

11. Градова М.А., Жданова К.А., Брагина Н.А., Лобанов А.В., Мельников М.Я. Агрегационное состояние амфифильных катионных производных тетрафенилпорфирина в водных микрогетерогенных системах. *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2015, № 4, с. 806-811. [Gradova M.A., Zhdanova K.A., Bragina N.A., Lobanov A.V., Melnikov M.Ya. Aggregation state of amphiphilic cationic tetraphenylporphyrin derivatives in aqueous microheterogeneous systems. *Russian Chemical Bulletin*, 2015, vol. 64, no. 4, pp. 806-811. (In Russ.)]

12. Gradova M.A., Artemov V.V., Lobanov A.V.. Aggregation behavior of tatrpheniylporphyrin in aqueous surfactant solutions: Chiral premicellar J-aggregate formation. *J. of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2015, no. 19, pp. 1-7.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ИНГАЛЯЦИЙ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Соловьева А.Г., Перетягин П.В.

Приволжский Федеральный медицинский исследовательский центр
Верхне-Волжская набережная, 18, г. Нижний Новгород, 603155, РФ
e-mail: sannag5@mail.ru

Аннотация. Работа посвящена изучению длительного влияния газовой смеси, содержащей синглетный кислород (СК), на про- и антиоксидантные системы крови и состояние микроциркуляции у крыс. Исследование проведено на белых крысах-самцах Wistar массой 180–220 г., из которых сформировали 3 группы: первая – контроль (интактные здоровые животные); вторая – опытная, в которой крысы были подвергнуты ежедневному воздействию (по 10 минут) газовой смеси, содержащей СК, в течение 30 дней; третья – опытная, животные которой на протяжении 30 суток ежедневно ингалировались по 10 минут газовой смесью с СК и затем 30 суток не подвергались никаким манипуляциям. Для оценки интенсивности перекисного окисления липидов определяли концентрацию малонового диальдегида в крови спектрофотометрическим методом. В гемолизате эритроцитов определяли активность супероксиддисмутазы. Микроциркуляцию оценивали методом лазерной доплеровской флоуметрии. Показано, что к 60 суткам после ингаляций СК происходило повышение эндотелиального и сердечного факторов регуляции кровотока. Установлено, что длительное субхроническое ингаляционно-наружное воздействие газовой смеси, содержащей синглетный кислород, на протяжении 30 суток снижает в целом про- и антиоксидантный баланс в организме животных. Спустя 60 суток после применения синглетного кислорода отмечено повышение активности супероксиддисмутазы в эритроцитах.

Ключевые слова: синглетный кислород, микроциркуляция, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза.

THE STUDY OF THE FUNCTIONAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RATS BLOOD AFTER INHALATION OF SINGLET OXYGEN UNDER CONDITIONS OF CHRONIC EXPERIMENT

Soloveva A.G., Peretyagin P.V.

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre»
of the Ministry of Health of the Russian Federation
Verhne-Volzhszkaya embankment, 18, Nizhny Novgorod, 603155, Russia
e-mail: sannag5@mail.ru

Abstract. The work is devoted to study long impact of a gas mixture containing singlet oxygen (SO) on pro - and antioxidant system of blood and microcirculation in rats. The study was conducted on white Wistar rats weighing 180-220 g, which formed 3 groups: I – control (intact healthy animals); II – experiment, in which rats were subjected to daily exposure (10 minutes) the gas mixture containing the SO within 30 days; III – experiment animals of which for 30 days daily were inhaled for 10 minutes with a gas mixture with the SO and then 30 days was not subjected to any manipulation. The concentration of malonic dialdehyde in the blood was determined by spectrophotometrically. Microcirculation was assessed by laser Doppler flowmetry. The activity of superoxide dismutase was determined in hemolysate of erythrocytes. Microcirculation was assessed using laser Doppler flowmetry. It was shown that to 60 days after inhalation of SO the endothelial and cardiac factors in the regulation of blood were increased. It was installed that long-term subchronic inhalation of gas mixture containing singlet oxygen, for 30 days reduced the pro - and antioxidant balance in the organism of animals. After 60 days after the application of singlet oxygen the superoxide dismutase activity in erythrocytes increased.

Key words: singlet oxygen, microcirculation, lipid peroxidation, superoxide dismutase.

Одним из новых методов кислородотерапии является синглетно-кислородная терапия [1,2]. Использование синглетного кислорода (СК) эффективно при лечении хронического обструктивного бронхита, бронхиальной астмы, сахарного диабета, кардиологических заболеваний, больных ревматизмом [3]. Применение СК нормализует содержание гемоглобина, углеводный обмен, активизирует фагоцитоз и фосфорилирующее дыхание митохондрий [3,4]. При этом СК играет ключевую роль при развитии ряда патологических процессов, таких как катаракта, протопорфирии, синдром ишемии-реперфузии [1], так как повышенная продукция активных форм кислорода вызывает окислительный стресс [5]. Кроме того, интенсификация свободно-радикального окисления

(СРО), активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран направлены на адаптивное в условиях гиперметаболизма повышение клеточной проницаемости. Поэтому использование окислительных методов терапии неразрывно связано с необходимостью исследования процессов микроциркуляции и липопероксидации, так как изменение гемореологии и баланса про- и антиоксидантных систем организма являются среди прочих диагностическими критериями тяжести патологического состояния [5]. В этой связи актуальна проблема изучения функционально-биохимических показателей крыс при использовании синглетного кислорода в условиях его хронического воздействия на организм для определения степени безопасности применения СК.

Цель исследования – изучение длительного влияния газовой смеси, содержащей синглетный кислород, на про- и антиоксидантные системы крови и состояние микроциркуляции у крыс.

Материалы и методы исследования.

Эксперимент проведен на белых крысах-самцах Wistar, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (г. 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. Из 20 крыс массой 200-250 г. сформировали 3 группы: первая – контроль (интактные здоровые животные, n=8); вторая – опытная (n=6), в которой крысы были подвергнуты ежедневному воздействию (по 10 минут) газовой смеси, содержащей СК, в течение 30 дней; третья – опытная (n=6), животные которой на протяжении 30 суток ежедневно ингаляровались по 10 минут газовой смесью с синглетным кислородом и затем 30 суток не подвергались никаким манипуляциям. Крыс второй группы выводили из эксперимента на 30-е сутки, животных третьей группы – на 60-е сутки путем декапитации под комбинированным наркозом (Золетил (60 мг/кг) + Ксила(6 мг/кг)). Ингаляционно-наружное воздействие СК на животных осуществляли в эксикаторе. Воздушный поток с СК получали с применением аппарата «Airnergy» (Германия) при мощности генератора 100%.

Для исследований баланса про- и антиоксидантных систем использовали кровь, стабилизированную цитратом натрия (1:9). Интенсивность перекисного окисления липидов определяли по уровню содержания вторичного продукта СРО – малонового диальдегида (МДА) в плазме и эритроцитах методом M.Mihara, M.Uchiyama [6]. Среди ферментов, представляющих первое звено антиоксидантной системы защиты, исследовали супероксиддисмутазу (СОД), которая переводит супероксидный радикал в электронейтральную форму H_2O_2 . Активность СОД определяли в гемолизате отмытых эритроцитов (1:10) по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина [7]. Расчет удельной активности СОД осуществляли по концентрации белка, исследовавшегося модифицированным методом Лоури [8].

Исследование микроциркуляции осуществляли методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [9] с помощью программно-аппаратного комплекса «ЛАКК-М». При исследовании микроциркуляции оценивали показатель микроциркуляции (ПМ), отражающий средний уровень перфузии (средний поток эритроцитов) в единице объема ткани за единицу времени. С помощью программных средств проводили «Вейвлет-анализ» (амплитудно-частотный спектр), который позволял после 3-х минутной записи ЛДФ-граммы производить обшчет медленных и высокочастотных колебаний кровотока для того, чтобы оценить роль пассивных (пульсовая волна и дыхательная волна) и активных факторов (миогенные, нейрогенные и эндотелиальные колебания) регуляции микрокровотока с вычислением показателя шунтирования микрокровотока (ПШ).

Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0, с помощью которой рассчитывалась средняя арифметическая величина показателей и ошибка среднего. Значимость различий между показателями определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение.

После 30-дневного курса ингаляций СК методом лазерной доплеровской флоуметрии было выявлено угнетение микроциркуляции на 55% по сравнению со здоровыми животными. В восстановительном периоде после отмены ингаляций СК (60 суток) ПМ остался ниже значения ПМ крыс контрольной группы на 58% (см. рис. 1).

Анализ активных факторов контроля микроциркуляции выявил снижение эндотелиального механизма регуляции просвета и тонуса сосудов во второй опытной группе на 21% по сравнению с показателем контрольных крыс (см. рис. 2). При оценке эндотелиальной дисфункции в восстановительном периоде (60 суток) выявлено повышение амплитуды колебаний на 24% по сравнению с контролем, что, вероятно, обусловлено выделением из эндотелия сосудов свободного оксида азота [1]. Ингаляции СК на протяжении 30 суток привели к незначительному (6%) повышению нейрогенных колебаний. При этом у животных третьей опытной группы к 60 суткам отмечено повышение нейрогенного фактора регуляции кровотока на 44% по сравнению с контролем, что свидетельствует о возрастании воздействия симпатической регуляции на просвет сосудов.

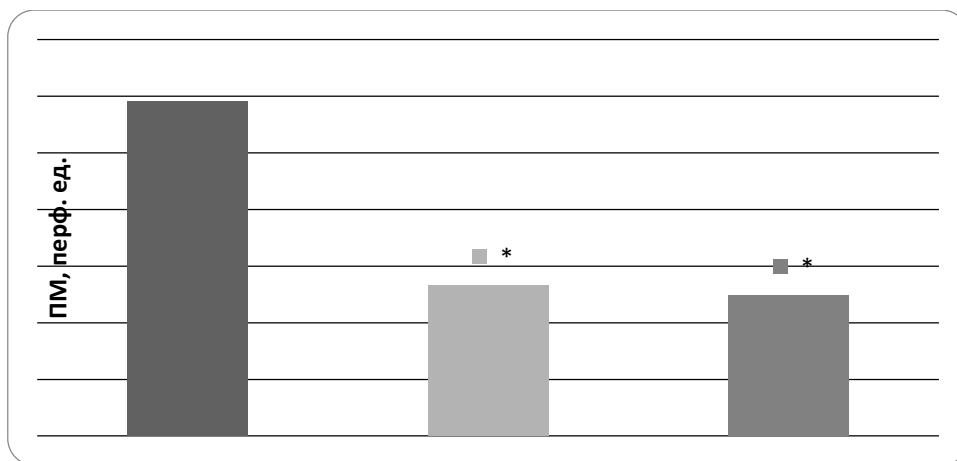


Рисунок 1 – Показатель микроциркуляции при субхроническом воздействии синглетного кислорода
Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

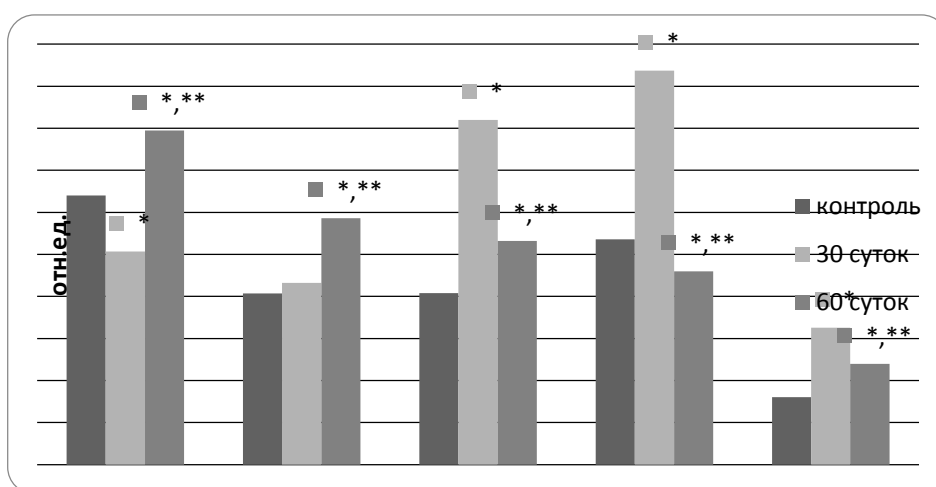


Рисунок 2 – Факторы регуляции микрокровотока при субхроническом воздействии синглетного кислорода
Примечание: Э – эндотелиальные колебания; Н – нейрогенные колебания; М – миогенные колебания; С – пульсовая волна; Д – дыхательная волна * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению со второй опытной группой ($p < 0,05$)

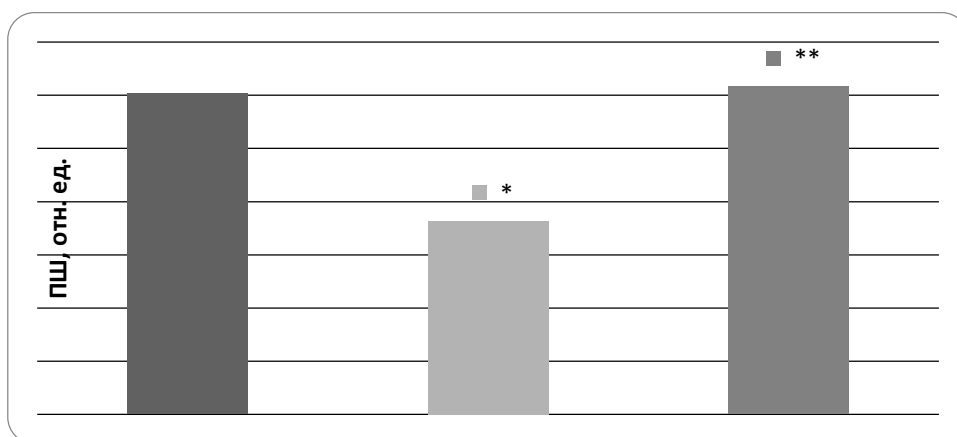


Рисунок 3 – Показатель шунтирования при субхроническом воздействии синглетного кислорода
Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению со второй опытной группой ($p < 0,05$)

Ингаляции СК (30 суток) привели к повышению миогенного механизма регуляции просвета и тонуса сосудов на 101% по сравнению с контролем, что свидетельствует о вазодилатирующем действии СК, расширении просвета центральных сосудов. В сочетании со снижением ПМ (см. рис. 1) и ПШ (см. рис. 3) выявленные изменения миогенного фактора регуляции кровотока указывают на преобладание естественного центрального кровотока. К 60 суткам миогенный механизм регуляции просвета и тонуса сосудов остался выше значения интактных животных на 30% (см. рис. 2).

Анализ пассивных факторов микроциркуляции, отражающих колебания кровотока вне системы микроциркуляции, при ингаляциях СК (30 суток) выявил повышение связанной с веноулярным звеном дыхательной волны на 75% по сравнению с интактной группой животных (см. рис. 2). К 60 суткам отмечено снижение дыхательного фактора регуляции кровотока на 14% по сравнению с контролем, что свидетельствует о нормализации процессов оттока крови.

Другой пассивный фактор микроциркуляции, пульсовая волна, отражающий приток артериальной крови в микроциркуляторное русло, повысился на 103% при 30-дневном курсе ингаляций СК по сравнению с контролем. В восстановительном периоде исследуемый показатель снизился, но превысил значения контрольной группы крыс на 50%.

Выявлено снижение общего уровня прооксидантного баланса на фоне длительного воздействия газовой смеси, содержащей СК, о чем свидетельствовало уменьшение концентрации малонового диальдегида в плазме крови во второй и третьей опытных группах соответственно на 23% и 60% по сравнению с интактными животными (см. табл. 1).

Таблица 1 – Концентрация малонового диальдегида в крови крыс при субхроническом воздействии синглетного кислорода

| Показатель | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------------|-------------|--------------|-----------------|
| МДА в плазме, мкмоль/л | 1,043±0,019 | 0,804±0,013* | 0,421±0,009*/** |
| МДА в эритроцитах, мкмоль/л | 6,040±0,038 | 5,997±0,054 | 3,485±0,024*/** |

*Примечание: 1 – первая группа – контроль (интактные здоровые животные); 2 – вторая опытная группа, в которой крысы 30 суток ингалировались газовой смесью, содержащей СК; 3 – третья опытная группа, животные которой на протяжении 30 суток ингалировались газовой смесью с синглетным кислородом и затем 30 суток не подвергались никаким манипуляциям; * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению со второй опытной группой ($p < 0,05$).*

В эритроцитах не выявлено изменения концентрации МДА спустя 30 суток после воздействия газовой смеси, содержащей СК, по сравнению с контрольной группой крыс (см. табл. 1). В третьей опытной группе в эритроцитах отмечено снижение уровня МДА по сравнению с контролем и показателем второй экспериментальной группы на 41% и 42% соответственно.

Таким образом, ингаляционно-наружное применение газовой смеси, содержащей кислород, приводит к снижению прооксидантного баланса крови через 30 суток после воздействия и в восстановительном периоде спустя 60 суток после использования СК. Участие синглетного кислорода в процессах перекисного окисления обусловлено, вероятно, способностью СК внедряться по месту двойных связей в молекулы полиненасыщенных жирных кислот с образованием гидропероксидов [3].

Исследование ферментативного звена антиоксидантной защиты организма выявило уменьшение удельной активности СОД на 7% через 30 суток после воздействия газовой смеси, содержащей СК, по сравнению с контролем (см. табл. 2). В восстановительном периоде спустя 60 суток после ингаляционно-наружного применения синглетного кислорода отмечено повышение антиоксидантных ресурсов эритроцитов, проявляющееся в увеличении удельной активности СОД. В третьей опытной группе активность СОД возросла на 24% и 34% по сравнению с контролем и показателем второй опытной группы соответственно.

Таблица 2 – Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах крови крыс при субхроническом воздействии синглетного кислорода

| Показатель | 1 | 2 | 3 |
|----------------------|--------------|--------------|-------------------|
| СОД, усл.ед/мг белка | 917,30±18,21 | 852,97±10,67 | 1138,68±15,09*/** |

*Примечание: 1 – первая группа – контроль (интактные здоровые животные); 2 – вторая опытная группа, в которой крысы 30 суток ингалировались газовой смесью, содержащей СК; 3 – третья опытная группа, животные которой на протяжении 30 суток ингалировались газовой смесью с синглетным кислородом и затем 30 суток не подвергались никаким манипуляциям; * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению со второй опытной группой ($p < 0,05$).*

Заключение. Таким образом, к 60 суткам после ингаляций СК происходит повышение эндотелиального и сердечного факторов регуляции кровотока, что свидетельствует об улучшении притока артериальной крови вследствие возможного повышения уровня простогландинов и свободного оксид азота. Результаты проведенного

исследования позволяют констатировать, что длительное субхроническое ингаляционно-наружное воздействие газовой смеси, содержащей синглетный кислород, на протяжении 30 суток снижает в целом про- и антиоксидантный баланс в организме животных. Спустя 60 суток после применения синглетного кислорода отмечено повышение активности СОД в эритроцитах.

Список литературы / References:

1. *Синглетно-кислородная терапия* (научно-методическое пособие). Под ред. Самосюк И.З., Фисенко Л.И. Киев: НМЦ «Мединтех», 2007, 228 с. [*Singlet-oxygen therapy* (scientific textbook). Under the edition of Samosjuk I.Z., Fisenko L.I. Kiev: NMC «Medinteh», 2007, 228 p. (In Russ.)]
2. Dufour Y.S., Landick R., Donohue T.J. Organization and Evolution of the Biological Response to Singlet Oxygen Stress. *J Mol Biol.*, 2008, vol. 383, no. 3, pp. 713-730.
3. Hwang J.Y. [et al.] Photoexcitation of tumor-targeted corroles induces singlet oxygen-mediated augmentation of cytotoxicity. *J Control Release*, 2012, vol. 163, no. 3, pp. 368-373.
4. Riethmuller M., Burger N., Bauer G. Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis-inducing signaling. *Redox Biol.*, 2015, no. 6, pp. 157-168.
5. Павлюченко И.И., Ременякина Е.И., Панасенкова Ю.С., Ваштак И.В. Целесообразность мониторинга перекисного окисления липидов для оценки эффективности терапевтических программ в условиях санатория. *Фундаментальные исследования*, 2012, № 7, с. 151-154. [Pavljuchenko I.I., Remenjajkina E.I., Panasenkov Ju.S., Vashtak I.V. The feasibility of monitoring of lipid peroxidation for the evaluation of the effectiveness of therapeutic programs in the conditions of sanatorium. *Fundamental research*, 2012, no. 7, pp. 151-154. (In Russ.)]
6. Mihara M., Uchiyama M. *Biochemistry*. N.Y.: Med., 1980, 271 p.
7. 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. 109-116. [Sirota T.V. A new approach to the study of the process of auto-oxidation of adrenaline and use it to measure the activity of superoxide dismutase. *Voprosy medicinskoj himii*, 1999, vol. 45, no. 3, pp. 109-116. (In Russ.)]
8. Waterborg J.H., Matthews H.R. The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.*, 1994, vol. 32, no. 1, pp. 1-4.
9. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови*. Под ред. Крупаткина А.И., Сидорова В.В. М: Медицина, 2005, 256 с. [*Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation*. Under the edition of Krupatkina A.I., Sidorova V.V. Moscow: Medicine, 2005, 256 p. (In Russ.)]

ДЛИТЕЛЬНАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СЕНСИБИЛИЗАТОРА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА КИСЛОРОДА

Ишемгулов А.Т., Летута С.Н., Пашкевич С.Н.

Оренбургский государственный университет

пр. Победы, 13, г. Оренбург, 460018, РФ

e-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru, letuta@com.osu.ru

Аннотация. Исследована кинетика затухания замедленной люминесценции ксантеновых зондов при варьировании уровня кислорода в биологических тканях. Показано, что значительная доля замедленной флуоресценции зонда образцов, находящихся на открытом воздухе, генерируется за счёт аннигиляции триплет-возбуждённого сенсibilизатора и синглетного кислорода (СТА-ЗФ). При снижении концентрации кислорода в тканях, в том числе и в результате фотодинамического эффекта, наблюдается тушение СТА-ЗФ. Показывается, что чувствительность СТА-ЗФ к содержанию синглетного кислорода в ткани выше, чем других видов замедленной люминесценции сенсibilизатора. Предлагается по величине интенсивности СТА-ЗФ можно отслеживать динамику кислорода в тканях в режиме реального времени. Преимущества данного подхода перед альтернативными методиками мониторинга свободного кислорода в тканях также обсуждаются.

Ключевые слова: синглетный кислород, оксигенация биологических тканей, синглет-триплетная аннигиляция, замедленная флуоресценция,