

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МЕТАБОЛИЗМА КРОВИ ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Отделение экспериментальной медицины ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России,
Россия, 603155, г. Нижний Новгород, Верхне-Волжская набережная, 18;
тел. 8 (831) 436-25-31. E-mail: sannag5@mail.ru*

Исследованы особенности метаболизма крови животных при субхроническом воздействии газообразной смеси, содержащей синглетный кислород. Эксперимент проведен на крысах линии Wistar. В крови определяли концентрацию глюкозы, лактата, активность каталазы, альдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы через 30 и 60 суток после ингаляций газовой смеси, содержащей синглетный кислород. Показано, что применение на протяжении 30 суток газовой смеси, содержащей синглетный кислород, вызывает повышение детоксикационной функции, антиоксидантных резервов эритроцитов, уменьшение концентрации глюкозы в крови, снижение коэффициента баланса энергетических реакций, накопление лактата в эритроцитах. Отдаленные результаты (60 суток) применения синглетного кислорода свидетельствуют о нарушении энергетического метаболизма крови на фоне нормализации активности альдегиддегидрогеназы, повышения каталазы эритроцитов, возрастания концентрации глюкозы в крови.

Ключевые слова: синглетный кислород, кровь, лактат, глюкоза, оксидоредуктазы.

A. G. SOLOVEVA, S. P. PERETYAGIN

ASSESSMENT OF BLOOD METABOLISM UNDER THE SUBCHRONIC INFLUENCE TO SINGLET OXYGEN IN EXPERIMENT

*Federal state budgetary institution «Privolzhsky federal research medical centre»
of the Ministry of health of the Russian Federation,
Russia, 603155, Nizhny Novgorod, Verkhne-Volzhskaya embankment, 18;
tel. 8 (831) 436-25-31. E-mail: sannag5@mail.ru*

The metabolic characteristics of blood of animals following subchronic exposure of gaseous mixtures containing singlet oxygen were investigated. The experiment was carried out on Wistar rats. In the blood the concentration of glucose, lactate, the activity of catalase, aldehyde dehydrogenase, lactate dehydrogenase were determined after 30 and 60 days after externally-inhalation. It is shown that prolonged use for 30 days gas mixture containing singlet oxygen, increases the detoxification function and antioxidant reserve of erythrocytes, decreases the concentration of glucose in blood, leading to reduction of the coefficient of energy reaction balance and the accumulation of lactate in erythrocytes. Long-term results (60 day) of externally-inhalation of a gas mixture containing singlet oxygen, reveal a violation of energy metabolism blood normalizing the specific activity of aldehyde dehydrogenase and increasing the catalase of erythrocytes, increasing concentration of glucose in blood.

Key words: singlet oxygen, blood, lactate, glucose, oxidoreductase.

Введение

Синглетно-кислородная терапия в настоящее время является новым методом кислородотерапии на основе применения синглетно-кислородных смесей [2, 8, 13]. Показана эффективность использования синглетного кислорода (СК) при лечении хронического обструктивного бронхита, бронхиальной астмы, сахарного диабета, кардиологических заболеваний, ревматизма [2]. Применение СК нормализует содержание гемоглобина, углеводный обмен, активирует фагоцитоз и фосфорилирующее дыхание митохондрий [4]. В то

же время СК играет ключевую роль при развитии ряда патологических процессов, таких как катаракта, протопорфирии, синдром ишемии-реперфузии [8, 11, 12]. Кроме этого применение любых активных форм кислорода в биологии и медицине с саногенетическими целями сопровождается интенсификацией свободнорадикального окисления, активацией процессов перекисного окисления липидов биологических мембран, направленными на адаптивное в условиях гиперметаболизма повышение клеточной проницаемости. Усиленная продукция активных форм кислорода

вызывает окислительный стресс [4, 5]. В этой связи актуальна проблема изучения метаболизма крови при использовании синглетного кислорода в условиях его хронического воздействия на организм в норме и при нарушении функций организма в условиях патологии для определения степени безопасности применения СК.

Целью исследования явилось изучение активности оксидоредуктаз, концентрации лактата и глюкозы в крови экспериментальных животных, подвергнутых субхроническому ингаляционно-наружному воздействию газовой смеси, содержащей синглетный кислород.

Материалы и методы исследования

Эксперимент был проведен на белых крысах-самцах линии Wistar, полученных из филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, г. Москва). Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания согласно нормативам ГОСТ «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC [6]. После 14-дневной адаптации к условиям местного вивария и карантина из 19 крыс массой 200–250 г сформировали 3 группы: первая – контроль (интактные здоровые животные, n=8); вторая – опытная (n=6), в которой крысы были подвергнуты ежедневному воздействию (по 10 минут) газовой смеси, содержащей СК, в течение 30 дней; третья – опытная (n=5), животные которой на протяжении 30 суток ежедневно ингалировались по 10 минут газовой смесью с синглетным кислородом и затем 30 суток не подвергались никаким манипуляциям. Крыс второй группы выводили из эксперимента на 30-е сутки, животных третьей группы – на 60-е сутки путем декапитации под комбинированным наркозом: золетил (60 мг/кг) + ксила 6 мг/кг). Ингаляционно-наружное воздействие СК на животных осуществляли в эксикаторе. Воздушный поток с СК получали с применением аппарата «Airnergy» (Германия) при мощности генератора 100%. Кровь стабилизировали цитратом натрия (1:9). Для исследований использовали плазму и эритроциты, двукратно отмытые в физиологическом растворе путем центрифугирования 10 мин при 1600 g.

Концентрацию глюкозы и лактата измеряли на приборе «Super GL ambulance» (Германия) в плазме и эритроцитах крови. В гемолизате отмытых эритроцитов (1:100) определяли активность каталазы спектрофотометрическим методом, осно-

ванным на оценке скорости разложения 3%-ного раствора перекиси водорода каталазой эритроцитов с образованием воды и кислорода [7]. Для исследования активности альдегиддегидрогеназы (АлДГ) [3] и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) использовали гемолизат отмытых эритроцитов (1:40). Каталитические свойства лактатдегидрогеназы в прямой реакции (ЛДГ_{пр}) оценивали с использованием в качестве субстрата 50 мМ лактат натрия, в обратной реакции (ЛДГ_{обр}) – с использованием 23 мМ пируват натрия [10]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури в модификации [14]. Для выявления нарушений энергетического метаболизма рассчитывали коэффициент баланса энергетических реакций (КБЭР): $КБЭР = (ЛДГ_{пр} / ЛДГ_{обр}) / (ЛДГ_{обр} / ЛДГ_{пр}) \times 100$ [10]. Активность оксидоредуктаз, количество белка определяли на спектрофотометре «Power Wave XS» («Bio-Tek», США). Результаты исследований обрабатывали с использованием программы «Statistica 6.0». Значимость различий между показателями определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Показано, что ингаляционно-наружное применение газовой смеси, содержащей СК, в течение 30 суток привело к снижению концентрации глюкозы в плазме и эритроцитах крови на 18% ($p=0,031$) и 19% ($p=0,027$) соответственно по сравнению с контролем (рис. 1). Падение уровня глюкозы под влиянием газовой смеси, содержащей синглетный кислород, вероятно, можно объяснить активацией аэробного гликолиза, повышением каталитических свойств глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [1], участвующей в утилизации глюкозы. В восстановительный период (спустя 60 суток) после воздействия СК отмечен рост уровня глюкозы в плазме крови в 2,24 раза ($p=0,009$) по сравнению с 30 сутками и в 1,83 раза ($p=0,012$) по сравнению

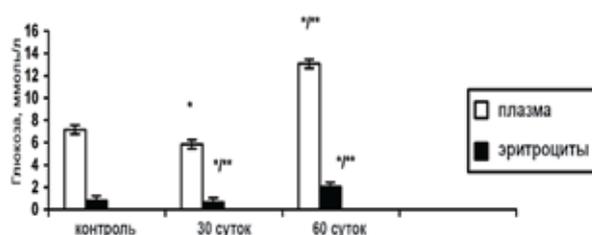


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови крыс при субхроническом воздействии синглетного кислорода

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$).

с показателем интактных крыс. В эритроцитах также возросла концентрация глюкозы в третьей опытной группе при применении газообразного СК в 3,20 раза ($p=0,001$) по сравнению с показателем второй опытной группы и в 2,59 раза ($p=0,006$) по сравнению со здоровыми животными. Выявленную гипергликемию, с одной стороны, можно рассматривать как энергетическое подкрепление адаптационных ресурсов крови для длительного применения синглетного кислорода, возможно, в результате активации процессов гликолиза, глюконеогенеза и гликогенолиза. Синглетный кислород, как стресс-фактор, может активировать гипоталамо-гипофизарно-адреноренкортикальную систему, под воздействием которой стимулируется выработка глюкокортикоидов, влияющих на метаболизм, способствуя мобилизации энергетических ресурсов. Основное действие глюкокортикоидов в сфере углеводного обмена заключается в стимуляции печеночного глюконеогенеза с увеличением образования глюкозы. Конечным итогом является развитие гипергликемии [1]. С другой стороны, нельзя исключить цитотоксического воздействия активных форм кислорода на ткани организма, в частности, на клетки поджелудочной железы, которые обладают слабой антиоксидантной активностью и, вероятно, наиболее подвержены деструктивному воздействию СК [5]. Дисфункция поджелудочной железы способствует снижению выработки инсулина и повышению глюкозы в крови. Снижение распада глюкозы может привести к накоплению лактата.

Установлено, что через 30 суток после применения газообразной смеси, содержащей СК, содержание лактата уменьшилось в плазме крови на 38% ($p=0,041$) по сравнению с интактными животными (рис. 2). В третьей опытной группе отмечена тенденция к росту уровня лактата в плазме на 20% ($p=0,061$) по сравнению с показателем второй опытной группы, при этом концентрация молочной кислоты оказалась

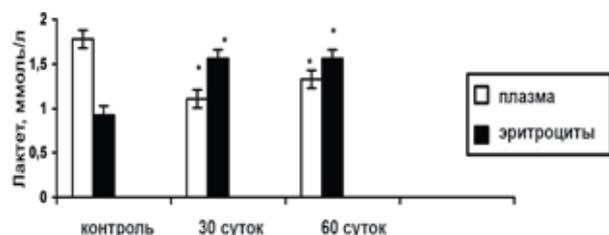


Рис. 2. Концентрация лактата в крови крыс при субхроническом воздействии синглетного кислорода

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p<0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p<0,05$).

ниже на 25% ($p=0,033$) по сравнению с контролем. Ингаляционно-наружное использование СК во второй и третьей опытных группах вызвало увеличение уровня молочной кислоты в эритроцитах на 68% ($p=0,012$) соответственно по сравнению с контролем. Накопление лактата ведет к уменьшению pH крови и снижению концентрации бикарбоната, приводя к развитию метаболического ацидоза.

Исследование активности лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27), катализирующей обратимое превращение лактата в пируват, показало, что воздействие газообразной смеси, содержащей СК, вызвало снижение удельной активности ЛДГ_{об} во второй и третьей опытных группах на 32% ($p=0,022$) и 50% ($p=0,009$) соответственно по сравнению с интактными животными (табл. 1). Под влиянием СК удельная активность ЛДГ_{об} возросла во второй и третьей опытных группах на 40% ($p=0,012$) и 58% ($p=0,010$) соответственно по сравнению с контролем, что привело к росту уровня лактата в эритроцитах.

При вычислении интегрального показателя, характеризующего динамику метаболизма, установлено, что через 30 и 60 суток после воздействия газовой смеси, содержащей СК, КБЭР оказался ниже показателя КБЭР здоровых крыс в 5,27 раза ($p=0,005$) и 10,04 раза ($p=0,001$), что свидетельствует о нарушении энергетического метаболизма и, как следствие, увеличении содержания молочной кислоты в эритроцитах.

Восстановление пирувата в лактат сопровождается одновременным окислением алкоголя в ацетальдегид при помощи НАДН, который действует как интермедиарный переносчик водорода. Наряду с ацетальдегидом такие токсичные среднепечочные альдегиды, как алканыли, алкеныли и 4-гидроксиалкеныли, генерализуются в результате усиления липидной пероксидации, которая может быть вызвана действием активных форм кислорода. В ходе проведенного исследования выявлено, что во второй опытной группе ингаляционно-наружное применение газовой смеси, содержащей СК, привело к увеличению удельной активности одного из ферментов детоксикации, альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3), на 64% ($p=0,021$) по сравнению с контролем (табл. 2).

Через 60 суток после применения газообразной смеси, содержащей СК, активность альдегиддегидрогеназы уменьшилась на 46% по сравнению с показателем второй опытной группы. Уменьшение активности АлДГ способствует накоплению альдегидов, оказывающих повреждающее действие на ткани путем связывания с каталитическими центрами ферментов, следствием чего является нарушение метаболизма клетки. Падение каталитических свойств АлДГ может привес-

Активность лактатдегидрогеназы и коэффициент баланса энергетических реакций в эритроцитах крови крыс при субхроническом воздействии синглетного кислорода

Показатель	Контроль	30 суток	60 суток
ЛДГ _{пр.} , нмольНАДН/мин×мг белка	73,45±3,21	44,92±1,11*	36,62±1,21*/**
ЛДГ _{обр.} , нмольНАДН/мин×мг белка	91,97±4,01	129,03±4,19*	145,16±3,52*/**
КБЭР	63,82±1,72	12,12±0,43*	6,36±0,12*/**

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$);
** – различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$).

Таблица 2

Активность альдегиддегидрогеназы и каталазы в эритроцитах крови крыс при субхроническом воздействии синглетного кислорода

Показатель	Контроль	30 суток	60 суток
АлДГ, нмольНАДН/мин×мг белка	20,25±1,21	33,19±0,87*	17,99±0,59**
Каталаза, усл. ед/мин×мг белка	19,30±0,58	24,83±0,54*	33,65±1,21*/**

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$);
** – различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$).

ти к срыву всей системы детоксикации, вызывая уменьшение защиты эритроцитов от окислительного действия эндотоксинов [9].

Известно, что увеличение альдегидов происходит также вследствие повышения активности фермента антиоксидантной защиты каталазы (КФ 1.11.1.6), участвующей в окислении спиртов и защищающей клеточные мембраны от повреждающего действия свободных радикалов. Под влиянием газовой смеси, содержащей синглетный кислород, показано повышение активности каталазы на 27% ($p = 0,012$) через 30 суток и на 74% ($p = 0,001$) через 60 суток после воздействия по сравнению с контролем, что обеспечивает эффективную защиту клеточных структур от разрушения под действием перекиси водорода, но также может привести к накоплению высокотоксичных метаболитов. Следовательно, статистически значимое повышение активности каталазы при ингаляционно-наружном воздействии газовой смеси, содержащей синглетный кислород, может свидетельствовать о положительных изменениях антиоксидантных ресурсов эритроцитов.

Таким образом, показано, что длительное воздействие на протяжении 30 суток газовой смеси, содержащей синглетный кислород, вы-

зывает, с одной стороны, повышение детоксикационной функции крови и антиоксидантных резервов эритроцитов, снижение концентрации глюкозы в плазме и эритроцитах, с другой стороны, приводит к нарушению энергетического метаболизма, что проявляется в снижении показателя КБЭР и накоплении лактата в эритроцитах. Отдаленные результаты (60 суток) ингаляционно-наружного применения газовой смеси, содержащей СК, свидетельствуют о нарушении энергетического метаболизма крови на фоне нормализации удельной активности альдегиддегидрогеназы и повышении ферментативной антиоксидантной защиты (каталазы) эритроцитов, возрастании концентрации глюкозы в плазме и эритроцитах крови. Необходимо дальнейшее исследование возможности токсического влияния ингаляций синглетного кислорода на организм для понимания механизмов его действия и значимости применения СК в терапевтической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

2. *Заворотная Р. М.* Синглетный кислород при лечении ряда патологических процессов: физико-химические аспекты // Украинский ревматологический журнал. – 2002. – № 1. – С. 35–37.

3. *Кершенгольц Б. М., Ильина Л. П.* Биологические аспекты алкогольных патологий и наркоманий. – Якутск: издательство ЯГУ, 1998. – 150 с.

4. *Костюк В. А., Потапович А. И.* Биорадикалы и биоантиоксиданты: Монография. – Минск: БГУ, 2004. – 174 с.

5. *Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З., Бондарь И. А., Труфакин В. А.* Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2008. – 284 с.

6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010. – 358 с.

7. *Сибгатуллина Г. В., Хаертдинова Л. Р., Гумерова Е. А.* Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений (учебно-методическое пособие). – Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2011. – 61 с.

8. Синглетно-кислородная терапия (научно-методическое пособие) / Под ред. И. З. Самосюк, Л. И. Фисенко. – Киев: НМЦ «Мединтех», 2007. – 228 с.

9. *Соловьева А. Г.* Роль альдегиддегидрогеназы печени и эритроцитов в развитии ожоговой токсемии у крыс // Вест-

ник Российской академии медицинских наук. – 2009. – № 9. – С. 36–38.

10. *Соловьева А. Г., Зимин Ю. В.* Новый способ оценки динамики метаболизма крови у больных с термической травмой // Современные технологии в медицине. – 2012. – № 2. – С. 116–117.

11. *Dufour Y. S., Landick R., Donohue T. J.* Organization and evolution of the biological response to singlet oxygen stress // J. mol. biol. – 2008. – Vol. 383. № 3. – P. 713–730.

12. *Hwang J. Y., Lubow D. J., Chu D., Sims J., Alonso-Valente F., Gray H. B., Gross Z., Farkas D. L., Medina-Kauwe L. K.* Photoexcitation of tumor-targeted corroles induces singlet oxygen-mediated augmentation of cytotoxicity // J. control. release. – 2012. – Vol. 163. № 3. – P. 368–373.

13. *Riethmüller M., Burger N., Bauer G.* Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis-inducing signaling // Redox. biol. – 2015. – № 6. – P. 157–168.

14. *Waterborg J. H., Matthews H. R.* The Lowry method for protein quantitation // Methods mol. biol. – 1994. – Vol. 32. № 1. – P. 1–4.

Поступила 11.01.2016

А. Н. СТЕБЛЮК¹, Н. В. КОЛЕСНИКОВА², В. Э. ГЮНТЕР³

ЛОКАЛЬНЫЙ ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ИНТРАОКУЛЯРНОГО ВВЕДЕНИЯ ИМПЛАНТАТА С ПАМЯТЬЮ ФОРМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОФТАЛЬМОЛОГИИ

¹*Краснодарский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза»
имени академика С. Н. Фёдорова Минздрава России»,
Россия, 350012, г. Краснодар, ул. Красных партизан, 6;*

²*ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4;*

³*НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы СФТИ при ТГУ,
Россия, 634034, г. Томск, ул. 19 Гвардейской дивизии, 17;
тел. +7 (918) 265-19-56. E-mail: okocentr@mail.kuban.ru*

В статье дана экспериментальная оценка содержания во влаге передней камеры (ВПК) глаза ряда про- и противовоспалительных цитокинов при интраокулярной имплантации дренажного материала из никелида титана и интраокулярного применения монолитной шовной нити ТН-10.

В эксперименте на 26 взрослых кроликах исследовалась влага передней камеры глаза, взятая на 3, 7 и 30-е сутки и через 3 месяца и 1,5 года после интраокулярной имплантации никелида титана ТН-10 в качестве дренажного и фиксационного устройства. Контрольную группу составила ВПК 6 интактных кроликов, а также 5 кроликов, которым было произведено перфорирующее гипотензивное оперативное вмешательство без имплантации дренажного устройства в различные сроки наблюдения.

Установлен противоположный характер изменений баланса цитокинов и соотношения его про- и противовоспалительного звена в динамике после интраокулярной имплантации пористого никелида титана и монолитной нити ТН-10, что свидетельствует о позитивном противовоспалительном влиянии материалов на основе никелида титана и выражается в значительном снижении провоспалительного компонента баланса цитокинов, максималь-