

БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОТДАЛЁННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ СУБХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ОКСИДА АЗОТА

Кузнецова В. Л., Соловьева А. Г., Перетягин С. П., Преснякова М. В., Костина О. В.,
Перетягин П. В., Потоцкая М. С.

ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: kuznetsova07@list.ru

Целью работы явилась биохимическая оценка отдалённых результатов субхронического ингаляционно-наружного воздействия оксида азота (NO) у экспериментальных животных. Выполнены две серии исследований на крысах линии Wistar. Животные разделены на 5 групп: первая состояла из интактных здоровых крыс (контроль), вторая и третья – были подвергнуты воздействию газообразного NO концентрацией по 50 ppm, четвёртая и пятая – по 100 ppm. Курс ингаляции осуществляли ежедневно в течение 30 дней, продолжительность воздействия – 10 минут. Крыс первой серии (2 и 4 группы) выводили из эксперимента на 30-е сутки, вторую серию (3 и 5 группы) – на 60-е сутки от начала эксперимента. Газовую смесь синтезировали с помощью аппарата для генерации NO, разработанного в РФЯЦ-ВНИИЭФ (г. Саров). Определение биохимических показателей сыворотки крови проводили на анализаторе ILAB 650 (Италия, США, Япония). При оценке отдаленных результатов отмечен токсический эффект исследуемых доз газообразного NO. Наблюдались нарушения белкового и углеводного обмена, которые особенно ярко выражены при высокой дозе NO (100 ppm). Необходимо дальнейшее исследование токсикологического воздействия ингаляционного оксида азота более низкого диапазона концентраций и доз.

Ключевые слова: оксид азота, биохимические показатели, сыворотка.

BIOCHEMICAL ASSESSMENT OF THE REMOTE RESULTS OF SUBCHRONIC INFLUENCE OF NITROGEN OXIDE

Kuznetsova V. L., Soloveva A. G., Peretyagin S. P., Presnyakova M. V., Kostina O. V.,
Peretyagin P. V., Potoznkaya M. S.

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, e-mail: kuznetsova07@list.ru

The purpose of work was a biochemical assessment of the remote results of subchronic influence of nitrogen oxide (NO) at experimental animals. Two series of studies were performed in the rat of Wistar line. Animals were divided into 5 groups: the first group consisted from intact healthy rats (control), the second and the third groups were subjected to influence of gaseous NO by concentration of 50 ppm, the fourth and the fifth groups – to 100 ppm. The course of inhalation was carried out daily within 30 days, the duration of exposure - 10 minutes. Rats of the first series (1 and 3 groups) were brought out of experiment for the 30th days, the second series (2 and 4 groups) – for the 60th days from the beginning of experiment. The gas mixture was synthesized by the apparatus for generating nitric oxide developed at Sarov. Determination of biochemical parameters of blood serum was performed on an automatic analyzer ILAB 650 (Italy, USA, Japan). The toxic effect of the studied doses of gaseous NO was marked in assessing the long-term results. Violations of protein and carbohydrate metabolism were observed, which is especially were pronounced at high dose of NO (100 ppm). It is necessary to further study the toxicological effects of inhaled nitric oxide is the lower range of concentrations and doses.

Keywords: nitric oxide, biochemical parameters, serum.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению роли оксида азота (NO) и возможности его использования. Он вырабатывается различными клетками организма и контролирует в них многие функции и биохимические процессы. Оксид азота вызывает релаксацию кровеносных сосудов и гладкомышечной ткани, обладает нейромодулирующей и противоопухолевой активностью, регулирует синтез и секрецию гормонов, активность

тромбоцитов [1]. Снижение биодоступности и синтеза NO является ключевым звеном формирования эндотелиальной дисфункции [5; 6]. Это вызывает оправданное стремление использовать оксид азота в терапевтических целях при недостаточной выработке данного медиатора эндотелиальными клетками.

В Российском Федеральном ядерном центре – Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной физики (ФГУП “РФЯЦ – ВНИИЭФ”, г. Саров) был разработан экспериментальный аппарат для синтеза газовой смеси оксида азота [4]. Возможный диапазон вырабатываемых им концентраций NO составляет от 20 до 200 ppm. Представляет интерес использование данного прибора в медицинской практике.

Следует отметить, что оксид азота является нестабильным соединением, которое существует несколько секунд. Он диффундирует в просвет сосуда, где быстро инактивируется растворенным кислородом, а также супероксидными анионами и гемоглобином [1]. Взаимодействие NO с супероксидом (и другими кислородными радикалами) приводит не только к утрате вазодилатирующего потенциала NO, но и к образованию высокотоксичного пероксинитрита. В случае массивного производства NO наблюдается повышенное образование пероксинитрита, которое сопровождается повреждением клеток путем их окисления или нитрозилирования [6]. Очевидно, что необходимо определить терапевтические дозы использования NO, а также изучить характер их воздействия на организм.

Целью исследования явилась оценка отдалённых результатов субхронического ингаляционно-наружного воздействия оксида азота (в дозе 50 ppm и 100 ppm) по биохимическим параметрам сыворотки крови у экспериментальных животных.

Материалы и методы

Выполнены две серии исследований на 28 крысах-самцах линии Wistar, в ходе которых животных разделили на 5 групп: первая состояла из интактных здоровых крыс (контроль), вторая и третья – были подвергнуты воздействию газообразного NO концентрацией по 50 ppm, четвёртая и пятая – по 100 ppm. Ингаляцию осуществляли ежедневно в течение 30 дней, продолжительность воздействия – 10 минут. Крыс первой серии (2 и 4 группы) выводили из эксперимента сразу же после окончания курса ингаляции оксида азота на 30-е сутки, животных второй серии (3 и 5 группы) – спустя 30 дней после проведённого курса, т.е. на 60-е сутки от начала эксперимента путем декапитации под комбинированным наркозом (золетил+ксила). Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC.

Определение основных биохимических показателей сыворотки крови (глюкозы, общего билирубина, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, общего белка, альбуминов, общего холестерина, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы) проводили на автоматическом анализаторе ILAB 650 (Италия, США, Япония).

Статистический анализ выполнен с применением программы Statistica 6 (StatSoft, Inc.). Количественные данные описаны с помощью медианы, первого и третьего квартилей Me (Q1; Q3). Сравнение независимых переменных проведено по U-критерию Манна – Уитни. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования выявлено, что у крыс после ингаляции оксидом азота концентрация глюкозы в сыворотке крови была статистически достоверно выше, по сравнению с контрольной группой (табл. 1). С одной стороны, возможно, что оксид азота как внешний фактор может стимулировать в организме секрецию глюкокортикоидов, которые способствуют мобилизации энергетических ресурсов [5]. Они повышают уровень глюкозы в крови за счёт активации глюконеогенеза, содействуя толерантности организма к воздействию NO. С другой стороны, известно, что оксид азота замедляет распад глюкозы, ингибируя фосфофруктокиназу и глицеральдегидфосфатдегидрогеназу [12, 13]. Нельзя исключить цитотоксического воздействия активных форм оксида азота на собственные клетки и ткани организма. Известно, что β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы обладают слабой антиоксидантной активностью и поэтому наиболее подвержены деструктивному воздействию NO, дисфункция и деструкция которых способствует снижению выработки инсулина и повышению глюкозы в крови [2].

Таблица 1

Изменение биохимических показателей сыворотки крови при субхроническом воздействии оксида азота

Анализируемые показатели	Группа 1 (контроль) n=8	Доза оксида азота 50 ppm		Доза оксида азота 100 ppm	
		Группа 2 (первая серия) n=5	Группа 3 (вторая серия) n=5	Группа 4 (первая серия) n=5	Группа 5 (вторая серия) n=5
	1	2	3	4	5
Глюкоза, ммоль/л	13,3* 12,00 – 16,65**	20,3 19,80 – 20,50 $p_1 = 0,012$	18,4 18,10 – 18,90 $p_2 = 0,048$ $p_5 = 0,100$	19,2 18,50 – 20,30 $p_3 = 0,024$	19,0 18,30 – 19,20 $p_4 = 0,024$ $p_6 = 0,400$
Мочевина, ммоль/л	5,05 4,05 – 5,85	6,50 5,00 – 7,20	6,00 4,30 – 6,40	5,20 5,20 – 5,70	7,10 6,40 – 7,40

		$p_1 = 0,133$	$p_2 = 0,376$ $p_5 = 0,400$	$p_3 = 0,776$	$p_4 = 0,012$ $p_6 = 0,100$
Мочевая кислота, мкмоль/л	60,0 51,00 – 70,00	56,0 56,00 – 78,00 $p_1 = 0,667$	41,0 36,00 – 42,00 $p_2 = 0,017$ $p_5 = 1,000$	73,0 62,00 – 84,00 $p_3 = 0,117$	40,0 35,00 – 40,00 $p_4 = 0,017$ $p_6 = 0,400$
Креатинин, мкмоль/л	66,85 64,90 – 68,65	66,80 64,30 – 68,40 $p_1 = 0,921$	68,1 67,40 – 68,80 $p_2 = 0,497$ $p_5 = 0,400$	65,20 65,10 – 65,30 $p_3 = 0,279$	66,3 62,10 – 75,20 $p_4 = 1,000$ $p_6 = 0,700$
Общий билирубин, мкмоль/л	1,63 1,570 – 1,830	1,43 1,190 – 1,540 $p_1 = 0,167$	1,40 1,370 – 1,500 $p_2 = 0,167$ $p_5 = 1,000$	2,10 1,660 – 2,300 $p_3 = 0,167$	1,41 1,150 – 1,580 $p_4 = 0,262$ $p_6 = 1,000$
Общий холестерол, ммоль/л	1,55 1,350 – 1,700	1,70 1,400 – 2,000 $p_1 = 0,497$	1,40 1,300 – 1,800 $p_2 = 0,776$ $p_5 = 0,400$	1,70 1,300 – 2,100 $p_3 = 0,776$	1,50 1,400 – 1,800 $p_4 = 0,921$ $p_6 = 0,700$

Примечание: n – количество наблюдений; * – медиана; ** – квартильный размах; p_1 – достоверность различия анализируемых параметров в графе 1 и 2, p_2 – в графе 1 и 3, p_3 – в графе 1 и 4, p_4 – в графе 1 и 5, p_5 – в графе 2 и 3, p_6 – в графе 4 и 5.

При глюконеогенезе в качестве источника энергии используются продукты белкового обмена. Установлено, что у крыс 2, 3 и 5 групп концентрация альбуминов статистически достоверно ниже, чем в контроле, что подтверждает активацию глюконеогенеза (табл. 2), т.к. альбумины являются резервным источником аминокислот в организме и при необходимости будут использоваться в первую очередь [9]. Выявлено, что у крыс первой серии эксперимента и группы 4 повышена активность аспаратаминотрансферазы (АСАТ), в то время как у аланинаминотрансферазы (АЛАТ) не подверглась статистически достоверному изменению по сравнению с интактной группой. Аспаратаминотрансфераза, по сравнению с АЛАТ, более интенсивно используется в синтезе глюкозы из белков. Этот фермент даёт возможность организму уйти от катаболизма углеводов, вернуться к анаболическим процессам, т.е. глюконеогенезу [8].

Таблица 2

Изменение показателей белкового обмена при субхроническом воздействии оксида азота

Анализируемые показатели	Группа 1 (контроль) n=8	Доза оксида азота 50 ppm		Доза оксида азота 100 ppm	
		Группа 2 (первая серия) n=5	Группа 3 (вторая серия) n=5	Группа 4 (первая серия) n=5	Группа 5 (вторая серия) n=5
	1	2	3	4	5
Общий белок, г/л	63,8* 61,10–	58,0 57,70– 63,10	57,9 56,40 – 58,70	61,1 59,50 – 62,20	55,8 55,10 – 56,60

	68,55**	$p_1 = 0,133$	$p_2 = 0,012$ $p_5 = 0,700$	$p_3 = 0,194$	$p_4 = 0,012$ $p_6 = 0,200$
Альбумины, г/л	23,9 22,70 – 25,95	21,9 20,0 – 22,40 $p_1 = 0,048$	20,7 18,70 – 22,70 $p_2 = 0,048$ $p_5 = 1,000$	24,1 20,70 – 24,90 $p_3 = 0,630$	21,3 19,60 – 21,80 $p_4 = 0,024$ $p_6 = 1,000$
Глобулины, г/л	39,8 37,30 – 43,60	37,7 35,60 – 41,20 $p_1 = 0,497$	37,2 33,70 – 39,90 $p_2 = 0,133$ $p_5 = 0,700$	37,3 35,40 – 39,40 $p_3 = 0,279$	35,3 34,00 – 35,50 $p_4 = 0,012$ $p_6 = 0,700$
Аспаратамино- трансфераза, ед./л	157,1 121,9 – 169,8	278,3 212,5 – 323,8 $p_1 = 0,017$	217,2 180,9 – 228,6 $p_2 = 0,017$ $p_5 = 0,400$	237,2 203,1 – 299,6 $p_3 = 0,017$	166 147,9 – 438,2 $p_4 = 0,383$ $p_6 = 0,700$
Аланинамино- трансфераза, ед./л	72,7 59,80 – 85,55	80,9 64,20 – 121,90 $p_1 = 0,376$	79,6 73,00 – 121,10 $p_2 = 0,279$ $p_5 = 1,000$	70,7 68,60 – 187,50 $p_3 = 0,497$	61,4 55,30 – 257,20 $p_4 = 0,921$ $p_6 = 0,700$
Щелочная фосфатаза, ед./л	192 171,5 – 237,5	519 367,0 – 544,0 $p_1 = 0,012$	292 177,0 – 338,0 $p_2 = 0,279$ $p_5 = 0,100$	535 436,0 – 555,0 $p_3 = 0,012$	232 200,0 – 238,0 $p_4 = 0,376$ $p_6 = 1,000$

Примечание: n – количество наблюдений; * – медиана; ** – квартильный размах; p_1 – достоверность различия анализируемых параметров в графе 1 и 2, p_2 – в графе 1 и 3, p_3 – в графе 1 и 4, p_4 – в графе 1 и 5, p_5 – в графе 2 и 3, p_6 – в графе 4 и 5.

Известно, что адреналин участвует в формировании общего адаптационного синдрома, начиная с самого первого этапа воздействия возбуждающего агента [11]. Он способствует распаду гликогена в результате гликогенолиза с образованием гексозофосфатов в тканях. У крыс первой серии опытов наблюдается статистически достоверное повышение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) по сравнению с контрольной группой. Щелочная фосфатаза является неспецифическим ферментом, который выпускает глюкозу из тканей путём отщепления фосфорнокислого остатка от гексозофосфатов. При повышении активности ЩФ происходит увеличение фосфатно-энергетического потенциала на уровне всего организма, так как образуется аденозинтрифосфат, т.е. реализуется закон сохранения энергии [8].

Длительное воздействие высоких концентраций глюкокортикоидов, превышающих адаптационные возможности организма, приводит к усиленному белковому катаболизму [9]. У крыс второй серии эксперимента содержание не только альбуминов, но и общего белка статистически достоверно ниже, чем в контрольной группе. С одной стороны, это может быть вызвано продолжительной активацией глюконеогенеза. С другой стороны, уменьшение концентрации общего белка и альбуминов может быть связано с печеночно-клеточной

недостаточностью и снижением синтетической функции печени [3]. Известно, что эндогенный оксид азота подавляет синтез белка в печени [12]. Вероятно, что экзогенный NO обладает такими же свойствами. Следует отметить, что в группе 5, подвергнутой воздействию оксида азота концентрацией 100 ppm, наблюдается более глубокое нарушение белкового обмена, т.к., кроме изменения уровня общего белка и альбуминов, отмечено снижение концентрации глобулинов по сравнению с интактной группой, активности аспаратаминотрансферазы, а также высокая концентрация продукта конечного распада белка – мочевины [8]. Это указывает на повышенную потребность в возмещении больших энергетических затрат, связанную с дефицитом пластических ресурсов, а также на увеличение скорости катаболических реакций [9].

Установлено, что у крыс второй серии эксперимента снижена концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой. Данный результат может быть обусловлен несколькими причинами. Одна из них заключается в действии адренкортикотропного гормона, синтез которого увеличивается на широкий спектр внешних факторов, в том числе и на оксид азота. Адренкортикотропный гормон значительно повышает выделение с мочой продуктов белкового обмена, в частности мочевой кислоты [10]. Другая причина может быть обусловлена снижением синтеза ферментов, участвующих в образовании мочевой кислоты, протекающего в печени [7]. Известно, что гиперпродукция NO в организме приводит к нарушению перекисного окисления липидов, развитию и поддержанию патологических процессов, интоксикации организма [6]. Мочевая кислота выполняет функцию антиоксиданта. Вероятно, снижение её концентрации может указывать на активацию свободнорадикальных и катаболических процессов в организме экспериментальных животных второй серии эксперимента.

У крыс, ингалярированных оксидом азота, не было выявлено статистически значимых отличий в показателях общего билирубина, креатинина, общего холестерина и активности аланинаминотрансферазы по сравнению со значениями интактной группы. Следует отметить, что в первой серии эксперимента концентрация общего белка, мочевины, мочевой кислоты в сыворотке крови также практически не отличались от значений контрольной группы. Между двумя сериями эксперимента статистически достоверных изменений по анализируемым показателям сыворотки крови не обнаружено.

Заключение

Таким образом, в первой серии эксперимента установлена мобилизация энергетических ресурсов организма в результате активации процессов глюконеогенеза и гликогенолиза, о чём свидетельствует повышение концентрации глюкозы, активности

аспартатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы, а также снижение содержания альбуминов в сыворотке крови экспериментальных животных. Кроме того, нельзя исключить вероятность деструктивного воздействия NO в исследованных дозах на b-клетки островков Лангенгарса поджелудочной железы, дисфункция которых могла привести к повышению уровня глюкозы в крови.

При оценке отдаленных результатов воздействия газообразного NO (вторая серия эксперимента) не отмечен возврат биохимических показателей сыворотки крови к исходным данным интактных животных. Наблюдаются нарушения белкового и углеводного обмена, которые указывают на истощение адаптационных возможностей организма. Субхроническое ингаляционно-наружное воздействие оксида азота с концентрациями 50 и 100 ppm способствует формированию биорадикального стресса, снижению процессов синтеза и увеличению скорости катаболических реакций, которые особенно ярко выражены при высокой дозе NO (100 ppm). Эти процессы могут привести к дезорганизации систем организма, патологическим состояниям, сопровождающимся структурными изменениями в тканях и органах. Необходимо дальнейшее исследование токсикологического воздействия ингаляционного оксида азота более низкого диапазона концентраций и доз.

Список литературы

1. Белоусов Ю. Б., Намсараев Ж. Н. Эндотелиальная дисфункция как причина атеросклеротических поражений артерий при артериальной гипертензии: методы коррекции // Фарматека. – 2004. – № 6. URL: <http://www.pharmateca.ru/ru/archive/article/5336> (дата обращения: 20.11.2015).
2. Бобырева Л. Е. Свободнорадикальное окисление, антиоксиданты и диабетические ангиопатии // Проблемы эндокринологии. – 1996. – № 6. – С. 14-19.
3. Булатова И. А., Щёктова А. П., Падучева С. В., Щёкотов В. В., Жижелёв Е. В. Цитокины у больных циррозом печени вирусного и невирусного генеза // Новости “Вектор-Бест”. – 2015. – № 1. – С. 2-5.
4. Буранов С. Н., Карелин В. И., Селемир В. Д., Ширшин А. С. Устройство для получения окиси азота // Патент Рос. Федерации № 2014102185/05. 2015. Бюл. № 16.
5. Гриневич В. В., Волкова О. В., Акмаев И. Г. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в системе: гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников при воспалении // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 5. – С. 10-14.

6. Кузнецова В. Л., Соловьева А. Г. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. URL: <http://www.science-education.ru> (дата обращения: 07.08.2015).
7. Мочевая кислота: причины повышенного и пониженного содержания, лечение / Медицинские анализы. URL: <http://med-analyzes.ru/analizy-krovi/biohimiya/azotistye-veshhestva/mochevaya-kislota.html> (дата обращения: 13.12.2015).
8. Рослый И. М., Водолажская М. Г. Правила чтения биохимического анализа. – М.: Медицинское информационное агентство, 2010. – 96 с.
9. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – М: Медпрессинформ, 2009. – 896 с.
10. Сулейманова А. АКТГ // Ваш эндокринолог 09.07.13. URL: <http://endokrinolog.ru/aktg> (дата обращения: 08.06.2015).
11. Хиггинс К. Расшифровка клинических лабораторных анализов / под ред. проф. В. Л. Эмануэля. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 376 с.
12. NO (окись азота): биология / База знаний по биологии человека. URL: <http://humbio.ru/humbio/har/0041adc7.htm#0041cf0a.htm> (дата обращения: 15.06.2015).
13. Tsuura Y., Ishida H., Hayashi S., Sakamoto K., Horie M., Seinoet Y. Nitric oxide opens ATP-sensitive K⁺ channels through suppression of phosphofructokinase activity and inhibits glucose-induced insulin release in pancreatic beta cells // J. Gen. Physiol. – 1994. – Vol. 104. – P. 1079-1098.