

## ЛАЗЕРНАЯ ДОППЛЕРОМЕТРИЯ В ОЦЕНКЕ РЕАКЦИИ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЕ ИНГАЛЯЦИОННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ОКСИДА АЗОТА

© 2017 г. А.К. Маргусевич\* \*\*, П.В. Перетягин\*,  
А.А. Маргусевич\*\*\*, С.П. Перетягин\*\*

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

\*\*Ассоциация российских озонотерапевтов, 603089, Нижний Новгород, ул. Б. Панина, 9

\*\*\*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 14.02.17 г.

Оценено влияние продолжительного курса ингаляций оксида азота на состояние микроциркуляции крови в сосудах кожи у здоровых крыс. Эксперимент выполнен на 40 половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Первая группа животных ( $n = 10$ ) являлась контрольной, с ними не проводили манипуляций. Животные второй–четвертой групп на протяжении 30 суток получали ежедневные ингаляции оксида азота (концентрация соединения в газовом потоке – 20, 50 и 100 ppm для указанных групп соответственно). По завершении полного курса воздействий у животных всех основных групп изучали состояние микроциркуляции. Оценочными параметрами являлись показатель микроциркуляции; амплитуда основных регуляторных факторов (эндотелиального, нейрогенного, миогенного, дыхательного и сердечного), а также показатель шунтирования. Проведенные исследования позволили установить, что при длительном ингаляционном применении (30 суток) монооксид азота оказывает дозозависимое действие на микроциркуляцию, причем наиболее оптимален ответ на использование низкой концентрации соединения (20 ppm). Этот эффект обеспечивается как динамикой общей интенсивности кровотока по микрососудам, так и относительной активностью участия в ее функционировании регуляторных механизмов.

*Ключевые слова:* оксид азота, субхроническая токсичность, микроциркуляция, лазерная доплеровская флоуметрия.

Общеизвестны многочисленные вазотропные эффекты монооксида азота (NO), реализующиеся преимущественно в эндотелии сосудов [1–3]. В частности, лауреатом Нобелевской премии Л. Игнарро была показана идентичность эндотелиального релаксирующего фактора и NO [4]. В настоящее время раскрыты многочисленные сигнальные и регуляторные молекулярные каскады, в которых принимает непосредственное или опосредованное участие рассматриваемое соединение [1,5,6], благодаря чему оксиду азота отводятся превалирующие позиции в ряду известных газомедиаторов (относительно CO и H<sub>2</sub>S) [5]. При этом следует отметить, что большинство работ, подтверждающих приведенные закономерности, выполнены в условиях *in vitro* либо *ex vivo* (на отдельных клетках, клеточных культурах или изолированных полосках сосудов) [6].

Слабо изучены эффекты экзогенного оксида азота, в отличие от его эндогенно функционирующего пула. Кроме того, основное внимание исследователей привлекает NO, генерируемый специфическим ферментом – NO-синтазой из L-аргинина [7,8], тогда как неферментный путь образования данного соединения или его высвобождение из депо зачастую игнорируется. В связи с этим обстоятельством абсолютное большинство публикаций, связанных с экзогенной коррекцией NO-метаболизма, основаны на использовании либо специфических блокаторов фермента (L-NAME, L-NNA и других [8]), либо субстрата последнего (L-аргинина [8]) или его синтетических доноров (нитропруссид натрия [9]).

В то же время в клинической практике получает распространение ингаляционная NO-терапия, согласно ряду отечественных и зарубежных работ оказывающая благоприятное действие при различной патологии бронхоле-

точной системы у взрослых людей и детей, в том числе новорожденных [10–12]. При этом не до конца раскрыты механизмы этого эффекта, а сведения относительно системного действия указанной медицинской технологии практически отсутствуют.

В наших предшествующих исследованиях показано, что краткосрочный курс ингаляций оксида азота здоровым крысам способствует умеренной стимуляции процессов липопероксидации в плазме крови животных [13,14], которая может иметь адаптивное значение, а также активации энергетического метаболизма эритроцитов [13–15]. С другой стороны, отсутствуют данные относительно состояния одной из основных клеточно-тканевых мишеней действия NO – эндотелия сосудов.

В настоящее время существует информативный метод оценки кровотока по сосудам малого диаметра – лазерная доплеровская флуометрия [16], представляющая информацию как об интенсивности микроциркуляции в целом, так и об участии в ее обеспечении основных регуляторных факторов [16,17].

В связи с этим целью данного исследования явилась оценка влияния продолжительного курса ингаляций оксида азота на состояние микроциркуляции крови в сосудах кожи у здоровых крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 40 половозрелых крысах-самцах линии Вистар, разделенных на четыре группы равной численности. Первая группа животных ( $n = 10$ ) являлась контрольной, с ними не проводили никаких манипуляций, кроме однократной регистрации состояния микроциркуляции. Животные второй–четвертой (основных) групп на протяжении 30 суток получали ежедневные ингаляции оксида азота (концентрация соединения в газовом потоке – 20, 50 и 100 ppm для указанных групп соответственно). Продолжительность воздействия составляла 10 мин, скорость потока газовой смеси – 2 л/мин. Синтез NO-содержащей воздушной смеси осуществляли с помощью экспериментального генератора, разработанного в РФЯЦ-ВНИИЭФ (Саров, Нижегородская обл.) [18]. Для проведения ингаляций крыс (по одной) помещали в эксикатор, через который осуществляли продувание газового потока с необходимой концентрацией оксида азота.

По завершении полного курса воздействий у животных всех основных групп изучали состояние микроциркуляции. Использовали программно-аппаратный комплекс «ЛАКК-М» (НПО «ЛАЗМА», Россия) [16]. Основными оценочными параметрами являлись показатель микроциркуляции, интегрально характеризую-

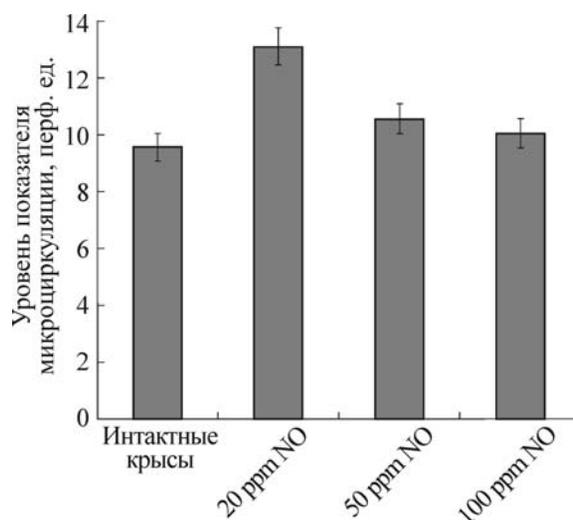


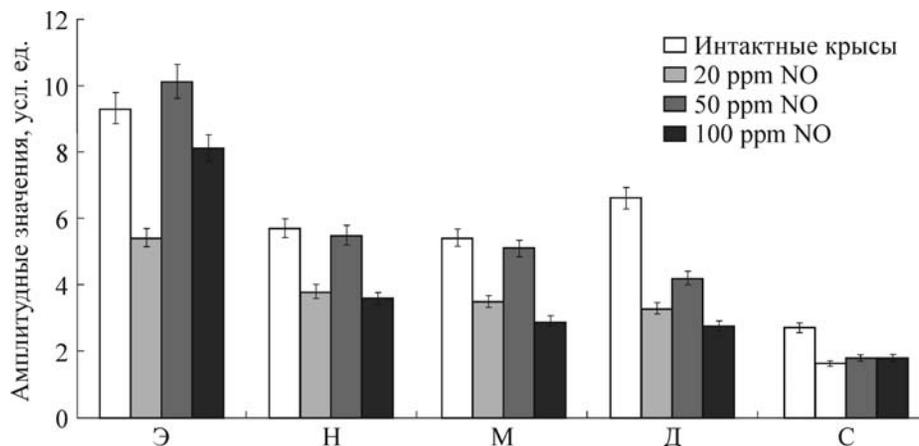
Рис. 1. Уровень показателя микроциркуляции у интактных и получавших ингаляции оксида азота крыс.

щий интенсивность кровотока по сосудам микроциркуляторного русла тестируемой области; амплитуда основных регуляторных факторов (эндотелиального, нейрогенного, миогенного, дыхательного и сердечного), а также показатель шунтирования [16]. Запись доплерометрического сигнала осуществляли на протяжении 3 мин, для анализа роли отдельных компонентов регуляции использовали оценку амплитудно-частотного спектра с учетом границ частотных диапазонов, уточненных для крыс [17,19]. Перед обследованием животных наркотизировали (комбинация препаратов «золетил» и «ксила»).

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

Установлено, что продолжительный курс ингаляций NO оказывает модулирующее влияние на состояние микроциркуляции крови в сосудах кожи крыс. При этом эффект действия ингаляций NO находится в обратной зависимости от концентрации изучаемого агента во вдыхаемом воздухе (рис. 1). Так, по показателю микроциркуляции – интегральному показателю, характеризующему интенсивность кровотока по микрососудам кожи, – наиболее существенное повышение ее уровня зарегистрировано при использовании минимальной концентрации окси-



**Рис. 2.** Амплитудные значения компонентов регуляции состояния микроциркуляции крови в сосудах кожи интактных и получавших ингаляции оксида азота крыс (Э – эндотелиальный компонент, Н – нейрогенный компонент, М – миогенный компонент, Д – дыхательный компонент, С – сердечный компонент).

да азота, равной 20 ppm (+36% по сравнению со значением, характерным для крыс контрольной группы;  $p < 0,01$ ). Применение более высоких концентраций соединения (50 и 100 ppm) дозозависимо снижало выраженность стимулирующего эффекта в отношении показателя микроциркуляции, причем эта тенденция сохраняет статистическую значимость лишь для 50 ppm оксида азота ( $p < 0,05$ ), тогда как при использовании наиболее высокой концентрации агента показатель микроциркуляции не отличался от характерного для интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Также нами проведена оценка роли отдельных факторов регуляции микроциркуляции в формировании текущей интенсивности кровотока по сосудам малого диаметра (рис. 2). На ее основании выявлено существенное превалирование вклада эндотелиального компонента над остальными, наблюдаемое у животных всех основных групп, однако выраженность данного эффекта неодинакова. Наиболее сбалансированной является реакция компонентов регуляции микроциркуляции на ингаляционное применение минимальной концентрации NO. В этом случае увеличение амплитудного значения эндотелиального фактора сопровождается менее существенным, но сопоставимым по величине прироста нарастанием роли других факторов, прежде всего «внутренних» (нейрогенный и миогенный). Напротив, ингаляции воздушного потока, содержащего более высокие концентрации соединения (50 и 100 ppm), обеспечивает формирование регуляторного дисбаланса в отношении микроциркуляции. В частности, применение средней концентрации оксида азота приводит к практически двукратному увеличению амплитуды эндотелиальных колебаний по сравнению с выявленной для 20 ppm NO ( $p < 0,01$ ). Остальные регуляторные факторы в этом

случае играют существенно меньшую роль, причем имело место относительное нарастание значимости дыхательного фактора, относящегося к «внешнему» контуру регуляции состояния микроциркуляторного русла [16].

Максимальная из изученных концентрация ингалируемого оксида азота (100 ppm), не обеспечивающая значимой интенсификации кровотока по микрососудам (по показателю микроциркуляции), способствовала относительному угнетению большинства факторов регуляции, кроме эндотелиального. Последний, демонстрируя несколько повышенные значения по сравнению с минимальной концентрацией NO, оказывается ниже как уровня, характерного для интактных животных, так и крыс, получавших ингаляции 50 ppm оксида азота ( $p < 0,05$  для обоих случаев).

На этом фоне транспортная функция крови была оптимально обеспечена при дозах, создаваемых концентрациями NO 20 и 50 ppm (рис. 3), поскольку последние обеспечивали адекватный нутритивный микрокровоток: показатель шунтирования в этих случаях составлял 106 и 105% от физиологического уровня соответственно. Напротив, ингаляции наиболее высокой из изученных концентраций оксида азота (100 ppm) способствовали существенному повышению показателя шунтирования (на 30% по сравнению со значениями, характерными для животных интактной группы;  $p < 0,05$ ), что свидетельствовало об увеличении сброса крови в обход микроциркуляторного русла и формировании предпосылок для развития «синдрома обкрадывания» [16,19]. Последнее обстоятельство негативно характеризует действие данной концентрации соединения на локальную гемодинамику.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами экспериментальные данные указывают на то, что в механизмах поддержания микрокровотока при использовании низких концентраций NO (20 ppm) значимую регуляторную роль играла, по-видимому, заместительная роль этой молекулы в самом сосудистом русле [1,2,19,20]. Об этом свидетельствует уровень эндотелиального компонента регуляции кровотока по микрососудам, косвенно указывающий на активность продукции оксида азота эндотелиоцитами и существенно снижающийся после курса ингаляций данного соединения. В то же время, учитывая предельно малую продолжительность жизни NO в свободном состоянии (менее 4 с [1,7,8]), мы предполагаем, что поступающий в период проведения процедуры оксид азота включается в депонированный пул, представленный в первую очередь динитрозильными комплексами железа с различными лигандами и S-нитрозотиолами [1,20]. В дальнейшем происходит постепенное высвобождение соединения из состава последних, которое по механизму обратной связи способно ингибировать его ферментативное образование эндотелиальной NO-синтазой [5] и обеспечивает формирование обнаруженных в отношении локальной гемодинамики эффектов. Относительная стабильность указанных физиологических депо оксида азота и позволяет фиксировать отсроченное действие ингаляций NO, в том числе реализующееся по завершении 30-дневного курса его применения.

Следует отметить, что приведенная схема оказалась характерной только для минимальной концентрации оксида азота (20 ppm), тогда как более высокие дозы (50 и 100 ppm) соединения вызывали резкий прирост активности эндотелиального фактора регуляции (на 91 и 73% соответственно;  $p < 0,05$ ). Активность других регуляторных факторов фиксировалась на достоверно более низком уровне – менее 50% от уровня интактных крыс. Кроме того, при применении средней концентрации NO (50 ppm) также более выраженной была активность нейрогенных и миогенных колебаний (+19 и +18% относительно здоровых животных;  $p < 0,05$ ). По нашему мнению, эти процессы обусловлены поступлением избыточного количества NO в кровотоки с невозможностью его полной фиксации в виде депонирующих соединений и активацией эндотелиальной продукции образующимся при этом пероксинитритом и сопутствующими активными формами кислорода [2]. Это может способствовать формированию дисрегуляторных нарушений микроциркуляции, о чем свидетельствует тот факт, что использование высоких концентраций NO (100 ppm), сохраняя микрокровоток на уровне, установлен-

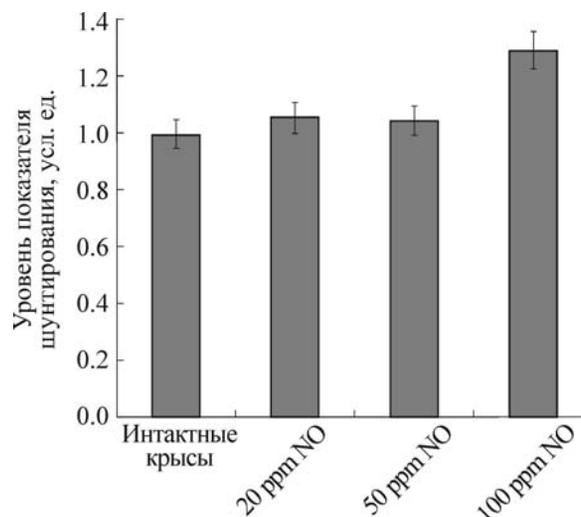


Рис. 3. Уровень показателя шунтирования у интактных и получавших ингаляции оксида азота крыс.

ном для интактных животных, не обеспечивало эффективной доставки крови на периферию – показатель шунтирования при этом был значимо больше 1,0 ( $p < 0,05$ ). На этом основании можно говорить о физиологическом характере ответа на ингаляции только в отношении применения минимальной концентрации изучаемого агента (20 ppm).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить, что при длительном ингаляционном применении (30 суток) монооксид азота оказывает дозозависимое действие на микроциркуляцию, причем наиболее оптимален ответ на использование низкой концентрации соединения (20 ppm). Этот эффект обеспечивается как динамикой общей интенсивности кровотока по микрососудам, так и относительной активностью участия в ее функционировании регуляторных механизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ф. Ванин, Е. Б. Манухина, И. Ю. Малышев и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **12**, 626 (2006).
2. А. Ф. Ванин, Е. И. Чазов, В. И. Капелько и др., Кардиол. вестн. **2**, 31 (2007).
3. F. Murad, Neurotransmissions **10**, 1 (1994).
4. L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga, and K. S. Wood, Circ. Res. **61**, 866 (1987).
5. С. В. Гусакова, И. В. Ковалев, Л. В. Смаглий и др., Успехи физиол. наук **46** (4), 53 (2015).

6. М. Б. Баскаков, С. В. Гусакова, А. С. Желудева и др., Изв. вузов. Физика **56** (4–2), 73 (2013).
7. В. П. Реутов, В. Е. Охотин, А. В. Шуклин и др. Успехи физиол. наук **38** (4), 39 (2007).
8. В. Г. Граник и Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств* (Вузовская книга, Москва, 2004).
9. И. В. Ковалев, М. Б. Баскаков, А. А. Панов и др., Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова **83** (7), 70 (1997).
10. J. P. Kincella, New England J. **355**, 354 (2006).
11. P. Kumar, et al., Pediatrics **133** (1), 164 (2014).
12. D. J. Mathisen, E. Y. Kuo, C. Hahn, et al., Ann. Thoracic Surg. **66**, 1894 (1998).
13. А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, С. П. Ашихмин и С. П. Перетягин, Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова **101** (2), 180 (2015).
14. А. К. Martusevich, S. P. Peretyagin, A. G. Soloveva, et al., Biophysics (Moscow) **61** (1), 139 (2016).
15. А. К. Martusevich, A. G. Samodelkin, A. G. Soloveva, et al., Asian J. Biochem. Pharmaceut. Res. **5** (2), 130 (2015).
16. А. И. Крупаткин и В. В. Сидоров, *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови* (Медицина, М., 2005).
17. F. Bajrovic, et al., Eur. J. Physiol. **439** (suppl.), R158 (2000).
18. В. И. Карелин, С. Н. Буранов, О. А. Пименов и др., Медиаль, № 4, 46 (2013).
19. Л. А. Михайличенко и И. А. Тихомирова, Региональное кровообращение и микроциркуляция, № 1, 73 (2012).
20. А. Ф. Ванин, Е. Б. Манухина, И. Ю. Малышев и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **7**, 32 (2003).

## Laser Doppler Flowmetry for Estimating Microcirculatory Function in Response to Prolonged Inhaled Nitric Oxide Applications

A.K. Martusevich\* \*\*, P.V. Peretyagin\*, A.A. Martusevich\*\*\*, and S.P. Peretyagin\*\*

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

\*\*Russian Association of Ozone Therapy, ul. B. Panina 9, Nizhny Novgorod, 603089 Russia

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

The aim of the study was to evaluate the effects of a long-term use of inhaled nitric oxide on blood microcirculation in skin blood vessels of the healthy rats. The experiment was performed on 40 adult male Wistar rats. The animals in the first group ( $n = 10$ ) were the controls, they were kept without any manipulations. The animals in the second, third and fourth groups during 30 days received daily inhaled nitric oxide (concentrations of NO in the gas stream were 20, 50 and 100 ppm, respectively for the above groups). Upon completion of the full course of nitric oxide inhalation the state of the microcirculation was studied in all groups of animals. The estimated parameters were: the microcirculation index; the amplitude of the main regulatory factors (endothelial, neurogenic, myogenic, respiratory and cardiac), and the rate of bypass coefficient. Our research studies demonstrate that during the long-term use of nitric oxide inhalation for up to 30 days a dose-dependent effect on microcirculatory function was observed, and the most optimal response was seen when the low dose of the compound at a rate of 20 ppm was used. This effect is obtained both by the dynamics of the total intensity of the blood flow in microvessels and the relative activity of the involved regulatory mechanisms.

*Keywords: nitric oxide, subchronic toxicity, microcirculation, laser Doppler flowmetry*

---

Сдано в набор 14.06.2017    Подписано к печати 15.08.2017    Дата выхода в свет 25.09.2017    Формат 60x88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>  
Цифровая печать    Усл. печ. л. 26,0    Усл. кр.-отг. 3,2 тыс.    Уч.-изд. л. 26,0    Бум. л. 13,0  
Тираж 125 экз.    Зак. 1389    Цена свободная

---

Учредители:  
Российская академия наук,  
Институт биофизики клетки РАН

---

Издатель: ФГУП «Издательство «Наука», 117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

---

Отпечатано в ФГУП «Издательство «Наука» (Типография «Наука»), 121099, Москва, Шубинский пер., 6

---