

УДК 577.15: 616-001.16

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Соловьева А.Г., Перетягин П.В.

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: sannag5@mail.ru

В работе представлены результаты исследования влияния различных доз озона на про- и антиоксидантные системы крови интактных крыс при длительном его применении. Эксперимент выполнен на крысах линии Wistar. Продолжительность эксперимента составила 30 суток, в течение которых животным ежедневно внутривентриально вводили 1 мл 0,9 % раствора NaCl, с насыщающими концентрациями озона в нем 0,6 мкг, 2,0 или 8,0 мкг. Контроль представлен здоровыми интактными крысами без манипуляций и животными, которым проводили инъекции 0,9 % раствора NaCl, насыщенного кислородом. Через 30 суток животных выводили из эксперимента путем декапитации под наркозом. В плазме крови и эритроцитах изучали интенсивность перекисного окисления липидов с помощью метода индуцированной биохимилуминесценции и по уровню малонового диальдегида. В гемолизате эритроцитов определяли активность супероксиддисмутазы. Выявлено, что хроническое применение кислороднасыщенного раствора в течение 30 суток вызывает угнетение про- и антиоксидантного баланса крови. Установлено, что длительное использование озона в высоких концентрациях (2,0 и 8,0 мкг) оказывает ингибирующее влияние на перекисное окисление липидов и общий антиоксидантный статус крови, повышая активность супероксиддисмутазы. Показано, что менее выраженным токсическим эффектом обладает озон в концентрации 0,6 мкг.

Ключевые слова: активные формы кислорода; перекисное окисление липидов; малоновый диальдегид; супероксиддисмутаза.

CHANGE OF INDICATORS OF BLOOD OXIDATIVE METABOLISM DURING CHRONIC EXPOSURE OF DIFFERENT DOSES OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE 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, Nizhny Novgorod, e-mail: sannag5@mail.ru

The paper presents the research results of influence of different ozone doses on pro - and antioxidant systems of blood of intact rats during prolonged use. The experiment was performed on Wistar rats. The duration of the experiment was 30 days, during which animals daily intraperitoneally were administered 1 ml of 0.9% NaCl solution, with saturating concentrations of ozone in it to 0.6 mcg, 2.0 mcg or 8.0 mcg. Control presents healthy intact rats without any manipulation and animals, which we carried out the injection of 0.9% NaCl solution saturated with oxygen. After 30 days animals were withdrawn from the experiment by decapitation under anesthesia. In plasma and erythrocytes was studied the intensity of lipid peroxidation using the method of induced bioluminescence and by the level of malonic dialdehyde. In the hemolysate of erythrocytes was determined by the activity of superoxide dismutase. It was detected that chronic use of NaCl solution saturated with oxygen for 30 days causes inhibition of pro- and antioxidant blood balance. It was shown that use of ozone in high concentrations (2,0 and 8,0 mcg) has a inhibition effect on lipid peroxidation and total antioxidant status of blood increasing the activity of superoxide dismutase. It is shown that less pronounced toxic effect has ozone in a concentration of 0.6 mcg.

Keywords: reactive oxygen species, lipid peroxidation, malonic dialdehyde, superoxide dismutase.

Применение любых активных форм кислорода (АФК) в биологии и медицине с саногенетическими целями неизбежно сталкивается с проблемой интенсификации свободно-радикального окисления (СРО), активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран, направленных на адаптивное в условиях гиперметаболизма повышение клеточной проницаемости. Поэтому использование окислительных методов

терапии неразрывно связано с необходимостью исследования процессов липопероксидации, так как изменение баланса про- и антиоксидантных систем организма является одним из диагностических критериев тяжести патологического состояния, характеризующего формирование и прогрессирование окислительного стресса [1, 2, 9]. Однако при чрезмерной гиперстимуляции окислительного метаболизма может происходить не только модификация клеточной стенки, но и её альтерация, приводящая к повышению микроваскулярной проницаемости и системному поражению органов и тканей [1, 2]. В этой связи актуальна проблема изучения механизмов СРО при использовании разных концентраций АФК в условиях их хронического воздействия на организм млекопитающих.

Целью данной работы явилось изучение влияния разных доз озона (0,6; 2,0 и 8,0 мкг) на про- и антиоксидантные системы крови интактных крыс при длительном его применении.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 50 крысах-самцах линии Wistar, содержащихся 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». Животных разделили на 5 групп. Продолжительность эксперимента составила 30 суток, в течение которых животным 1-ой группы (n=10) ежедневно внутрибрюшинно вводили 1 мл 0,9 % раствора NaCl с насыщающей концентрацией озона в кислород-озоновой смеси от озонатора «Медозонс-Систем – 3000 мкг/л и дозой O₃ – 0,6 мкг на одно животное. Для животных 2-ой группы (n=10) насыщающая концентрация озона составила 10000 мкг/л и доза O₃ – 2 мкг; 3-ей группы (n=10) – 40 000 мкг/л с вводимой дозой озона 8 мкг. Концентрацию O₃ в физиологическом растворе определяли с помощью анализатора озона в жидких средах ИКОЖ-5 (сертификат соответствия RU.C. 31.001.A № 29545-05, г. Киров). Крысы 4-й группы (n=10) представлены здоровыми интактными животными без манипуляций (контроль 1), в 5-ой группе (контроль 2, n=10) животным проводили инъекции 1 мл 0,9 % раствора NaCl, насыщенного кислородом (кислород газообразный особой чистоты, марка 5,0, ТУ 2114-004-76237928-2013, объемная доля кислорода 99,999 %). Через 30 суток животных выводили из эксперимента путем декапитации под комбинированным наркозом (золетил (60 мг/кг) + ксила (6 мг/кг)).

Для исследований баланса про- и антиоксидантных систем использовали кровь, стабилизированную цитратом натрия (1:9). В плазме крови и эритроцитах изучали активность процессов СРО с помощью метода индуцированной биохемиллюминесценции на биохемиллюминометре БХЛ-06 (Н. Новгород). Оценивали следующие параметры хемиллюминограммы: tg 2α – показатель, характеризующий скорость спада процессов СРО в плазме и свидетельствующий об общем антиоксидантном потенциале (АОА); S – светосумма

хемилюминесценции за 30 сек. – отражает потенциальную способность биологического объекта к ПОЛ. Интенсивность ПОЛ определяли по уровню содержания вторичного продукта СРО – малонового диальдегида (МДА) в плазме и эритроцитах методом M.Uchiyama, M.Mihara [12], так как образующиеся в результате липопероксидации такие метаболиты, как альдегиды, кетоны, кислоты являются токсичными для организма. Карбонильные продукты подавляют синтез ДНК, вызывают внутри- и межмолекулярные сшивки полипептидов, модифицируют агрегацию тромбоцитов [2]. Среди ферментов, представляющих первое звено антиоксидантной 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 [5]. Расчет удельной активности фермента осуществляли по концентрации белка, исследовавшегося модифицированным методом Лоури [7]. Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0. Значимость различий между показателями определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По данным биохемилюминесценции полученные результаты свидетельствовали о снижении про- и антиоксидантного баланса в плазме крови животных контрольной серии с применением кислороднасыщенного физиологического раствора (рис. 1, 2).

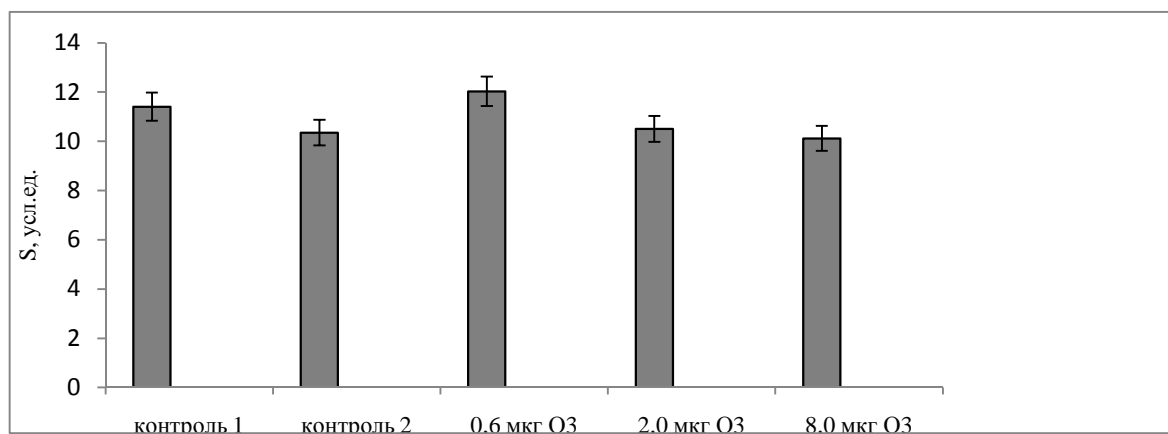


Рис. 1. Динамика изменения светосуммы хемилюминесценции в плазме крови крыс при воздействии различных доз АФК в условиях хронического эксперимента

При этом незначительное уменьшение светосуммы хемилюминесценции на 9 % по сравнению с показателем интактных животных (рис. 1) сопровождалось падением АОА на 20% ($p=0,038$) по сравнению с животными 1 контрольной группы (рис. 2).

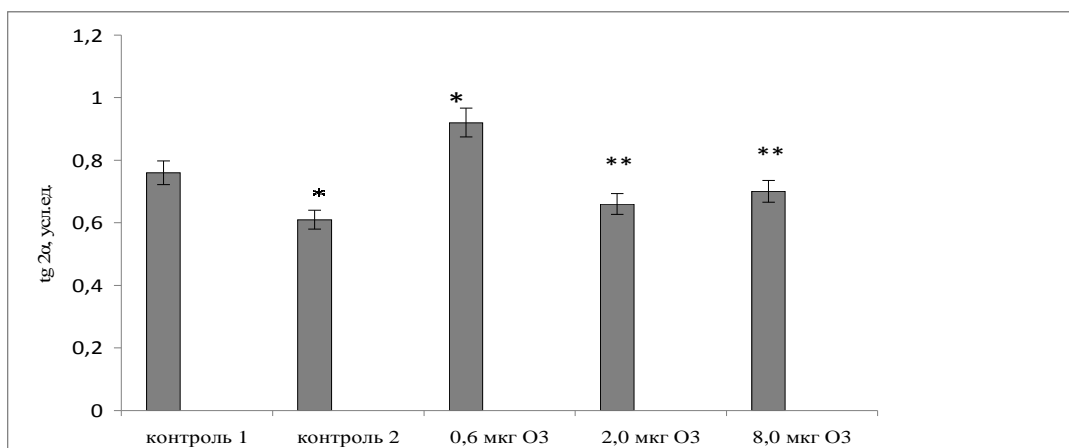


Рис. 2. Динамика изменения показателя tg2α в плазме крови крыс при воздействии различных доз АФК в условиях хронического эксперимента

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем 1 ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с 0,6 мкг O₃ ($p < 0,05$).

Одновременно у крыс второй контрольной группы выявлено снижение светосуммы хемилюминисценции в эритроцитах на 19 % ($p = 0,032$) по сравнению с интактными животными (рис. 3), что может привести в условиях длительной кислородной интоксикации 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, уменьшением электрической стабильности липидного бислоя мембран [6].

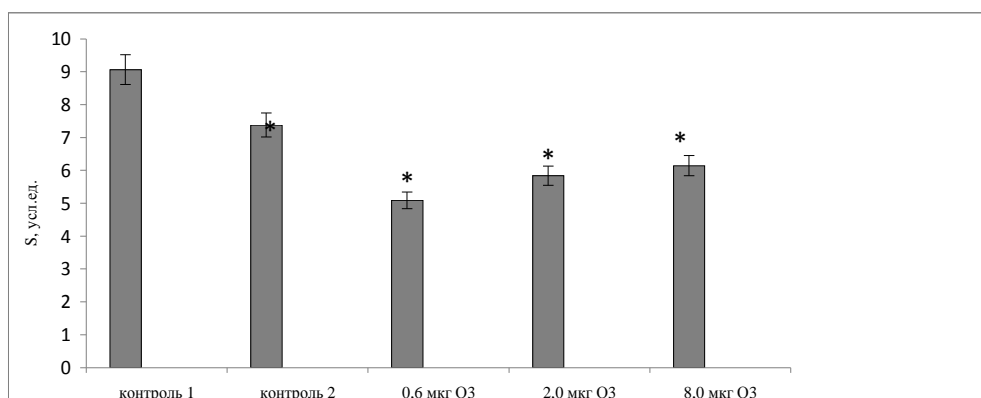


Рис. 3. Динамика изменения светосуммы хемилюминисценции в эритроцитах крыс при воздействии различных доз АФК в условиях хронического эксперимента

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем 1 ($p < 0,05$).

Снижение общего уровня про- и антиоксидантного баланса на фоне длительного воздействия кислороднасыщенного физиологического раствора подтверждали также данные определения МДА и СОД. Полученные результаты выявили статистически значимое

уменьшение концентрации МДА в плазме крови и эритроцитах соответственно на 53 % ($p=0,034$) и 61 % ($p=0,021$) после применения кислороднасыщенного физиологического раствора по сравнению с интактными животными (рис. 4). Удельная активность СОД во 2-ой контрольной группе уменьшилась на 26 % ($p=0,028$) по сравнению с контролем 1 (рис. 5).

Таким образом, изменения про- и антиоксидантного статуса под влиянием кислороднасыщенного физиологического раствора при длительном его применении свидетельствовали об уменьшении окислительного потенциала на системном уровне (кровь) и могли быть одной из причин ослабления сопротивляемости организма, снижения его иммунореактивности [11].

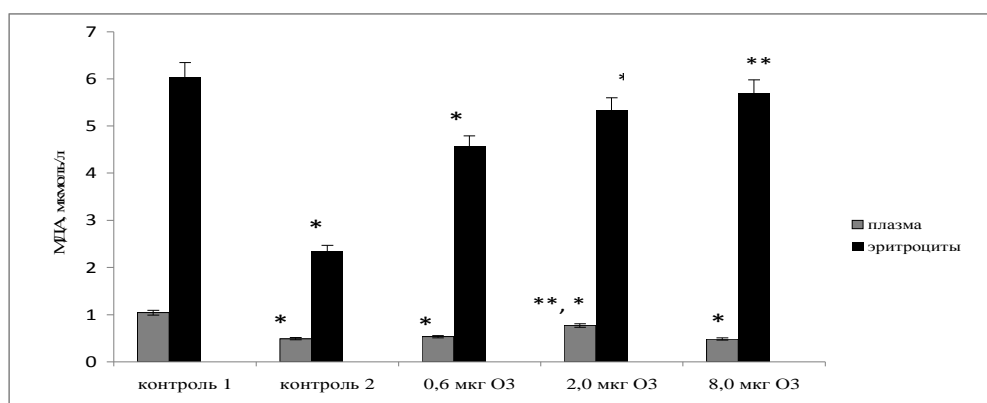


Рис. 4. Концентрация малонового диальдегида в крови крыс при воздействии различных доз АФК в условиях хронического эксперимента

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем 1 ($p<0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с 0,6 мкг O₃ ($p<0,05$).

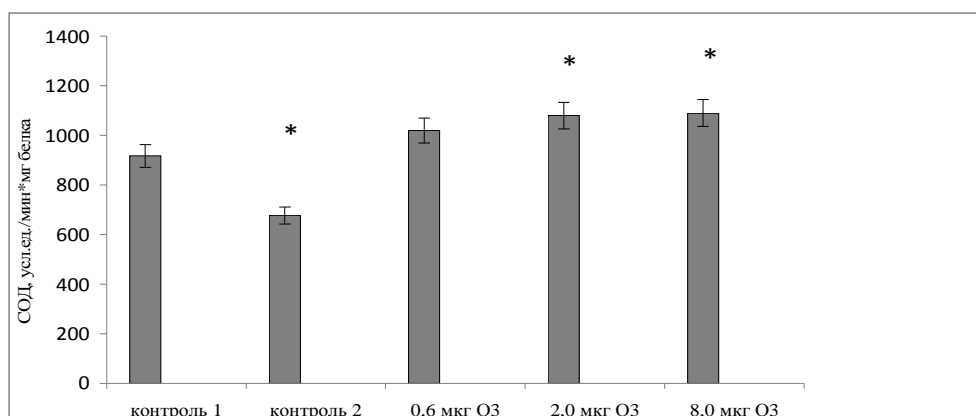


Рис. 5. Удельная активность супероксиддисмутазы в эритроцитах крови крыс при воздействии различных доз АФК в условиях хронического эксперимента

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем 1 ($p<0,05$).

Хроническое системное воздействие (в течение 30 суток) на животных АФК с существенно большим, чем у кислорода окислительно-восстановительным потенциалом –

озоном при использовании его низкой дозы (0,6 мкг), незначительно стимулируя прооксидантный потенциал плазмы крови до +5 % ($p=0,098$) (рис. 1), снижало светосумму хемилюминисценции эритроцитов, свидетельствуя о повышении их перекисной резистентности на 44 % ($p=0,022$) (рис. 3). При этом выявлено возрастание АОА плазмы на 21 % ($p=0,008$) по сравнению с интактными животными (рис. 2). Под влиянием низкой дозы озона (0,6 мкг) активность СОД в эритроцитах увеличилась на 11 % ($p=0,061$) (рис. 5). Суммарное возрастание антиоксидантных свойств плазмы и эритроцитов препятствовало развитию оксидативного стресса, что сопровождалось снижением промежуточного продукта ПОЛ – МДА на 46 % ($p=0,004$) в плазме крови и на 25 % ($p=0,025$) в эритроцитах (рис. 4). Известно, что O_3 способствует синтезу и активации каталитических свойств ферментов антирадикальной защиты: глутатионпероксидазы, каталазы и СОД [4, 8].

Хроническое воздействие большего количества АФК (дозы озона 2,0 и 8,0 мкг) по данным биохемилюминисцентного анализа сопровождалось снижением общего уровня прооксидантной активности. Об этом свидетельствовало уменьшение светосуммы хемилюминисценции в плазме крови на 8 % ($p=0,064$) и 11 % ($p=0,084$) соответственно (рис. 1), а в эритроцитах показатель S был снижен на 35 % ($p=0,021$) при воздействии O_3 в дозе 2,0 мкг и на 32 % ($p=0,034$) при использовании 8,0 мкг O_3 по сравнению с контрольной группой 1 (рис. 3). Высокие дозы озона (2,0 и 8,0 мкг) вызвали снижение общей антиоксидантной активности в плазме крови на 28 % ($p=0,023$) и 24 % ($p=0,031$) соответственно по сравнению с применением низких доз озона (0,6 мкг), что свидетельствовало об истощении, скорее всего, неферментативного звена антиоксидантной защиты (рис. 2). На этом фоне, в отличие от хронических воздействий чистым кислородом, при использовании больших доз O_3 (2,0 и 8,0 мкг) удельная активность СОД в эритроцитах увеличилась на 18 % ($p=0,041$) и 19 % ($p=0,035$) соответственно (рис. 5). Это создавало условия для обрыва процессов ПОЛ. Концентрация МДА в плазме крови уменьшилась на 26 % ($p=0,041$; доза O_3 – 2,0 мкг) и 54 % ($p=0,023$; доза O_3 – 8,0 мкг) по сравнению с показателями животных первой контрольной группы, в эритроцитах – на 12 % ($p=0,040$) и 6 % соответственно (рис. 4).

Таким образом, хроническое парентеральное введение кислороднасыщенного физиологического раствора животным в течение 30 суток оказало ингибирующее действие на про- и антиоксидантный статус крови. Подобное снижение интенсивности окислительных процессов установлено также для токсического действия кислорода в исследованиях гипероксии, связанной с вдыханием кислорода под повышенным давлением [1]. Пусковые механизмы действия гипербарического кислорода на клетку (организм) реализуются через прямое (посредством включения кислорода в электрон-транспортные сети митохондрий),

опосредованное (через свободнорадикальные механизмы) и рефлекторное (через рецепторы) влияние [1, 6]. Длительное применение озонированного физиологического раствора в диапазоне высоких доз озона (2,0 и 8,0 мкг) у крыс, не увеличивая АОА, оказывало стимулирующее действие на активность СОД, что могло снижать прооксидантные физиологические возможности АФК в организме животных. В условиях моделирования хронического воздействия АФК наиболее оптимальным оказалось применение низких доз озона в физиологическом растворе (0,6 мкг), которые, поддерживая активность процессов ПОЛ несколько выше уровня, чем у интактных животных, оказали модулирующее действие как на СОД, так и в целом на АОА крови. Данные литературы о влиянии O_3 на каталитические свойства СОД и содержание МДА также подтверждают дозозависимый характер ответных реакций биологических систем на низкие и высокие дозы озона [10, 13]. Ранее установлено, что длительное использование низких доз озона способствовало умеренной физиологической активации оксидоредуктаз, тогда как дозы O_3 , превышающие 2,0 мкг, приводили к нарастанию тканевой гипоксии и накоплению в печени токсических продуктов [10].

Заключение

Результаты проведенного исследования позволяют констатировать, что длительное субхроническое воздействие кислороднасыщенным физиологическим раствором снижает в целом про- и антиоксидантный баланс в организме животных. Применение в аналогичных условиях низких доз (0,6 мкг) одной из активных форм кислорода, озона, сопровождается минимально иницирующим влиянием на ПОЛ в крови с преимущественным защитным антиоксидантным действием как на системном уровне (кровь), так и на клеточном (эритроциты). Использование более высоких доз озона (2,0 и 8,0 мкг), также стимулирующих СОД, сопровождается при этом уменьшением влияния O_3 на окислительно-восстановительные процессы в организме, о чём свидетельствовали сниженные показатели хемилуминограмм и концентрации МДА в крови.

Список литературы

1. Леонов А.Н. Гипероксия. Адаптационно-метаболическая концепция саногенеза // Бюллетень гипербарической биологии и медицины. – 1993; 1 (1-4): 61-74.
2. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма Слово, 2006. – 556 с.
3. 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. – № 7-1. – С. 151-154.

4. Перетьягин С.П. О многофакторном механизме лечебного действия озона // *Нижегородский медицинский журнал*. – 2003: 6-7.

5. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // *Вопросы медицинской химии* 1999; 45 (3): 109–116.

6. Стряпко Н.В. Адаптация к гипоксии и гипероксии при действии токсикантов в низких дозах: свободно-радикальное окисление и компоненты редокс-сигнализации: автореф дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2015.

7. Dawson J.M., Heatlic P.L. Lowry method of protein quantification Evidence for Photosensitivity. *Analytical Biochemistry* 1984; 140 (2): 391–393.

8. Elvis A.M., Ekta J.S. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med* 2011; 2 (1): 66–70.

9. Guanche D., Hernandez F., Zamora Z., Alonso Y. Effect of ozone pre-conditioning on redox activity in a rat model of septic shock. *Toxicol. Mech. Methods* 2010; 20 (8): 466–471.

10. Peretyagin S.P., Martusevich A.K., Solovyeva A.G., Zimin Yu.V., Peretyagin P.V. Enzymological evaluation of hepatotropic effect of ozone in a subchronic experiment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2013; 154 (6): 789–791.

11. Tarpy S.P., Celli B.R. Long-term oxygen therapy. *Engl J Med* 1995; 333 (11): 710–714.

12. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 1978; 86: 271.

13. Zhou N.B., Fu Z.J., Sun T. Effects of different concentrations of oxygen-ozone on rats' astrocytes in vitro. *Neurosci Lett* 2008; 441 (2): 178–182.