

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДЛИТЕЛЬНОГО КУРСА ИНГАЛЯЦИЙ ОКСИДА АЗОТА И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА КРИСТАЛЛОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС

© 2017 г. А.К. Маргусевич\* \*\*, А.А. Маргусевич\*\* \*\*\*, Л.К. Ковалева\*

\*Кировская государственная медицинская академия МЗ РФ, 610027, Киров, ул. К. Маркса, 112

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

\*\*\*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

E-mail: [cryst-mart@yandex.ru](mailto:cryst-mart@yandex.ru)

Поступила в редакцию 29.03.16 г.

После доработки 13.12.16 г.

Изучены особенности модификации кристаллогенных свойств сыворотки крови крыс при субхроническом воздействии ингаляций оксида азота и синглетного кислорода. Эксперимент выполнен на 50-ти половозрелых крысах-самцах линии Вистар, разделенных на пять равных по численности групп. Контрольная группа ( $n = 10$ ) включала животных, которым не производили никаких воздействий, кроме однократного получения образцов крови. Крысы основных (второй, третьей и четвертой) групп получали ежедневные ингаляции оксида азота в концентрации 20, 50 и 100 ppm соответственно на протяжении 30-ти суток. Крысам, вошедшим в пятую группу ( $n = 10$ ), в течение 30-ти суток ежедневно проводили ингаляции воздушного потока, поступающего от генератора синглетного кислорода. У животных основных групп забирали образцы крови из подъязычной вены сразу после завершения полного курса ингаляций (на 30-е сутки эксперимента) и в отдаленном периоде (на 60-е сутки эксперимента). Изучали кристаллогенную активность сыворотки крови животных. Основными визуаметрическими показателями, оцениваемыми в балльной шкале, служили кристаллизуемость, индекс структурности, степень деструкции фации и выраженность краевой зоны микропрепарата. Установлено, что проведение длительного курса ингаляций оксида азота (30 ежедневных процедур) обеспечивает модуляцию кристаллогенных свойств сыворотки крови, причем наиболее физиологичный ответ на воздействие имеет место при использовании минимальной концентрации агента (20 ppm). Применение более высоких доз NO не только приводит к существенному сдвигу кристаллогенной активности биожидкости сразу по завершении воздействия, но и затрудняет протекание восстановительных процессов. Продолжительный курс ингаляций синглетного кислорода (30 суток) не оказывает существенного негативного влияния на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс.

*Ключевые слова:* оксид азота, активные формы кислорода, синглетный кислород, кровь, кристаллогенные свойства, биокристалломика.

На протяжении последних трех десятилетий не угасает интерес исследователей и практикующих врачей к вопросам применения различных методов биорадикальной терапии, в том числе озонотерапии и NO-терапии [1–3]. При этом особенности химической активности оксида азота [4,5] и отсутствие других обоснованных методов его системного введения обусловили широкое использование ингаляций соединения с лечебной целью при респираторном дистресс-синдроме, легочной гипертензии и иной патологии у взрослых пациентов и детей [2,3,6,7]. В то же время токсикологические ас-

пекты данной медицинской технологии практически не раскрыты.

В предшествующих работах нами было показано, что влияние NO на различные физико-химические параметры изолированной крови человека *in vitro*, в том числе окислительный и энергетический метаболизм, состояние систем ферментной детоксикации, носит дозозависимый характер, а также определяется формой введения агента (свободной газообразной или депонированной) [8]. Это в полной мере относится к одному из интегральных индикаторов компонентного состава и свойств биологиче-

ских жидкостей – их кристаллогенным свойствам [9]. Установлено, что низкие дозы соединения, находящегося в свободном либо депонированном (в форме динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами), способствуют умеренному усилению структуризации сыворотки крови [9], тогда как высокие концентрации свободного NO (500–800 ppm) выражено угнетают ее [10], что сопровождается и другими негативными метаболическими сдвигами [8]. Показано, что в последнем случае образующиеся кристаллические элементы имеют признаки значительной деструкции, а в краевой зоне обнаруживается новая полоса, генез которой потенциально связан с нарастанием концентрации в плазме крови 3-нитротирозина [9,10] – известного маркера нитрозативного стресса [11]. Напротив, обработка биологической жидкости более низкими концентрация соединения (20–100 ppm) или введение в нее раствора динитрозильных комплексов железа не приводит к появлению указанной полосы [9]. С учетом этого предполагается, что кристаллогенная активность биологического субстрата способна выступать в качестве индикатора токсических изменений в нем. Это подтверждают и данные других исследователей [12,13].

Существенно меньше информации имеется относительно другой активной формы кислорода – синглетного кислорода, биологические эффекты которого при ингаляционном применении начали изучаться лишь недавно [15,16]. На основании ранее проведенных исследований было показано, что газовый поток от генератора синглетного кислорода стимулирует антиоксидантную систему крови и тканей крыс, а также оптимизирует промежуточное звено энергетического метаболизма [16]. Следует отметить, что эти данные касаются кратковременного курса применения ингаляций синглетного кислорода (ежедневно в течение десяти суток), тогда как влияние более длительного воздействия не рассматривалось.

На основании вышеперечисленного целью работы явилось изучение особенностей модификации кристаллогенных свойств сыворотки крови крыс при субхроническом воздействии ингаляций оксида азота и синглетного кислорода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 50-ти половозрелых крысах-самцах линии Вистар, разделенных на пять равных по численности групп. Контрольная группа ( $n = 10$ ) включала животных, которым не производили никаких воздействий, кроме однократного получения образцов крови. Крысы основных (второй, третьей и четвертой) групп получали ежедневные ингаляции оксида

азота в концентрации 20, 50 и 100 ppm соответственно на протяжении 30-ти суток. Крысам, вошедшим в пятую группу ( $n = 10$ ), в течение 30-ти суток ежедневно проводили ингаляции воздушного потока, поступающего от генератора синглетного кислорода. Продолжительность одной процедуры составляла 10 мин, скорость газового потока – 2 л/мин. Для проведения ингаляций животных (по одному) помещали в эксикатор, в котором производили подачу и отведение газовой смеси. Синтез NO-содержащей воздушной смеси осуществляли с помощью экспериментального генератора, разработанного в РФЯЦ–ВНИИЭФ (Саров, Нижегородская обл.) [14]. Для создания газовой смеси, включающей синглетный кислород, использовали аппарат «Airnergy Professional Plus» (Германия) (мощность генератора – 100%).

У животных основных групп забирали образцы крови из подязычной вены сразу после завершения полного курса ингаляций (на 30-е сутки эксперимента) и в отдаленном периоде (на 60-е сутки эксперимента). В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия в соотношении с кровью 1 : 4. Для получения сыворотки крови производили центрифугирование всех образцов при 2500 g в течение 15 мин (центрифуга Multifuge 1S-R, Heraeus, США). Затем 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 [9,10]. Высушенные микропрепараты оценивали морфологически (путем описания особенностей структуризации высушенного образца биологической жидкости) и визуаметрически (с применением собственной системы параметров) [9,10]. Основными визуаметрическими показателями, оцениваемыми по балльной шкале, служили кристаллизруемость (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. Оценку производили по трем параллельно получаемым фациям, по которым суммарно вычисляли значения показателей. Анализу подвергали всю площадь фаций, фотофиксацию образцов осуществляли с помощью комплекса «Levenhuk».

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

При сравнительной оценке собственного кристаллообразования сыворотки крови крыс контрольной группы и животных, получавших курс ингаляций синглетного кислорода, было установлено, что в целом характер структуризации биологической жидкости после продолжительного курса ингаляций синглетного кислорода не претерпевает существенных изменений. Общая кристаллоскопическая картина сохраняет регулярность, четко выделяются отдельные зоны фации (рис. 1 и 2). При этом центральная зона содержит лишь единичные кристаллические элементы с минимальными признаками разрушения, а в краевой зоне преимущественно присутствуют радиальные «разломы» текстуры, распределенные достаточно равномерно.

Проведенные исследования позволили установить, что характер действия длительного курса ингаляций оксида азота отличен от присущего для применения синглетного кислорода и существенно зависит от дозы воздействующего агента (рис. 2). Следует отметить, что во всех случаях были применены относительно низкие концентрации NO (20, 50 или 100 ppm), для которых в предшествующих экспериментах *in vitro* были продемонстрированы позитивные эффекты как в абсолютных значениях, так и по сравнению с высокими дозами соединения (800 ppm) [9,10]. Несмотря на это, имела место дозозависимость отслеживаемого влияния. Так, сразу после завершения тридцатидневного курса ингаляций наиболее низкой из использованных концентраций NO (20 ppm) кристаллоскопическая картина высушенного образца сыворотки крови крыс включала в центральной зоне немногочисленные одиночно-кристаллические элементы с минимальными признаками деструкции, а в краевой – регулярные центростремительные разломы (рис. 2). Подобный характер дегидратационной структуризации практически полностью соответствовал картине, наблюдаемой у животных контрольной группы. Единственной особенностью кристаллограмм биожидкости крыс, получивших курс ингаляций 20 ppm NO, служило формирование небольшого количества дополнительных коротких разнонаправленных разломов, вариабельно присутствующих по всей текстуре образца.

Увеличение действующей концентрации соединения до 50 ppm приводило по завершении курса процедур к умеренному повышению кристаллиземости в центральной зоне фации, а

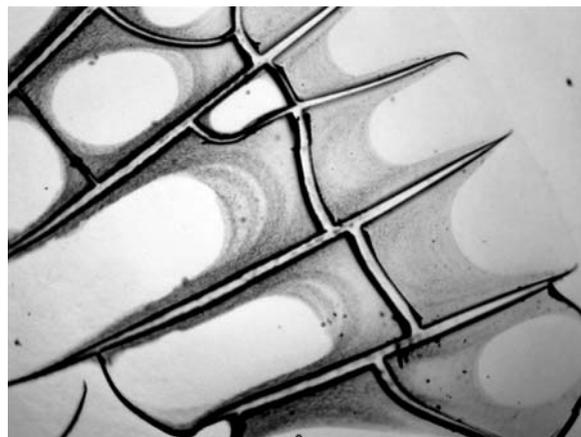
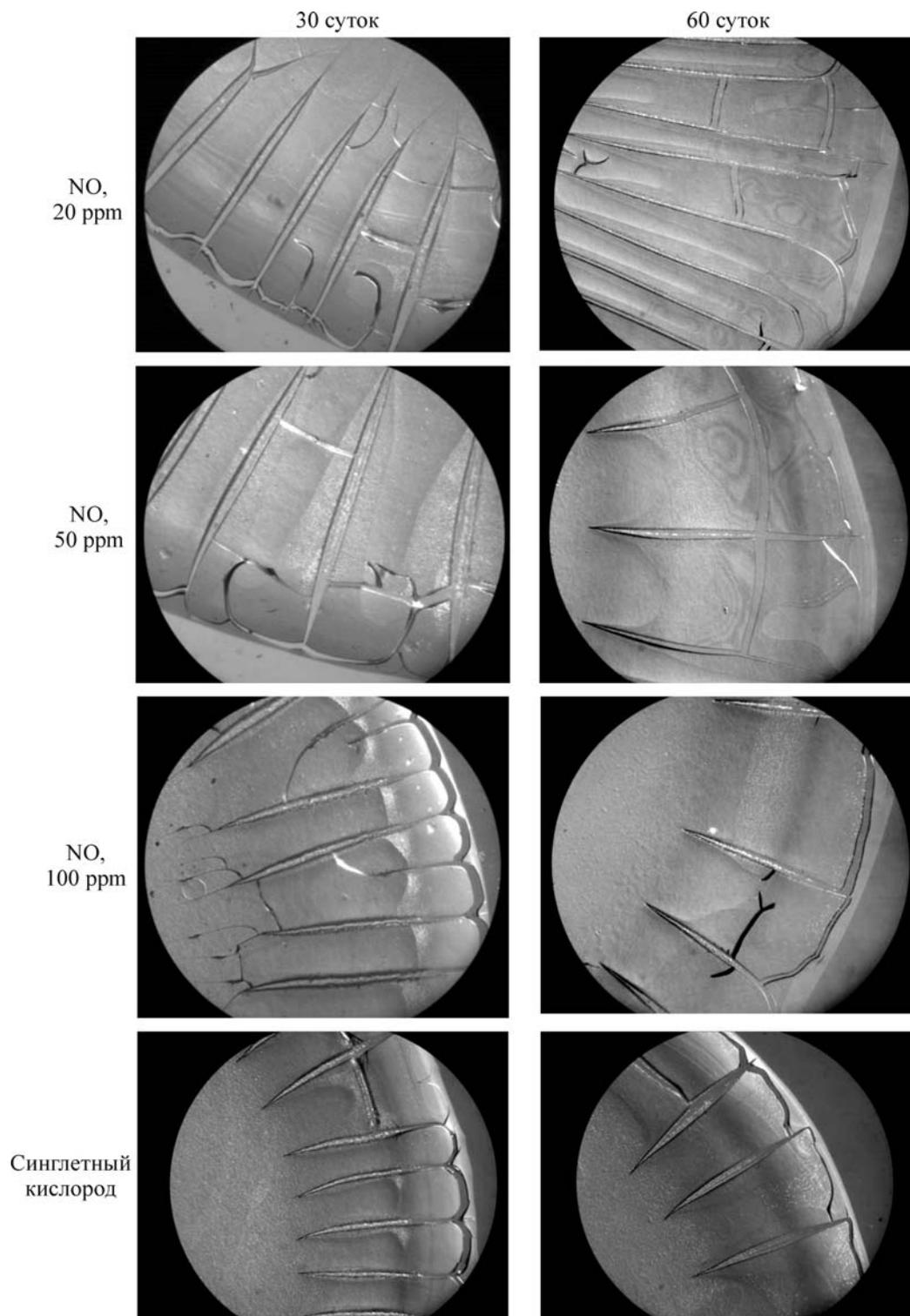


Рис. 1. Кристаллоскопическая картина сыворотки крови здоровых крыс.

также способствовало незначительной хаотизации структуры разломов краевой зоны. Это косвенно свидетельствует об изменении белкового профиля сыворотки крови животных при рассматриваемом воздействии.

Наиболее высокая среди примененных концентрация оксида азота (100 ppm) обеспечивала более глубокие преобразования дегидратационной структуризации биологической жидкости. В частности, в центральной зоне образца наблюдали значительное повышение кристаллиземости с появлением единичных дендритных кристаллов. В краевой зоне при сохранении регулярности и плотности разломов отмечали их активное ветвление и распространение на промежуточную зону кристаллоскопической фации. Кроме того, регистрировали отграничение периферической части от остального высушенного образца с формированием специфического «краевого пояса». Эти изменения косвенно указывают на наличие существенного белкового дисбаланса в изучаемой биологической жидкости, так как краевая зона фации формируется протеиновым компонентом биосреды и характеризует его состояние [18,20,21].

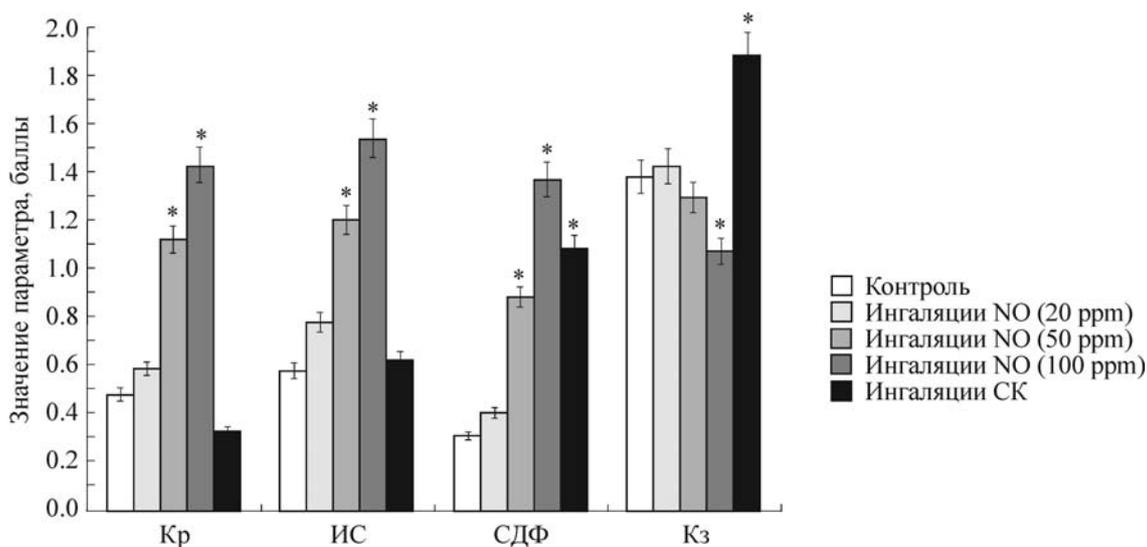
Приведенные характеристики проявляются и в результатах критериального анализа кристаллоскопических фаций сыворотки крови крыс сформированных групп (рис. 3). По сравнению с интактными животными у крыс, получавших ингаляции синглетного кислорода, обнаруживали лишь умеренное снижение индекса структурности в сочетании с относительным сужением краевой зоны микропрепарата и увеличением степени деструкции кристаллических элементов высушенных образцов ( $p < 0,05$  для всех указанных показателей). Следует отметить, что, несмотря на наличие значимого увеличения степени деструкции, она достигает



**Рис. 2.** Кристаллоскопическая картина сыворотки крови крыс в динамике ингаляций NO и синглетного кислорода.

лишь значения в 1 балл, что дополнительно свидетельствует об отсутствии «патологической» трансформации кристаллогенеза биосреды при данном воздействии.

Указанные сдвиги кристаллогенной активности сыворотки крови крыс, возникающие после проведения курса ингаляций NO, также подтверждаются результатами параметрической



**Рис. 3.** Результат параметрической оценки кристаллоскопических фаций сыворотки крови крыс после завершения курса ингаляций оксида азота и синглетного кислорода (30-е сутки эксперимента; \* – статистическая значимость различий относительно уровня контрольной группы  $p < 0,05$ ; СК – синглетный кислород, Кр – кристаллизуемость, ИС – индекс структурности, СДФ – степень деструкции фации, Кз – выраженность краевой зоны фации).

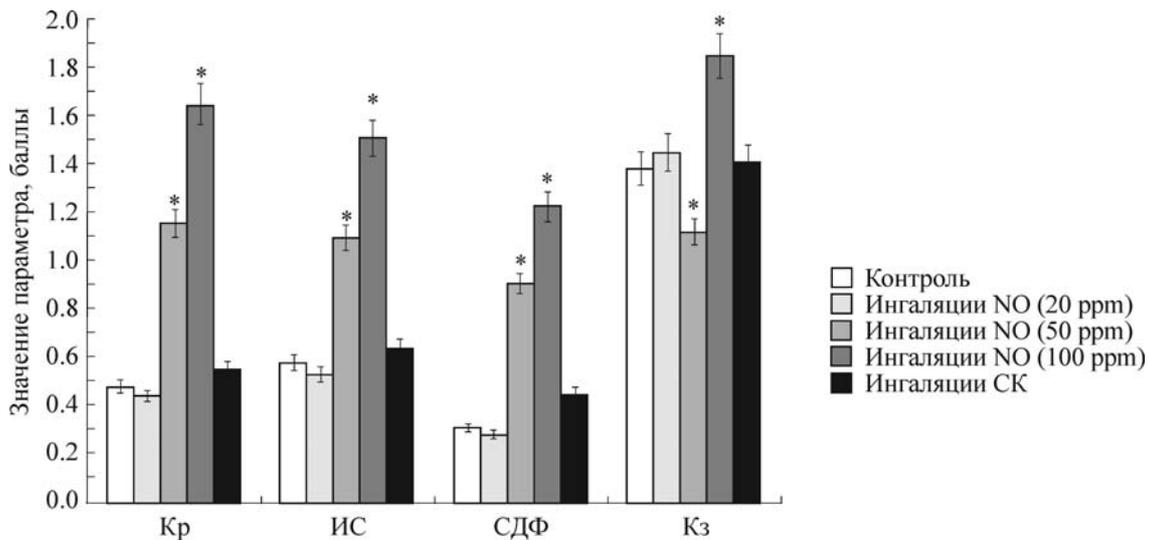
оценки этих фаций (рис. 3). Так, по количественному показателю активности структуризации – кристаллизуемости – у животных, получавших оксид азота в наименьшей концентрации (20 ppm), не обнаруживали значимых различий с интактными крысами. Применение более высоких концентраций соединения демонстрирует отчетливую тенденцию к дозозависимому увеличению кристаллизуемости, причем уже ингаляции 50 ppm NO, как и максимальная из использованных доз (100 ppm), обеспечивают пропорциональное нарастание уровня показателя ( $p < 0,05$  для обоих случаев). Аналогичные тенденции имели место и для индекса структурности, отображающего сложность построения образуемых кристаллических элементов высушенного образца, а также степени деструкции фации. Последняя достигает уровня умеренной деструкции по завершении курса ингаляций 50 ppm оксида азота, тогда как при длительном действии соединения в концентрации 100 ppm наблюдали более выраженное увеличение параметра ( $p < 0,05$  для обоих случаев).

Сформированность краевой зоны фации оказалась показателем, наименее чувствительным к рассматриваемому воздействию (рис. 3). Так, сразу по завершении курса ингаляций не регистрировали значимых отклонений по данному параметру при использовании 20 и 50 ppm NO. В то же время наиболее высокая концентрация оксида азота уменьшает выраженность краевой белковой зоны, что потенциально связано с увеличением фракции нитрозилированных белков плазмы.

Вторым компонентом анализа явилась оценка степени и скорости восстановления кристаллогенной активности изучаемой биосреды, для чего была выбрана вторая контрольная точка – через 30 суток после завершения курса ингаляций (т.е. на 60-е сутки эксперимента). Установлено, что в этот период морфология высушенных образцов сыворотки крови животных, получавших газовую смесь с концентрацией оксида азота 20 ppm, полностью соответствовала характерной для здоровых крыс (рис. 1 и 2). Напротив, более высокие дозы соединения не приводили к полноценному восстановлению кристаллоскопической картины биологической жидкости. В частности, при применении 50 ppm NO краевая зона фации уменьшалась, в ней происходила нормализация структуры разломов, но наблюдались выраженные неоднородности текстур. При этом сохранялась повышенная кристаллогенная активность биосреды.

Наиболее неблагоприятной была картина кристаллизации сыворотки крови крыс, которым проводили ингаляции оксида азота в концентрации 100 ppm (рис. 2). В фациях биожидкости этих животных отмечали формирование радиальных, нерегулярных разломов, причем сама краевая зона была «размыта», включала несколько полос. Это свидетельствует о гетерогенности белкового профиля биосреды и, потенциально, о модификации белков в условиях NO-воздействия.

С учетом того, что сразу по завершении курса ингаляций синглетного кислорода обнаруживали лишь минимальные отличия от фаций сыворотки крови, полученной от крыс интакт-



**Рис. 4.** Результат параметрической оценки кристаллоскопических фаций сыворотки крови крыс в восстановительном периоде после завершения курса ингаляций оксида азота и синглетного кислорода (60-е сутки эксперимента; обозначения – аналогично рис. 2).

ной группы, на 60-е сутки эксперимента анализировали лишь потенциальные отдаленные метаболические эффекты, которые могли проявиться в этот период. Согласно нашим данным, они выявлены не были, ко второй контрольной точке исследования исчезали и указанные минимальные сдвиги относительно физиологического кристаллостаза (рис. 2).

Приведенные тенденции полностью подтверждаются результатами параметрического описания фаций сыворотки крови (рис. 4). Выявлено, что на 60-е сутки эксперимента, характеризующие восстановительный период, ни один из показателей не отличался значимо от уровня интактных животных. С другой стороны, повышение концентрации соединения до 50 или 100 ppm способствует сохранению всех изучаемых параметров на повышенных цифрах по сравнению с крысами, не подвергавшимися воздействию оксида азота ( $p < 0,05$ ), причем выраженность отклонений отчетливо дозозависима.

Кроме того, критериальный анализ полностью нивелировал значимые отличия кристаллограмм сыворотки крови крыс относительно интактных животных (рис. 4). Выявленное «мягкое» влияние длительного (30 суток) курса ингаляций синглетного кислорода на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс полностью соответствуют эффекту данного воздействия на основную «точку приложения» рассматриваемого биорадикала – процессы липопероксидации [15]. Это подтверждено нами в ранее проведенных исследованиях, касающихся особенностей реакции про- и антиоксидантных систем крови и тканей на ингаляции изучаемой

активной формы кислорода [16]. Кроме того, дополнительной молекулярной «мишенью» для кислородных радикалов могут выступать белковые макромолекулы, способные к окислительной модификации [15,17] и одновременно играющие значительную роль в формировании кристаллоскопической картины биологической жидкости [17–21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что проведение длительного курса ингаляций оксида азота обеспечивает модуляцию кристаллогенных свойств сыворотки крови, причем наиболее физиологичный ответ на воздействие имеет место при использовании минимальной концентрации агента (20 ppm). В этом случае наблюдали минимальное отклонение кристаллоскопической картины от характерной для интактных животных и полноценное ее восстановление через месяц после завершения курса. Напротив, применение более высоких доз NO не только приводит к существенному сдвигу кристаллогенной активности биожидкости сразу по завершении воздействия, но и затрудняет протекание восстановительных процессов. Следует отметить, что данная модификация касается как кристаллической части картины, так и структуры краевой белковой ее зоны.

Напротив, даже продолжительный курс ингаляций синглетного кислорода (30 суток) не оказывает существенного негативного влияния на кристаллогенные свойства сыворотки крови крыс, что может косвенно свидетельствовать о

низкой биотоксичности этого физико-химического агента.

Исследование проведено в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых ученых-докторов наук (грант МД-7256.2015.7).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. П. Перетягин, А. А. Стручков, А. К. Мартусевич и др., *Скорая медицинская помощь* **12** (3), 39 (2011).
2. J. P. Kincella, *New England J.* **355**, 354 (2006).
3. P. Kumar, et al., *Pediatrics* **133** (1), 164 (2014).
4. А. Ф. Ванин, *Вестн. РАМН* **4**, 3 (2000).
5. В. Г. Граник и Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств* (Вузовская книга, Москва, 2004).
6. D. J. Mathisen, E. Y. Kuo, C. Hahn, et al., *Ann. Thor. Surg.* **66**, 1894 (1998).
7. M. J. Ricciardi, B. P. Knight, F. J. Martinez, and M. Rubenfire, *J. Amer. College of Cardiology* **32**, 1068 (1998).
8. А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева и С. П. Перетягин, *Соврем. технологии в медицине* **5** (4), 33 (2013).
9. А. К. Мартусевич, Л. К. Ковалева и А. В. Давыдюк, *Биофизика* **61** (2), 345 (2016).
10. А. К. Мартусевич и С. П. Перетягин, *Биофизика* **58** (6), 1038 (2013).
11. A. van der Vliet, et al., *J. Biol. Chem.* **272**, 7617 (1997).
12. И. П. Громова, *Гигиена и санитария*, № 2, 66 (2005).
13. А. А. Ющенко, А. Д. Даудова, А. К. Аюпова и Н. Г. Урляпова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, № 7, 113 (2004).
14. В. И. Карелин, С. Н. Буранов, О. А. Пименов и др., *Медиаль*, № 4, 46 (2013).
15. В. А. Костюк и А. И. Потапович, *Биорадикалы и биоантиоксиданты* (Минск, 2004).
16. А. А. Мартусевич, А. К. Мартусевич и С. П. Перетягин, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **99** (9), 1057 (2013).
17. Е. Г. Рапис, *Журн. техн. физики* **74** (4), 117 (2004).
18. В. Н. Кидалов, А. А. Хадарцев и Г. Н. Якушина, *Вестн. новых мед. технологий* **11** (1–2), 23 (2004).
19. Ю. Ю. Тарасевич, *Успехи физ. наук* **174** (7), 779 (2004).
20. В. Н. Шабалин и С. Н. Шатохина *Морфология биологических жидкостей человека* (Хризопраз, Москва, 2001).
21. Т. А. Яхно и др., *Журн. техн. физики* **74** (8), 100 (2004).

## Comparative Estimation of Influence of Prolonged Course of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Inhalations on Crystallogenic Properties of Rat Blood Serum

A.K. Martusevich\* \*\*, A.A. Martusevich\*\* \*\*\*, and L.K. Kovaleva\*

\*Kirov State Medical Academy, ul. K. Marksa 112, Kirov, 610027 Russia

\*\*Volga Federal Medical Research Center, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Verhne-Voljskaya nab. 18, Nizhni Novgorod, 603155 Russia

\*\*\*National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizhni Novgorod, 603950 Russia

The aim of this work was a study of modification of crystallization of rats blood serum at prolonged course of inhalations of nitric oxide or singlet oxygen. Experiments were executed on 50 Wistar rats, divided into 5 equal groups. Control group ( $n = 10$ ) was intact (no any manipulations, excluding one-time drawing blood). Rats of second, third and fourth groups got daily inhalations of nitric oxide (20, 50 and 100 ppm, respectively) during 30 days. Animals of fifth group ( $n = 10$ ) got a similar course of inhalations of singlet oxygen for 30 days. We received blood samples from rats of all main groups after full course of inhalations (by the 30<sup>th</sup> day of an experiment) and in restorative period (by the 60<sup>th</sup> day of the experiment). Crystallogenic activity of all blood specimens was studied. Main parameters for dried specimens' estimation were crystallizability, structure index, facia destruction degree and clarity of marginal zone. It was found that prolonged course of NO inhalations (30 daily procedures) induced a modulation of crystallogenic properties of rats' blood serum, but most optimal response was registered for minimal concentration of nitric oxide (20 ppm). Higher concentrations of NO led not only to formation of more negative changes in blood serum crystallization after the end of the course but hinder reduction processes. Prolonged course of singlet oxygen inhalations (30 days) does not cause a considerable negative effect on crystallogenic properties of rats' blood serum.

*Keywords: nitric oxide, reactive oxygen species, singlet oxygen, blood, crystallogenic properties, biocrystallogenic*