

ОСОБЕННОСТИ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ОКСИДА АЗОТА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

© 2016 г. А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, Е.И. Кузьмина

Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр МЗ РФ,
603155, Нижний Новгород, Верхне-Волжская наб., 18/1

E-mail: sannag5@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.16 г.

Представлены результаты исследования окислительного метаболизма крови интактных животных, подвергнутых длительному ингаляционно-наружному воздействию оксида азота в концентрациях 20, 50 и 100 ppm. Эксперимент выполнен на крысах линии Wistar. Ингаляции NO осуществляли в течение 30 сут. Состояние окислительного метаболизма крови оценивали после завершения ингаляций и по окончании 30-суточного восстановительного периода после отмены окислительных нагрузок NO. В плазме крови и эритроцитах изучали интенсивность перекисного окисления липидов с помощью метода индуцированной биохемилуминесценции и уровня малонового диальдегида. В гемолизате эритроцитов определяли активность супероксиддисмутазы. Установлено, что оптимальной концентрацией для ингаляционного применения NO является 20 ppm, при данной концентрации отмечено максимальное повышение общей антиоксидантной активности через 30 сут воздействия и нормализация перекисного окисления липидов в крови по окончании восстановительного периода. Большие концентрации оксида азота (50 и 100 ppm) оказали иницирующее влияние на перекисное окисление липидов в эритроцитах и плазме крови и после отмены воздействия NO (по окончании восстановительного периода), активируя при этом каталитические свойства супероксиддисмутазы.

Ключевые слова: оксид азота, 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 [1–3]. 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) [4]. 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 [4,5]. Выявлено, что NO является нейромедиатором центральной и периферической нервных систем, эндотелиальным фактором релаксации, рас-

слабляет гладкие мышцы [6,7]. Биологические эффекты оксида азота зависят от его концентрации, наличия ферментов-мишеней в клетке, продуктов, которые образуются в результате взаимодействия NO с кислородом [5]. Ингаляция оксида азота была с успехом применена в эксперименте и клинике для лечения легочной гипертензии новорожденных, при респираторном дистрессе, идиопатической легочной гипертензии, вызываемой заболеваниями сердца, при предоперационной подготовке [8–12]. Однако ингаляция оксида азота – процедура, которая при передозировке 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 [1,2]. Токсический эффект оксида азота обусловлен тем, что его применение, как и использование любых активных форм кислорода, инициирует свободно-радикальное окисление, активирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран,

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов, МДА – малоновый диальдегид, СОД – супероксиддисмутаза.

направленные на адаптивное повышение клеточной проницаемости. Поэтому использование окислительных методов терапии, в частности ингаляция оксида азота, 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 [13]. При проведении ингаляций NO обычно используют возрастающие концентрации 5, 10, 20, 40 ppm, время ингаляции во время каждой процедуры не превышает 10 мин. Наиболее часто применяют NO в концентрации от 10 до 40 ppm. При использовании высоких доз ингаляционного NO (100 ppm) возможно повышение уровня токсичных метаболитов (NO₂) [14]. В связи с вышеизложенным актуальна проблема изучения окислительного метаболизма крови при использовании разных концентраций NO в условиях хронического воздействия на организм для выявления степени токсичности оксида азота и эффективности длительной терапии NO.

Целью данной работы явилось изучение влияния оксида азота в концентрациях 20, 50 и 100 ppm на про- и антиоксидантную системы крови интактных крыс при его длительном ингаляционно-наружном применении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент был проведен на белых крысах-самцах линии Wistar, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (г. Москва). Всех животных содержали в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде, на рационе питания, соответствующем 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 [15].

После 14-суточной адаптации к условиям местного вивария и карантина из 38 крыс массой 200–250 г сформировали семь групп: первая – контроль (интактные здоровые животные, $n = 8$); вторая, третья, четвертая – опытные (по $n = 5$ в каждой), крысы этих групп были подвергнуты ежедневному воздействию NO (по 10 мин) с концентрацией 20, 50 и 100 ppm соответственно в течение 30 сут; пятая, шестая и седьмая – опытные (по $n = 5$ в каждой), животных в этих группах на протяжении 30 сут ежедневно ингалировали по 10 мин NO в концентрациях 20, 50 и 100 ppm соответственно,

а затем 30 сут не подвергали никаким манипуляциям. Крыс второй, третьей и четвертой групп выводили из эксперимента на 30-е сутки путем декапитации под комбинированным наркозом (Золетил (60 мг/кг) + Ксила (6 мг/кг)), животных пятой, шестой и седьмой групп – на 60-е сутки. Ингаляционно-наружное воздействие NO на животных осуществляли в эксикаторе. Преимущество такого пути введения оксида азота в том, что при ингаляции он вызывает дилатацию только тех сосудов, которые прилегают к вентилируемым альвеолам, происходит шунтирование крови от плохо к хорошо вентилируемым участкам легких, это приводит к уменьшению нагрузки на правый желудочек и улучшает оксигенацию крови [11,12]. Синтез газовой смеси производили с помощью экспериментального аппарата для генерации NO, разработанного в Российском федеральном ядерном центре – Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной физики (РФЯЦ ВНИИЭФ, г. Саров). Возможный диапазон вырабатываемых им концентраций NO составляет от 20 до 200 ppm [16].

Для исследований баланса про- и антиоксидантных систем использовали кровь, стабилизированную цитратом натрия (1:9). Эритроциты двукратно отмывали в физиологическом растворе путем центрифугирования 10 мин при 1600 g на центрифуге СМ-6 (Elmi, Латвия). В плазме крови и эритроцитах изучали активность процессов свободно-радикального окисления с помощью метода индуцированной биохемиллюминесценции на биохемиллюминетре БХЛ-06 (Ниžний Новгород) [17]. Оценивали следующие параметры хемиллюминограммы: $tg2\alpha$ – показатель, характеризующий скорость спада процессов свободно-радикального окисления в плазме и свидетельствующий об общей антиоксидантной активности; S – светосумму хемиллюминесценции за 30 с, отражающую потенциальную способность биологического объекта к ПОЛ. Интенсивность перекисного окисления липидов определяли по уровню содержания вторичного продукта свободно-радикального окисления – малонового диальдегида (МДА) – в плазме и эритроцитах методом, описанным в работе [18].

Среди ферментов, представляющих первое звено антиоксидантной системы защиты, исследовали супероксиддисмутазу (СОД) (КФ 1.15.1.1), которая переводит супероксидный радикал в электронейтральную форму H₂O₂. Активность СОД определяли в гемолизате отмытых эритроцитов (1:10) по ингибированию образования продукта автоокисления адреналина [19]. Расчет удельной активности СОД осуществляли по концентрации белка, определенной

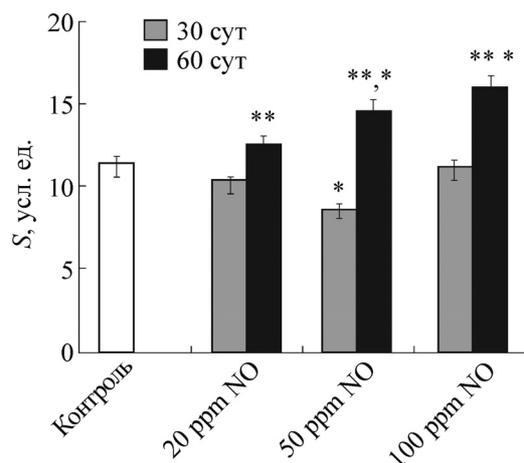


Рис. 1. Динамика изменения светосуммы хемиллюминесценции в плазме крови крыс при хроническом воздействии оксида азота. Обозначения (на этом и последующих рисунках): * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$), ** – различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками воздействия ($p < 0,05$).

модифицированным методом Лоури [20]. Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0, рассчитывали среднюю арифметическую величину показателей и ошибку среднего. Значимость различий между показателями определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование процессов липопероксидации в плазме крови животных второй и третьей группы показало снижение светосуммы хемиллюминесценции при использовании NO на протяжении 30 сут в концентрации 20 ppm на 10% ($p = 0,067$), в концентрации 50 ppm – на 24% ($p = 0,023$) по сравнению с интактными животными (рис. 1). У животных, имевших восстановительный период после отмены окислительных нагрузок NO, отмечено усиление процессов липопероксидации при использовании всех концентраций NO: при 20 ppm показатель *S* увеличился на 22% ($p = 0,034$), при 50 ppm – на 71% ($p = 0,010$), при 100 ppm – на 44% ($p < 0,001$) по сравнению с крысами второй, третьей и четвертой групп соответственно. Перекисное окисление в плазме под влиянием ингаляций оксида азота через 60 сут после начала эксперимента оказалось выше показателя здоровых животных при 20 ppm NO на 9% ($p = 0,075$), при 50 ppm NO – на 29% ($p = 0,021$), при 100 ppm NO – на 41% ($p = 0,001$).

В эритроцитах по данным хемиллюминесценции выявлено статистически значимое снижение

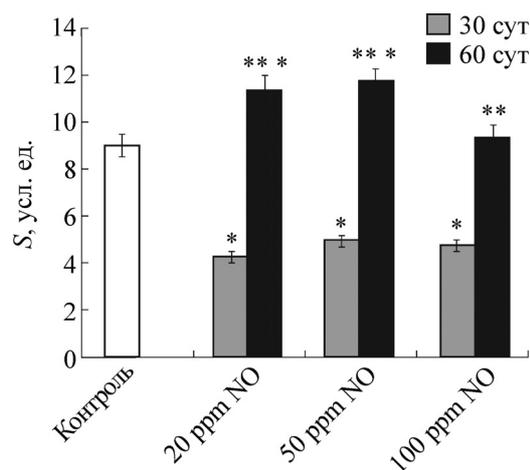


Рис. 2. Динамика изменения светосуммы хемиллюминесценции в эритроцитах крови крыс при хроническом воздействии оксида азота.

ПОЛ через 30 сут после применения всех используемых концентраций NO: при 20 ppm – на 52% ($p = 0,007$), при 50 ppm – на 45% ($p = 0,021$), при 100 ppm – на 47% ($p = 0,018$) по сравнению с контрольной группой крыс (рис. 2). Уменьшение интенсивности липопероксидации в эритроцитах под влиянием оксида азота свидетельствует о повышении резистентности мембран к воздействию перекиси водорода [17], 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 [4,21].

У животных пятой, шестой и седьмой групп, имевших восстановительный период после ингаляций оксида азота, отмечено повышение светосуммы хемиллюминесценции в эритроцитах при концентрации 20 ppm в 2,6 раза ($p = 0,001$), при 50 ppm – в 2,4 раза ($p < 0,001$), при 100 ppm – в 2 раза ($p < 0,001$) по сравнению с показателями крыс, получавших ингаляции NO на протяжении 30 сут. При этом параметр *S* спустя 60 сут после начала эксперимента по воздействию оксида азота оказался выше значений *S* здоровых животных при использовании 20 ppm NO на 26% ($p = 0,011$), при 50 ppm – на 30% ($p = 0,023$), при 100 ppm – на 4% ($p = 0,098$), что свидетельствует об интенсификации кислородзависимых процессов, обуславливающих свободнорадикальное окисление мембран эритроцитов.

Таким образом, длительное применение NO (30 сут) оказывает ингибирующее влияние на интенсивность ПОЛ в плазме и эритроцитах

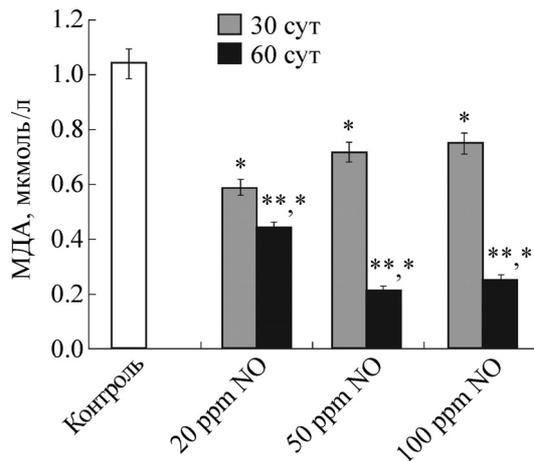


Рис. 3. Концентрация малонового диальдегида в плазме крови крыс при хроническом воздействии оксида азота.

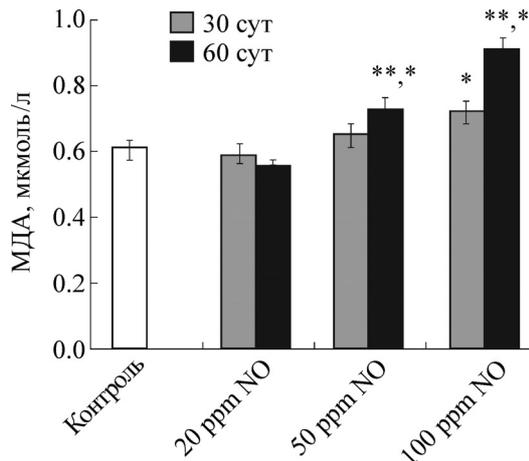


Рис. 4. Концентрация малонового диальдегида в эритроцитах крови крыс при хроническом воздействии оксида азота.

крови. Выявлено, что оксид азота обладает выраженными проокислительными свойствами, проявляющимися в отдаленные сроки после воздействия (спустя 60 сут после начала эксперимента), NO активирует свободно-радикальное окисление в плазме при использовании высоких концентраций (50 и 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 [1,5].

Снижение общего уровня проокислительного баланса на фоне длительного воздействия оксида азота подтверждали также данные определения промежуточного продукта ПОЛ – малонового диальдегида – в плазме: уровень МДА у животных второй, третьей и четвертой групп уменьшился при использовании NO в концентрации 20 ppm – на 43% ($p = 0,008$), при 50 ppm – на 31% ($p = 0,023$), при 100 ppm – на 28% ($p = 0,015$) по сравнению со здоровыми крысами (рис. 3). При этом отмечен рост содержания МДА в эритроцитах при ингаляционно-наружном применении оксида азота на протяжении 30 сут в концентрации 100 ppm на 19% ($p = 0,031$) по сравнению с контролем (рис. 4).

В восстановительном периоде после ингаляций оксида азота у животных пятой, шестой и седьмой групп концентрация МДА в плазме снизилась при использовании 20 ppm NO на

25% ($p = 0,040$), при 50 ppm – в 3,2 раза ($p = 0,002$), при 100 ppm – в 3,0 раза по сравнению с показателями крыс второй, третьей и четвертой групп соответственно, оказавшись ниже значений здоровых животных при 20 ppm в 2,3 раза ($p = 0,006$), при 50 ppm – в 4,7 раза ($p < 0,001$), при 100 ppm – в 4,0 раза ($p < 0,001$) (рис. 3). В эритроцитах уровень МДА вырос через 60 сут после начала воздействия при использовании 50 ppm на 12% ($p = 0,041$), при 100 ppm – на 25% ($p = 0,017$) по сравнению со показателями крыс, ингаляционно-наружно воздействованных 30 сут, превысив значения здоровых крыс при 50 ppm на 19% ($p = 0,039$), при 100 ppm NO – на 48% ($p = 0,025$) (рис. 4).

Выявленные изменения проокислительного 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 сут) привело к росту общей антиоксидантной активности плазмы крови при применении концентрации 20 ppm на 29% ($p = 0,011$), при использовании 50 ppm – на 8% ($p = 0,388$), при 100 ppm NO – на 4% ($p = 0,657$) по сравнению с показателями интактных животных (рис. 5).

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 [5,21], что привело к снижению светосуммы хемилюминесценции в плазме и эритроцитах через 30 сут после воздействия 20 ppm NO.

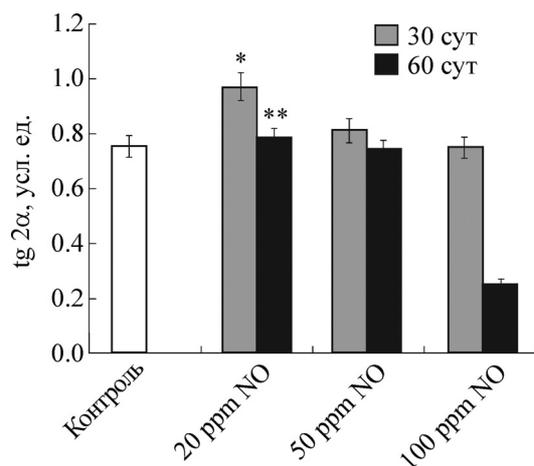


Рис. 5. Динамика изменения показателя tg2α в плазме крови крыс при хроническом воздействии оксида азота.

При этом на 60-е сутки эксперимента антиоксидантные резервы, оцениваемые по значению показателя tg2α, нормализовались: антиоксидантная активность плазмы крови при использовании 20 ppm NO снизилась на 19% ($p = 0,031$) по сравнению с 30-ю сутками.

Исследование удельной активности супероксиддисмутазы, фермента первой линии антиоксидантной защиты, выявило повышение активности СОД через 30 сут после ингаляционно-наружного воздействия NO в концентрации 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm на 8% ($p = 0,041$), 55% ($p = 0,038$) и 41% ($p = 0,012$) соответственно по сравнению с показателем интактных животных, что обеспечивает эффективную защиту клеточных структур от образующихся высокотоксичных кислородных радикалов (рис. 6). После восстановительного периода у крыс пятой, шестой и седьмой групп отмечены повышенные значения удельной активности СОД и по сравнению с показателями крыс, подвергнутых воздействию NO на протяжении 30 сут (при 20 ppm – на 68% ($p < 0,001$), при 50 ppm – на 15% ($p = 0,036$), при 100 ppm – на 46% ($p = 0,005$)), и по сравнению с контролем (при 20 ppm – на 81% ($p = 0,011$), при 50 ppm – на 78% ($p = 0,024$), при 100 ppm – в 2 раза ($p < 0,001$)).

В отдаленные сроки после применения оксида азота (спустя 60 сут после начала эксперимента) отмечено повышение антиоксидантных ресурсов эритроцитов, проявляющееся в увеличении удельной активности СОД. Характер влияния NO на различные биохимические и физиологические процессы определяется при взаимодействии NO с биомолекулами. NO тормозит процессы ПОЛ, препятствуя их распространению, что показано лишь на 30-е сутки

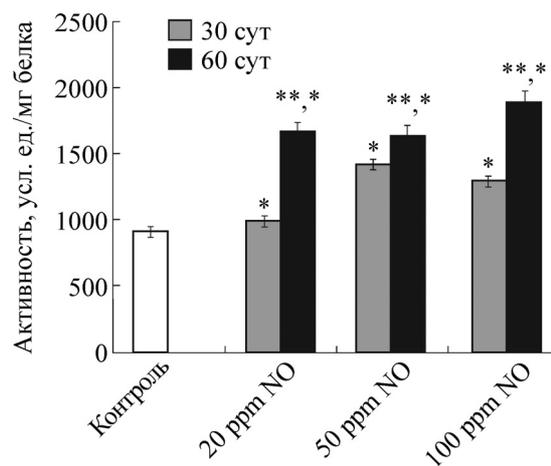


Рис. 6. Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах крови крыс при хроническом воздействии оксида азота.

после ингаляций. Мишенями прямого действия NO являются Cu и Zn, входящие в состав ферментов, в частности супероксиддисмутазы. NO обратимо связывается с гемовым железом гуанилатциклазы, циклооксигеназы, каталазы, липоксигеназ, NOS-аз, цитохрома P-450 и пероксидаз, цитохромов электрон-транспортной цепи митохондрий, а также с гемовым железом оксигемоглобина. Вследствие связывания NO с Fe^{2+} активность железосодержащих ферментов увеличивается [4]. Это создает условия для обрыва процессов перекисного окисления липидов.

Выявленные изменения прооксидантного статуса при длительном применении оксида азота (30 сут) по данным биохимиллюминесценции и концентрации МДА в плазме свидетельствовали об уменьшении окислительного потенциала на системном уровне. Спустя 60 сут отмечен компенсаторный рост перекисного окисления липидов в эритроцитах и плазме на фоне повышения активности супероксиддисмутазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, длительное применение оксида азота вызывает повышение фермента первого звена антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы эритроцитов крови через 30 сут после воздействия NO и в восстановительном периоде после отмены окислительных нагрузок NO (60 сут). Выявлено снижение интенсивности перекисного окисления липидов в плазме крови крыс по данным биохимиллюминесценции и по концентрации малонового диальдегида при ингаляционно-наружном применении оксида азота на протяжении 30 сут. Показано, что оптимальной дозой для ингаляционного применения оксида азота может быть 20 ppm, при исполь-

зовании которой отмечено повышение общей антиоксидантной активности через 30 сут после воздействия NO и нормализация перекисного окисления липидов в плазме (по данным биохемилюминесценции) и эритроцитах (по концентрации малонового диальдегида) после периода восстановления. Большие концентрации оксида азота (50 и 100 ppm) при длительном хроническом его применении инициировали процессы свободно-радикального окисления после отмены воздействия NO спустя 60 сут в эритроцитах (по уровню МДА) и плазме (по показателю светосуммы хемилюминесценции), проявляя при этом активирующее влияние на активность супероксиддисмутазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. А. Костюк и А. И. Потапович, *Биорадикалы и биоантиоксиданты* (БГУ, Минск, 2004).
2. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин и Н. К. Зенков, *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты* (Слово, М., 2006).
3. W. Droge, *Physiol. Rev.* **82** (1), 47 (2002).
4. В. А. Малахов, А. Н. Завгородняя, В. С. Лычко и др., *Проблема оксиду азоту в неврологии* (Видавництво СумДПУ им. А.С. Макаренка, Суми, 2009).
5. С. П. Калашников, А. Н. Маянский, П. П. Загоскин и Н. А. Маянский, *Нижегородский мед. журн.* **1**, 69 (1999).
6. В. И. Покровский и Н. А. Виноградов, *Терапевт. арх.* **77** (1), 82 (2005).
7. D. S. Bredt, *Mol. Pharmacol.* **63**, 1206 (2003).
8. C. R. Breatnach, F. Flanagan, A. James, et al., *Ir. Med. J.* **108** (9), 275 (2015).
9. A. Brücken, M. Derwall, C. Bleilevens, et al., *Crit. Care* **19**, 408 (2015).
10. N. A. Terpolilli, S. W. Kim, S. C. Thal, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33** (2), 311 (2013).
11. C. Charriaut-Marlangue, P. Bonnin, A. Gharib, et al., *Stroke* **43** (11), 3078 (2012).
12. H. Grasemann, T. Gonska, J. Avolio, et al., *J. Cyst. Fibros.* **14** (6), 727 (2015).
13. И. И. Павлюченко, Е. И. Ременякина, Ю. С. Панаенкова и И. В. Ваштак, *Фундаментальные исследования* **7**, 151 (2012).
14. O. Sitbon, F. Brenot, A. Denjean, et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151** (2), 384 (1995).
15. Н. Н. Каркищенко и С. В. Грачева, *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* (Профиль-2С, М., 2010).
16. С. Н. Буранов, В. И. Карелин, В. Д. Селемир и А. С. Ширшин, Пат. РФ № 2553290, Б.И., № 16, (2015).
17. Е. И. Кузьмина, С. В. Ермолин, А. Ф. Учугина и Н. С. Подгусков, *Нижегородский мед. журн.* **1**, 49, (1993).
18. M. Uchiyama and M. Mihara, *Anal. Biochem.* **86**, 271 (1978).
19. Т. В. Сирота, *Вопросы мед. химии* **45** (3), 109 (1999).
20. J. H. Waterborg and H. R. Matthews, *Methods Mol. Biol.* **32**, 1 (1994).
21. D. Pierini and N. S. Bryan, *Methods Mol. Biol.* **1208**, 63 (2015).

Features of Lipid Peroxidation and Antioxidant System of Blood under the Influence of Different Concentrations of Nitric Oxide in the Chronic Experiment

A.G. Soloveva, S.P. Peretyagin, and E.I. Kuzmina

Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Verhne-Volzhskaya nab. 18/1, Nizhny Novgorod, 603155 Russia

The paper presents the results of a study of oxidative metabolism of blood of intact animals subjected to prolonged exposure to nitric oxide at concentrations of 20, 50 and 100 ppm. The experiment was performed on Wistar rats. NO inhalation was performed within 30 days. The state of oxidative metabolism of blood was evaluated after inhalation and after a 30-day recovery period after discontinuation of the oxidative stress of NO. In plasma and erythrocytes the intensity of lipid peroxidation was studied using the method of induced biochemiluminescence and the level of malonic dialdehyde. In the hemolysate of erythrocytes the activity of superoxide dismutase was determined. It is established that the optimal dose of inhaled NO is 20 ppm, at this concentration a maximum increase in total antioxidant activity after 30 days and normalization of lipid peroxidation in the blood after the completion of the recovery period have been observed. High concentrations of nitric oxide (50 and 100 ppm) were also responsible for initiation of lipid peroxidation in erythrocytes and plasma after discontinuation of the oxidative stress of NO (after the completion of the recovery period) thus enhancing catalytic properties of superoxide dismutase.

Key words: nitric oxide, lipid peroxidation, malonic dialdehyde, superoxide dismutase