

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО И СУБХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

Кузнецова В.Л.¹, Соловьева А.Г.¹, Перетягин С.П.², Костина О.В.¹, Преснякова М.В.¹, Мартусевич А.А.²

¹ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: kuznetsova07@list.ru;

²Ассоциация российских озонотерапевтов, Нижний Новгород, e-mail: psp_aro@mail.ru

Целью работы явилась сравнительная оценка биохимических показателей сыворотки крови после хронического и субхронического ингаляционно-наружного воздействия синглетного кислорода на организм здоровых животных в эксперименте. Исследование выполнено на 19 крысах линии Wistar. Животные разделены на 3 группы: первая состояла из интактных здоровых крыс (контроль), вторая и третья – были подвергнуты хроническому и субхроническому воздействию газовой смеси, содержащей синглетный кислород, соответственно. В качестве генератора синглетного кислорода использовали аппарат Airnergy Professional (Германия) при мощности 100%. Процедуру проводили ежедневно в течение 30 дней, продолжительностью 10 минут. Крыс второй группы выводили из эксперимента на 30-е сутки (сразу после окончания курса воздействия синглетным кислородом), животных третьей группы – на 60-е сутки (спустя 30 суток после окончания курса воздействия синглетным кислородом). Определение биохимических показателей сыворотки крови проводили на анализаторе ILAB 650 (Италия, США, Япония). Хроническое воздействие синглетного кислорода способствовало снижению содержания в сыворотке крови глюкозы, повышению активности аспартатаминотрансферазы и концентрации мочевины, на фоне низкого уровня альбуминов. Кроме того, наблюдалось снижение активности щелочной фосфатазы. Субхроническое воздействие синглетного кислорода в отличие от хронического способствовало повышению содержания глюкозы, росту активности аспартатаминотрансферазы, снижению уровня общего белка, при сохраняющейся низкой концентрации альбуминов. Наблюдаемые нарушения белкового и углеводного обмена в экспериментальных группах свидетельствовали об истощении адаптационных возможностей организма.

Ключевые слова: синглетный кислород, биохимические показатели, сыворотка.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD SERUM AFTER CHRONIC AND SUBCHRONIC INFLUENCE OF SINGLET OXYGEN

Kuznetsova V.L.¹, Soloveva A.G.¹, Peretyagin S.P.², Kostina O.V.¹, Presnyakova M.V.¹, Martusevich A.A.²

¹Federal State Budgetary educational Institution higher education «Privolzhsky Research Medical university» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, e-mail: kuznetsova07@list.ru;

²Association of Russian Ozone Therapists, Nizhny Novgorod, e-mail: psp_aro@mail.ru

The purpose of the work was a comparative assessment biochemical indicators of chronic and subchronic influence of singlet oxygen on an animal organism in the experiment. The research was performed on 19 Wistar rats. Animals were divided into 3 groups: the first group consisted from intact healthy rats (control), the second and the third groups were exposed to the influence of gaseous singlet oxygen, chronic and subchronic influence respectively. The gas mixture was synthesized by the apparatus «Airnergy Professional» (Germany) for generating singlet oxygen at a power of 100%. The course of inhalation was carried out daily within days 30, the duration of exposure was 10 minutes. Rats of the second group were brought out of experiment for the 30th days after the termination of the course of action by singlet oxygen. Animals of the third group were brought out of experiment for the 60th days (and days 30 after the termination of the course of action by singlet oxygen) from the beginning of experiment. Determination of biochemical parameters of blood serum was performed on the automatic analyzer ILAB 650 (Italy, USA, Japan). The chronic indicators of singlet oxygen contributes to a decrease in serum glucose, an increase in aspartate aminotransferase activity and urea concentration against a background of low albumin levels. In addition, a decrease in the activity of alkaline phosphatase is observed. The subchronic influence of singlet oxygen, unlike the chronic one, promoted an increase in the glucose content, a increase in the activity of aspartate aminotransferase, a decrease in the level of the total protein, while the albumin concentration remained low. Observed violations of protein and carbohydrate metabolism in experimental groups indicated the depletion of the adaptive capabilities of the organism.

Keywords: singlet oxygen, biochemical parameters, serum.

Использование синглетного кислорода (СК) в медицине является сравнительно новым методом кислородотерапии. Отмечают эффективность его применения при различных заболеваниях: хроническом обструктивном бронхите, бронхиальной астме, кардиологических заболеваниях, ревматизме [1].

Известно, что, с одной стороны, низкие дозы СК оказывают антиоксидантное (инактивируют НАДФН-оксидазу) и мембранопротекторное действие. Применение синглетного кислорода нормализует содержание гемоглобина, активирует фагоцитоз и фосфорилирующее дыхание митохондрий [2].

С другой стороны, СК обладает сильным окислительным потенциалом, провоцирует образование в среде других активных форм кислорода в высоких концентрациях. Этот процесс сопровождается интенсификацией свободнорадикального окисления и может вызвать окислительный стресс, т.е. является цитотоксическим для живых клеток [3-5]. Высокие дозы синглетного кислорода вызывают окислительное повреждение белков (коллагена эпителия кожи, каталазы, супероксиддисмутазы), некоторых аминокислот (метионина, гистидина, триптофана), нуклеозидов, липидов, полисахаридов и других клеточных компонентов. В результате прямого окисления сульфгидрильных групп в активных центрах ферментов (в том числе локализованных в мембранах) происходит инактивация последних и увеличение проницаемости мембран, разрушение соединений, обладающих антиоксидантной активностью (витаминов, стероидов, убихинона), а также ДНК в результате модификации гуанилового основания [2]. Таким образом, синглетный кислород может как стимулировать метаболизм, так и индуцировать клеточную смерть.

В результате вышеизложенного становится понятна необходимость изучения хронического и субхронического воздействия синглетного кислорода на организм для возможности прогнозирования степени безопасности его применения.

Целью исследования явилась сравнительная оценка по биохимическим показателям сыворотки крови хронического и субхронического ингаляционно-наружного воздействия синглетного кислорода на организм здоровых животных в эксперименте.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 19 крысах-самцах линии Wistar (массой 350–400 г). В исследовании из них были сформированы 3 группы: первая состояла из интактных здоровых животных (контроль, n=8), вторая (n=6) и третья (n=5) - подвергались хроническому и субхроническому воздействию газовой смеси, содержащей синглетный кислород, соответственно. В качестве генератора СК использовали аппарат Airnergy Professional (Германия) при мощности 100%. Для ингаляционно-наружного воздействия синглетным кислородом животных помещали в эксикатор. Процедуру проводили ежедневно в течение 30

дней, продолжительностью 10 минут. Крыс второй группы выводили из эксперимента на 30-е сутки (сразу после окончания курса воздействия синглетным кислородом), животных третьей группы – на 60-е сутки (спустя 30 суток после окончания курса воздействия СК) путем декапитации под комбинированным наркозом (золетил 60 мг/кг + ксила 6 мг/кг). Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC.

Определение биохимических показателей углеводного (глюкоза), липидного (общий холестерин), пигментного (общий билирубин), пуринового (мочевая кислота) и белкового (общий белок, альбумины, мочевины, креатинин, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза) обмена выполнено на автоматическом анализаторе ILAB 650 (Италия, США, Япония).

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

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что у крыс при хроническом воздействии синглетного кислорода снижено содержание глюкозы в сыворотке крови по сравнению с интактными животными (табл. 1). Вероятно, это связано с активным использованием глюкозы в процессе гликолиза. В последнее время накапливаются факты о том, что при повышении уровня активных форм кислорода в клетке наблюдается активация фактора транскрипции каппа В (NF- κ B), а также образование белков (транскрипционный фактор AP-1, гипоксия-индуцибельный фактор HIF-1 α , HIF-3 α и др.), чья активность способствует адаптации и выживаемости клеток в условиях гипоксии. Среди «гипоксических» белков отмечают ферменты гликолиза [6].

В отличие от хронического воздействия, при субхроническом - уровень глюкозы в крови выше, чем в контроле. Известно, что в случае невозможности нейтрализовать избыток активных форм кислорода в организме происходит активация каскада реакций, вызывающих хаотическую (по типу некроза) или программируемую (апоптоз) смерть клетки [7]. Важно отметить различную чувствительность внутренних органов к активным формам кислорода [4]. Известно, что β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы обладают слабой антиоксидантной активностью и поэтому наиболее подвержены деструктивному воздействию СК, что способствует снижению выработки инсулина и повышению уровня глюкозы в крови [6].

Таблица 1

Изменение биохимических показателей сыворотки крови при хроническом и субхроническом

воздействии синглетного кислорода

Анализируемые показатели	Первая группа, n=8	Вторая группа, n=6	Третья группа, n=5
Глюкоза, ммоль/л	13,3* 12,00 – 16,65**	9,2 7,90 – 10,60 p ₁ = 0,005	19,7 18,50 – 20,10 p ₂ = 0,011 p ₃ = 0,004
Мочевина, ммоль/л	5,05 4,05 – 5,85	6,20 5,80 – 6,20 p ₁ = 0,020	5,40 5,20 – 5,50 p ₂ = 0,724 p ₃ = 0,004
Креатинин, мкмоль/л	66,85 64,90 – 68,65	67,85 67,20 – 68,90 p ₁ = 0,345	67,30 67,00 – 68,20 p ₂ = 0,622 p ₃ = 0,662
Общий билирубин, мкмоль/л	1,63 1,570 – 1,830	1,45 1,300 – 1,700 p ₁ = 0,394	1,50 1,200 – 1,800 p ₂ = 0,537 p ₃ = 0,931
Мочевая кислота, мкмоль/л	60,0 51,00 – 70,00	54,0 42,50 – 76,50 p ₁ = 0,788	70,0 32,00 – 91,00 p ₂ = 0,755 p ₃ = 1,000
Общий холестерин, ммоль/л	1,55 1,350 – 1,700	1,60 1,300 – 1,800 p ₁ = 1,000	1,20 1,200 – 1,400 p ₂ = 0,065 p ₃ = 0,126

Примечания: n – количество животных; * – медиана; ** – квартильный размах; p₁ – достоверность различия анализируемых параметров в графе 1 и 2, p₂ – в графе 1 и 3, p₃ – в графе 2 и 3.

Отмечено, что ингаляционно-наружное применение синглетного кислорода вызвало повышение активности аспаратаминотрансферазы (АСАТ) как во второй, так и в третьей группе по сравнению с контролем (табл. 2). Следует отметить, что при субхроническом воздействии СК активность АСАТ была выше, чем при хроническом. В то же время ингаляционно-наружное применение синглетного кислорода не привело к изменению активности аланинаминотрансферазы (АЛАТ) в сыворотке крови, что позволяет предположить отсутствие повреждения клеток печени. Известно, что степень повышения активности аспаратаминотрансферазы в крови прямо пропорциональна глубине и обширности поражения ткани сердечной мышцы. Под воздействием СК образуются вторичные долгоживущие физиологически активные биорадикалы, вызывающие окисление холестерина и развитие сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Кроме того, интенсификация свободнорадикальных реакций в мембранных структурах клеток является пусковым механизмом развития ишемических повреждений различных органов, в том числе сердца [8;

9]. Этот эффект находит свое подтверждение в появлении диапедезных кровоизлияний в скелетных мышцах и миокарде подопытных мышей при моделировании патологий со свободнорадикальной природой [4; 10].

Таблица 2

Изменение показателей белкового обмена при хроническом и субхроническом воздействии синглетного кислорода

Анализируемые показатели	Первая группа, n=8	Вторая группа, n=6	Третья группа, n=5
Общий белок, г/л	63,8* 61,10–68,55**	63,6 62,80 – 65,50 p ₁ = 0,950	60,9 60,70 – 61,30 p ₂ = 0,171 p ₃ = 0,030
Альбумины, г/л	23,9 22,70 – 25,95	20,2 19,80 – 22,70 p ₁ = 0,020	20,5 20,20 – 21,10 p ₂ = 0,003 p ₃ = 0,931
Глобулины, г/л	39,8 37,30 – 43,60	43,2 41,70 – 44,10 p ₁ = 0,142	41,1 39,80 – 41,90 p ₂ = 0,833 p ₃ = 0,052
Аспаратамино- трансфераза, ед./л	157,1 121,9 – 169,8	216,0 199,6 – 220,1 p ₁ = 0,014	338,3 228,2 – 410,4 p ₂ = 0,006 p ₃ = 0,019
Аланинамино- трансфераза, ед./л	72,7 59,80 – 85,55	96,1 79,40 – 112,80 p ₁ = 0,142	72,4 58,90 – 94,90 p ₂ = 0,776 p ₃ = 0,381
Щелочная фосфатаза, ед./л	192 171,5 – 237,5	120 103,0 – 155,0 p ₁ = 0,013	156,0 130,0 – 164,0 p ₂ = 0,065 p ₃ = 0,126

Примечания: n – количество животных; * – медиана; ** – квартильный размах; p₁ – достоверность различия анализируемых параметров в графе 1 и 2, p₂ – в графе 1 и 3, p₃ – в графе 2 и 3.

Установлено, что у животных, подвергшихся хроническому воздействию СК, содержание мочевины было выше по сравнению с контролем на фоне нормального уровня креатинина, что, по-видимому, связано с отсутствием нарушения функционального состояния почек (табл. 1). Мочевина является маркером деструктивных процессов и эндогенной интоксикации [11]. Её повышение, вероятно, связано с высокой реакционной способностью синглетного кислорода и образующихся под его воздействием перекисей липидов, которые способствуют повреждению клеток органов, в том числе, как было рассмотрено выше, сердца и поджелудочной железы. В отличие от хронического

воздействия синглетного кислорода, при субхроническом - концентрация мочевины была в норме. Возможно, это связано с тем, что в третьей группе по сравнению со второй содержание общего белка было ниже (табл. 2), что могло способствовать уменьшению концентрации конечного продукта белкового обмена - мочевины.

Выявлено, что у крыс как при хроническом, так и субхроническом воздействии синглетного кислорода уровень альбуминов был ниже, чем в контроле (табл. 2). Основным механизмом повреждающего действия синглетного кислорода является «оксидативный» стресс, который сопровождается усилением катаболических процессов, мобилизацией пластических и энергетических ресурсов [8]. Возможно, что при таких условиях повышается использование альбуминов как основного резервного источника аминокислот в организме, необходимых как для энергетических (в глюконеогенезе), так и для репаративных процессов [12; 13]. Между хроническим и субхроническим воздействием по данному показателю статистически достоверных изменений обнаружено не было.

При хроническом воздействии синглетного кислорода наблюдалось снижение активности щелочной фосфатазы по отношению к контролю (табл. 2). Известно, что любое внешнее воздействие (в том числе ингаляция синглетного кислорода) сопровождается активацией оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники с экстренной мобилизацией адаптивных систем организма, энергетических и пластических резервов. При длительном хроническом воздействии внешнего фактора может происходить чрезмерное функциональное напряжение адаптивных систем с избыточной продукцией катехоламинов и кортикостероидов, которые приводят к смещению рН биологических жидкостей в кислую сторону (ацидоз), что может способствовать изменению активности щелочной фосфатазы (ЩФ). С другой стороны, ЩФ является металлоферментом, т.к. в состав её активного центра входит атом цинка. Цинк относится к ферментной системе антиоксидантной защиты, выполняя роль ловушки (перехватчика) свободных радикалов, т.о. тормозит развитие цепной реакции образования новых радикалов [4]. Вероятно, в результате прямого окисления металла переменной валентности – цинка - происходит инактивация фермента. При субхроническом воздействии синглетного кислорода активность щелочной фосфатазы была в пределах нормы.

У крыс после хронического воздействия синглетного кислорода не было выявлено статистически значимых отличий в показателях активности аланинаминотрансферазы, содержания креатинина, общего белка, глобулинов, общего билирубина, мочевой кислоты, общего холестерина по сравнению с интактной группой. Следует отметить, что при субхроническом ингаляционном применении синглетного кислорода активности АЛАТ и щелочной фосфатазы, концентрация мочевины, креатинина, общего белка, глобулинов, общего билирубина, мочевой кислоты, общего холестерина в сыворотке крови практически

не отличались от значений контроля.

Между второй и третьей группой обнаружены статистически достоверные изменения только по четырем показателям (глюкоза, АСАТ, мочевины, общий белок), которые рассматривались выше. Необходимо дальнейшее исследование возможности токсического влияния ингаляций синглетного кислорода на организм для понимания механизмов его действия и значимости применения СК в терапевтической практике.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что хроническое воздействие синглетного кислорода способствует снижению содержания в сыворотке крови глюкозы, повышению активности аспаратаминотрансферазы и концентрации мочевины на фоне низкого уровня альбуминов. Кроме того, наблюдалось снижение активности щелочной фосфатазы.

Субхроническое воздействие синглетного кислорода, в отличие от хронического, способствовало повышению содержания глюкозы, снижению уровня общего белка, при сохраняющейся низкой концентрации альбуминов. При субхроническом воздействии активность аспаратаминотрансферазы была выше, чем при хроническом.

Нарушения углеводного и белкового обмена при хроническом и субхроническом воздействии синглетного кислорода указывают на истощение адаптационных возможностей организма. Необходимо дальнейшее исследование возможности токсического влияния ингаляций синглетного кислорода на организм для понимания механизмов его действия и значимости применения в терапевтической практике.

Список литературы

1. Романко Ю.С. Фотодинамическая терапия ревматоидного артрита / Ю.С. Романко, М.А. Каплан, В.В. Попучиев и др. // Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). – 2014. – № 1 (23). – С. 66-77.
2. Мартусевич А.А. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы / А.А. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.К. Мартусевич // СТМ. – 2012. – № 2. – С. 128-132.
3. Разумовский А.В. Экспериментальная оценка проадаптивных эффектов ингаляций синглетного кислорода / А.В. Разумовский, А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич и др. // Вестник новых медицинских технологий: электронный научный журнал. – 2016. – № 4 [Электронный ресурс]. - URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2016-4/7-7.pdf> (дата обращения: 15.12.2017).

4. Купчинская С.С. Биологическая и патогенетическая роль антиоксидантной системы в функционировании живого организма // Тольяттинский медицинский консилиум. – 2014. – № 1-2. – С. 56-59.
5. Bhat A.H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight / A.H. Bhat, K.B. Dar, S. Anees et al. // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2015. – № 74. – P. 101-110.
6. Литвинова Л.С. Патогенез инсулинорезистентности при метаболическом ожирении / Л.С. Литвинова, Е.В. Кириенкова, И.О. Мазунин и др. // Биомедицинская химия. – 2015. – № 1 (61). – С. 70-82.
7. Thanan R. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer / R. Thanan, S. Oikawa, Y. Hiraku et al. // Mol. Sci. – 2015. – № 1 (16). – P. 193-217.
8. Ходос М.Я. Окислительный стресс и его роль в патогенезе / М.Я. Ходос, Я.Е. Казаков, М.Б. Видревич, Х.З. Брайнина // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2017. – № 4 (14). – С. 381-398.
9. Wray D.W. Peripheral vascular function, oxygen delivery and utilization: the impact of oxidative stress in aging and heart failure with reduced ejection fraction / D.W. Wray, M.A. Amann, R.S. Richardson // Heart Fail Rev. – 2017. – № 22. – P. 149-66.
10. Листов М.В. Концентрация свободных радикалов в организме млекопитающих в условиях изменения активности супероксид-генерирующей и антиоксидантной систем / М.В. Листов, А.И. Мамыкин // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2014. – № 1 (45). – С. 121-126.
11. Рослый И.М. Правила чтения биохимического анализа / И.М. Рослый, М.Г. Водолажская. – М.: Медицинское информационное агентство, 2014. – 102 с.
12. О чем говорят медицинские анализы [под ред. В.С. Камышникова]. - М.: МЕДпресс-информ, 2015. – 224 с.
13. Гольберг Н.Д. Гипертрофия скелетных мышц и питание спортсменов / Н.Д. Гольберг, В.А. Рогозкин // Вестник спортивной науки. – 2014. – № 6. – С. 31-35.