ppm NO на 9%, при 50 ppm NO – на 29%, при 100 ppm NO – на 41%.

Таблица 2. Динамика изменения биохимических показателей в крови крыс при хроническом воздействии оксида азота

| Параметр | Интактные крысы | 20 ppm | | 50 ppm | | 100 ppm | |
|--------------------------------|-----------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| | | 30 суток | 60 суток | 30 суток | 60 суток | 30 суток | 60 суток |
| S, усл.ед., плазма | 11,4 | 10,3 | 12,6** | 8,6* | 14,7*.* | 11,1 | 15,9*.* |
| S, усл.ед., эритроциты | 9,1 | 4,3* | 11,4*.* | 5,2* | 11,7*.* | 4,8* | 9,4** |
| МДА, мкмоль/л, плазма | 0,9 | 0,6* | 0,4*.* | 0,7* | 0,2*.* | 0,8* | 0,3*.* |
| МДА, мкмоль/л, эритроциты | 6,1 | 5,9 | 5,5 | 6,5 | 7,2* | 7,2* | 8,9*.* |
| tg2 α , усл.ед., плазма | 0,8 | 0,9* | 0,8 | 0,8 | 0,7* | 0,7* | 0,8** |
| СОД | 917,3 | 990,8 | 1664,6*.* | 1421,4* | 1631,3*.* | 1295,3* | 1889,1*.* |

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$)

В эритроцитах по данным хемилюминесценции выявлено статистически значимое снижение ПОЛ через 30 суток после применения всех используемых концентраций NO: при 20 ppm – на 52%, при 50 ppm – на 45%, при 100 ppm – на 47% по сравнению с контрольной группой крыс (табл. 2). Уменьшение интенсивности липопероксидации в эритроцитах под влиянием оксида азота свидетельствует о повышении резистентности мембран к воздействию перекиси водорода, но в условиях длительной NO интоксикации может привести к нарушениям в биологических мембранах, связанным с изменением их проницаемости, ионного транспорта и физико-химических свойств мембранных белков и липидов, изменением активности мембранно-связанных ферментов, понижением электрической стабильности липидного бислоя мембран. После ингаляций оксида азота с концентрациями 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm, соответственно, у животных в восстановительном периоде (через 60 суток) отмечено повышение светосуммы хемилюминесценции в эритроцитах при концентрации 20 ppm в 2,6 раза, при 50 ppm – в 2,4 раза, при 100 ppm – в 2 раза по сравнению с показателями крыс, получавших ингаляции NO на протяжении 30 суток. При этом параметр S спустя 60 суток после воздействия оксида азота оказался выше значений S здоровых животных при использовании 20ppm NO на 26%, при 50 ppm – на 30%, при 100 ppm – на 4%, что свидетельствует об интенсификации кислородзависимых процессов, обуславливающих свободнорадикальное окисление мембран эритроцитов. Таким образом, длительное применение NO (30 суток) оказывает ингибирующее влияние на интенсивность ПОЛ в плазме и эритроцитах крови. Выявлено, что оксид азота обладает выраженными прооксидантными свойствами, проявляющимися в отдаленные сроки после воздействия спустя 60 суток, NO активирует СРО в плазме при использовании высоких концентраций (50 ppm, 100 ppm) и в эритроцитах при влиянии 20 ppm и 50 ppm NO. Одним из механизмов повреждающего действия оксида азота на биологические мембраны является образование инициаторов перекисного окисления липидов (пероксинитрита, гидроксильного радикала, синглетного кислорода), в результате чего создаются условия для активации процессов ПОЛ. Основным токсическим эффектом обладают высокореактивные гидроксильные радикалы, концентрация которых возрастает при увеличении количества оксида азота.

Снижение общего уровня прооксидантного баланса на фоне длительного воздействия оксида азота (30 суток) подтверждали также данные определения промежуточного продукта ПОЛ – малонового диальдегида – в плазме: уровень МДА у животных 2, 3 и 4 групп уменьшился при использовании NO в концентрации 20 ppm – на 43%, при 50 ppm – на 31%, при 100 ppm – на 28% по сравнению со здоровыми крысами (табл. 2). При этом отмечен рост содержания МДА в эритроцитах при ингаляционно-наружном применении оксида азота на протяжении 30 суток в концентрации 100 ppm на 19% по сравнению с контролем (табл. 2). В восстановительном периоде (через 60 суток) после ингаляций оксида азота у животных 5, 6 и 7 группы концентрация МДА в плазме снизилась при использовании 20 ppm NO на 25%, при 50 ppm – в 3,2 раза, при 100 ppm – в 3 раза по сравнению с показателями крыс 2, 3 и 4 групп соответственно, оказавшись ниже значений здоровых животных при 20 ppm в 2,3 раза, при 50 ppm – в 4,7 раза, при 100ppm – в 4 раза (табл. 2). В эритроцитах уровень МДА вырос через 60 суток после воздействия 50 ppm на 12%, при 100 ppm – на 25% по сравнению с показателями крыс, ингалировавшихся 30 суток, превысив значения здоровых крыс при 50 ppm на 19%, при 100 ppm NO – на 48% (табл. 2).

Выявленные изменения прооксидантного статуса, обусловленные хроническим ингаляционно-наружным воздействием оксида азота, находятся в тесной взаимосвязи с состоянием антиоксидантной системы защиты. Показано, что длительное ингаляционно-наружное воздействие NO (30 суток) привело к росту общей антиоксидантной активности плазмы крови при применении концентрации 20 ppm на 29%, при использовании 50 ppm – на 8%, при 100 ppm NO – на 4% по сравнению с показателями интактных животных (табл. 2). Известно, что при низких концентрациях оксид азота ведет себя как антиоксидант, так как является отрицательным модулятором НАДФН-оксидазы, продуцирующей одну из активных форм кислорода – H_2O_2 , а также может реагировать с радикалами органических соединений, обрывая цепные реакции, что привело к снижению светосуммы хемилюминесценции в плазме и эритроцитах через 30 суток после воздействия 20 ppm NO. При этом на 60-е сутки эксперимента антиоксидантные резервы, оцениваемые по значению показателя tg 26, нормализовались: АОА плазмы крови при использовании 20ppm NO снизилась на 19% по сравнению с 30 сутками.

Исследование удельной активности супероксиддисмутазы, фермента первой линии антиоксидантной защиты, выявило повышение активности СОД через 30 суток после ингаляционно-наружного воздействия NO в концентрации 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm на 8%, 55% и 41% соответственно по сравнению с показателем интактных животных, что обеспечивает эффективную защиту клеточных структур от образующихся высокотоксичных кислородных радикалов (табл. 2). В восстановительном периоде (через 60 суток) после ингаляций NO у крыс 5, 6 и 7 групп отмечены повышенные значения удельной активности СОД и по сравнению с показателями крыс, подвергнутых воздействию NO на протяжении 30 суток (при 20 ppm – на 68%, при 50 ppm – на 15%, при 100 ppm – на 46%), и по сравнению с контролем (при 20ppm – на 81%, при 50 ppm – на 78%, при 100 ppm – в 2 раза).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о наличии дозозависимого действия ингаляционного применения моно оксида азота на микроциркуляцию. Причем наиболее оптимальный ответ микроциркуляторного русла выявлен при использовании низкой концентрации соединения (20 ppm), при котором выявлено более выраженное его стимулирующее влияние на объёмный микрокровоток (30 суток) с сохранением эффекта после отмены воздействия (60 суток). Длительное применение оксида азота также

вызывает повышение фермента первого звена антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы эритроцитов крови через 30 суток после воздействия NO и в восстановительном периоде после отмены окислительных нагрузок NO (60 суток). Отмечено снижение интенсивности перекисного окисления липидов в плазме крови крыс по данным биохемилюминесценции и по концентрации малонового диальдегида при ингаляционно-наружном применении оксида азота на протяжении 30 суток. Показано, что оптимальной дозой для ингаляционного применения оксида азота может быть 20 ppm, при использовании которой отмечено повышение общей антиоксидантной активности через 30 суток после воздействия NO и нормализация перекисного окисления липидов в плазме (по данным биохемилюминесценции) и эритроцитах (по концентрации малонового диальдегида) после периода восстановления (через 60 суток) от использования оксида азота. Большие концентрации оксида азота (50 ppm и 100 ppm) при длительном хроническом его применении инициировали процессы СРО после отмены воздействия NO спустя 60 суток в эритроцитах (по уровню МДА) и плазме (по показателю светосуммы хемилюминесценции), проявляя при этом активирующее влияние на активность супероксиддисмутазы.

Список литературы / References:

1. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. *Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты*. М.: Фирма "Слово", 2006, 556 с. [Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. *Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants*. М.: Firm "Word", 2006, 556 p. (In Russ.)]
2. Vajrovic F. et al. The contribution of lumbal sympathetic neurones activity to rats skin blood flow oscillation. *European Journal of Physiology*, 2000, vol. 439, pp. R158-R159.
3. Kincella J.P. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure. *New England Journal*, 2006, vol. 355, pp. 354-364.
4. Kumar P. et al. Use of inhaled nitric oxide in preterm infants. *Pediatrics*, 2014, vol. 133, no. 1, pp. 164-170.

STUDY OF LOCAL MICROHEMODYNAMICS AND OXIDATIVE METABOLISM OF BLOOD UNDER LONG-TERM EXPOSURE TO INHALED NITRIC OXIDE IN THE EXPERIMENT

Peretyagin P.V., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Boyarinov G.A., Sergienko V.I.

Volga Research Medical University

Verkhne-Volzhsкая dr., 18, Nizhniy Novgorod, 603155, Russia; e-mail: peretyaginpv@gmail.com

Abstract. The paper presents the results of a study of the microcirculatory bed and parameters of oxidative blood metabolism of intact animals exposed to prolonged inhalation of nitric oxide at concentrations of 20 ppm, 50 ppm and 100 ppm. The experiment was performed on Wistar rats. No inhalations were carried out within 30 days. The state of blood microcirculation and oxidative metabolism was assessed 30 days later and the recovery period after the cancellation of oxidative loads NO (60 days). Laser Doppler flowmetry was used to study the functioning of skin microvessels in terms of perfusion. The intensity of lipid peroxidation was studied in blood plasma and erythrocytes using the method of induced biochemiluminescence and the level of Malon dialdehyde. The activity of superoxide dismutase was determined in erythrocyte hemolysate. It was found that the optimal concentration for inhalation use of NO is 20 ppm, which was used to increase perfusion, as well as the maximum increase in total antioxidant activity in 30 days and normalization of lipid peroxidation in the blood 60 days after use of NO. High concentrations of nitric oxide (50 ppm and 100 ppm) had an initiating effect on microcirculation and lipid peroxidation in erythrocytes and blood plasma after the cancellation of NO exposure for 60 days, activating the catalytic properties of superoxide dismutase.

Key words: *nitric oxide, inhalation, microcirculation, lipid peroxidation, Malon dialdehyde, superoxide dismutase.*