

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.15: 616-001.16

### ВЛИЯНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНГАЛЯЦИЙ ОКСИДА АЗОТА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

*А.Г. Соловьева\*, С.П. Перетягин*

Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр,  
603155, Нижний Новгород, Верхне-Волжская набережная, 18;  
тел.: (831) 436-25-31; факс: (831) 436-05-91; эл. почта: sannag5@mail.ru

Исследованы особенности метаболических процессов крыс Wistar, подвергнутых 10-минутным сеансам ингаляции NO в течение 30 дней. В крови определяли содержание глюкозы и лактата, активность каталазы, альдегиддегидрогеназы (АлДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Ингаляции NO в концентрациях 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm вызывали повышение уровня глюкозы и лактата. Ингаляции оксида азота в концентрации 100 ppm способствовали увеличению удельной активности каталазы. Ингаляционное воздействие всех исследуемых концентраций NO приводило к снижению активности АлДГ, а снижение активности ЛДГ отмечено при концентрациях NO 50-100 ppm.

**Ключевые слова:** оксид азота, кровь, лактат, глюкоза, оксидоредуктазы

**DOI:** 10.18097/PBMC20166202212

#### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепризнанно значение оксида азота (NO) как универсального регулятора клеточного и тканевого метаболизма [1, 2]. NO обладает антиоксидантными, детоксикационными, вазодилатирующими свойствами [3, 4], вызывает расслабление гладких мышц сосудов, участвует в защите от патогенов, является нейромедиатором, регулирует программируемую гибель и пролиферацию клеток, играет важную роль в секреторной и репродуктивной системе [5]. Такое разнообразие эффектов оксида азота обусловлено образованием физиологически активных метаболитов NO и его взаимодействием с различными молекулярными мишенями [6]. В течение многих лет в клинической практике применяют такие широко известные доноры NO как органические нитраты нитроглицерин и его аналоги [7]. При этом малые физиологические дозы NO оказывают цито- и нейропротекторное действие [8]. Высокие концентрации NO активируют воспалительный процесс, оказывают цитотоксическое, антибактериальное, противовирусное, противогрибковое действие [1, 9]. Используя NO в биологии и медицине с саногенетическими целями, следует помнить о проблеме интенсификации свободнорадикального окисления, активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран, приводящей к повышению микроваскулярной проницаемости и системному поражению органов и тканей [10]. Усиленная продукция активных форм кислорода и азота вызывает окислительный и нитрозативный стресс [11, 12]. В связи с этим для определения степени безопасности применения NO целесообразно изучить особенности метаболических процессов крови при использовании разных концентраций NO в условиях их хронического воздействия на организм млекопитающих.

Целью работы явилось изучение активности оксидоредуктаз, концентрации лактата и глюкозы в крови экспериментальных животных, подвергнутых сеансам ингаляционно-наружного воздействия различных концентраций NO (20 ppm, 50 ppm и 100 ppm) в течение 30 дней.

#### МЕТОДИКА

Эксперимент проведен на белых крысах-самцах линии Wistar, полученных из филиала "Столбовая" Научного центра биомедицинских технологий. Животных содержали в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рации питания, согласно нормативам ГОСТа "Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ". Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC [13]. После 14-дневной адаптации к условиям местного вивария и карантина из 23 крыс массой 200-250 г были сформированы 4 группы: первая – контроль (интактные здоровые животные, n=8); животные трёх других экспериментальных групп (по 5 особей в каждой) были подвергнуты воздействию различных концентраций NO (20 ppm, 50 ppm и 100 ppm). Синтез газовой смеси производили с помощью экспериментального аппарата для генерации оксида азота, разработанного в Российском федеральном ядерном центре, Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной физики (г. Саров). Возможный диапазон вырабатываемых им концентраций NO составляет от 20 до 200 ppm [14]. Ингаляционно-наружное воздействие NO на животных осуществляли в эксикаторе ежедневно по 10 мин в течение 30 дней. Крыс выводили из эксперимента на 30-е сутки путём декапитации под комбинированным

## МЕТАБОЛИЗМ КРОВИ ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ОКСИДА АЗОТА

наркозом (золетил (60 мг/кг) + ксила (6 мг/кг)). Кровь стабилизировали цитратом натрия (1:9). Для исследований использовали плазму и эритроциты, двукратно отмытые в физиологическом растворе путём 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 (К.Ф. 1.11.1.6) [12]. Для исследования активности альдегиддегидрогеназы (АлДГ; К.Ф. 1.2.1.3) [15], а также лактатдегидрогеназы (ЛДГ; К.Ф. 1.1.2.7) [16] использовали гемолизат отмытых эритроцитов (1:40). 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

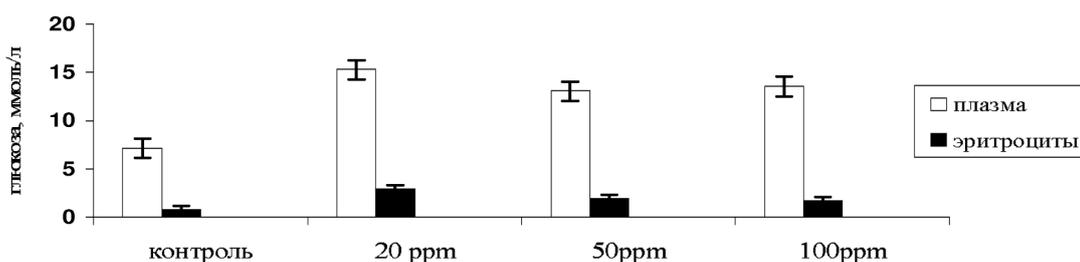
Ингаляционно-наружное применение NO привело примерно к двукратному повышению уровня глюкозы в плазме при всех исследуемых концентрациях NO (рис. 1). Наиболее выраженное повышение содержания глюкозы в плазме отмечено при воздействии NO в концентрации 20 ppm (2,13 раза,  $p < 0,003$ ) при более высоких концентрациях NO отмечено небольшое снижение этого показателя. Аналогичные изменения обнаружены в уровне эритроцитарной глюкозы: при концентрации NO 20 ppm увеличение составило 3,66 раза ( $p=0,001$ ), а 50 ppm и 100 ppm содержание глюкозы выросло в 2,47 и 2,14 раза по сравнению со здоровыми животными ( $p=0,002$  и  $p=0,006$ ) соответственно.

Ингаляционно-наружное применение NO привело к повышению содержания лактата в плазме крови лишь при концентрации 20 ppm в 2,25 раза ( $p=0,007$ ) по сравнению с интактными животными (рис. 2). В эритроцитах увеличение уровня молочной кислоты отмечено при всех используемых концентрациях NO: 20 ppm – в 3,6 раза ( $p=0,012$ ), 50 ppm – в 2,61 раза ( $p=0,003$ ), 100 ppm – в 1,34 раза ( $p=0,022$ ) по сравнению с контролем.

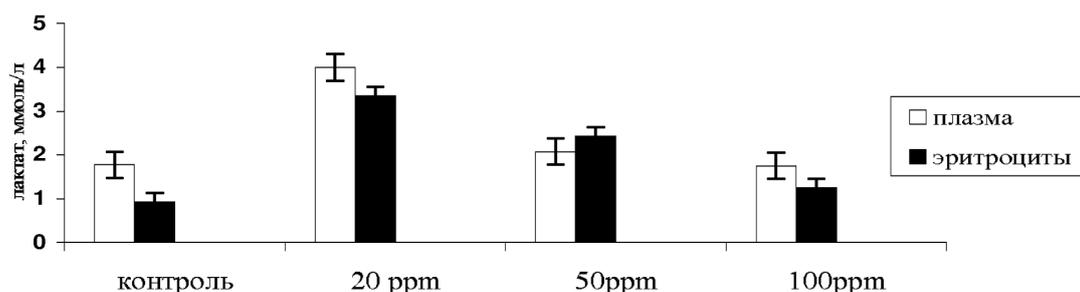
Исследование активности ЛДГ, катализирующей обратимое превращение лактата в пируват, показало, что при воздействии NO в концентрации 20 ppm имело место незначительное (и статистически незначимое) изменение активности ЛДГ, определяемой как в реакции NAD-зависимого окисления лактата (ЛДГпр), так и NADH-зависимого восстановления пирувата (ЛДГобр) с интактными животными (таблица). Под влиянием NO (50 ppm) ЛДГпр снизилась на 47% ( $p=0,032$ ), ЛДГобр – на 18% ( $p=0,017$ ) по сравнению с контролем, что привело к росту уровня лактата в эритроцитах. NO в концентрации 100 ppm вызвал падение удельной активности ЛДГпр на 20% ( $p=0,004$ ), ЛДГобр – на 55% ( $p=0,011$ ) по сравнению с показателями здоровых животных.

Ингаляционно-наружное применение NO привело к статистически значимому снижению активности одного из ферментов детоксикации – АлДГ на 25-30% (таблица). В диапазоне исследуемых концентраций NO снижение активности АлДГ существенно не изменялось, составляя 25% при 20 ppm, 30% при 50 ppm и 24% при 100 ppm по сравнению с контролем (таблица).

Ингаляционно-наружное применение различных концентраций NO оказывало двухфазное действие на активность каталазы, которая снижалась относительно контроля при 20 ppm (на 23%,  $p=0,015$ ), не отличалась от уровня контроля при 50 ppm и повышалась на 40% при 100 ppm ( $p=0,012$ ) по сравнению с контролем.



**Рисунок 1.** Концентрация глюкозы в крови крыс при субхроническом воздействии оксида азота. \* - различия статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 2.** Концентрация лактата в крови крыс при субхроническом воздействии оксида азота. \* - различия статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Таблица. Активность оксидоредуктаз в эритроцитах крови крыс при субхроническом воздействии оксида азота

Показатель	Контроль	20 ppm NO	50 ppm NO	100 ppm NO
ЛДГпр, нмоль NADH/мин×мг белка	73,45±3,21	70,71±4,08	38,58±1,56*	58,42±1,67*
ЛДГобр, нмоль NADH/мин×мг белка	91,97±4,01	101,01±5,98	75,83±4,12*	40,98±3,05*
АлДГ, нмоль NADH/мин×мг белка	20,25±1,21	15,10±0,54*	14,09±0,68*	15,41±0,57*
Каталаза, усл.ед./мин×мг белка	19,30±0,58	14,92±0,21*	17,78±1,12	26,63±1,05*

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что длительное воздействие NO в концентрациях 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm вызывает повышение концентрации глюкозы и лактата. Выявленную гипергликемию можно рассматривать как энергетическое подкрепление со стороны крови на длительное применение NO, наиболее выраженное при концентрации оксида азота в 20 ppm. Ингаляции NO в концентрации 100 ppm способствовали увеличению удельной активности эритроцитарной каталазы, которое может представлять адаптивное изменение в ответ на хроническое действие NO. Ингаляционно-наружное применение NO на протяжении 30 суток во всех исследуемых концентрациях приводит к небольшому снижению активности АлДГ эритроцитов (на 25-30%), а при концентрациях NO 50 ppm и 100 ppm отмечено снижение активности ЛДГ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Малахов В.А., Завгородняя А.Н., Лычко В.С., Джанелидзе Т.Т., Волох Ф.А. (2009) Проблема оксиду азоту в неврологии, Издавництво СумДПУ им. А.С.Макаренка, Суми, 242 с.
2. Bredt D.S. (2003) *Molecular Pharmacology*, **63**, 1206-1208.
3. Рябов Г.А., Азизов Ю.М. (2001) *Анестезиология и реаниматология*, **1**, 8-12.
4. Mokh V.P., Poltorakov A.P., Serezhnikov V.A., Vanin A.F. (2010) *Nitric Oxide*, **22**, 266-274.
5. Lok H.C., Sahni S., Richardson V., Kalinowski D.S., Kovacevic Z., Lane D.J., Richardson D.R. (2014) *Free Radic. Biol. Med.*, **75**, 14-29.
6. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambis S., Colton C.A., Harris C.C., Roberts D.D., Wink D.A. (2008) *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 18-31.
7. Ueno T., Yoshimura T. (2000) *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 95-101.
8. Ballou D.P., Zhao Y., Brandish P.E., Marietta M.A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12097-12101.
9. Dawson V., Dawson T., Bartley D. (1993) *Neurosci.*, **13**, 2651-2661.
10. Ушакова Т.А. (2008) Адаптивные реакции у тяжелообожженных в условиях интенсивной терапии. Дисс. докт. наук, Институт хирургии им. А.В. Вишневского, Москва.
11. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. (2006) Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты, Фирма Слово, М., 556 с.
12. Субатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А. (2011) Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений (учебно-методическое пособие), Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, 61 с.
13. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях (2010) (под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева), Профиль – 2С, М., 358 с.
14. Буранов С.Н., Карелин В.И., Селемир В.Д., Ширишин А.С. (2015) Устройство для получения окиси азота. Пат. РФ 2553290.
15. Кершенгольц Б.М., Ильина Л.П. (1998) Биологические аспекты алкогольных патологий и наркоманий, Издательство ЯГУ, Якутск, 150с.
16. Соловьева А.Г., Зимин Ю.В. (2012) Современные технологии в медицине, **2**, 116-117.
17. Waterborg J.H., Matthews H.R. (1994) *Methods Mol Biol.*, **32**, 1-4.

Поступила: 15. 12. 2015.  
Принята к печати: 09. 03. 2016.

## THE EFFECT OF SUBCHRONIC INHALATIONS OF NITRIC OXIDE ON METABOLIC PROCESSES IN BLOOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS

A.G. Soloveva, S.P. Peretyagin

Privolzhsky Federal Research Medical Centre,  
18 Verhne-Volzhsкая Embankment, Nizhny Novgorod, 603155 Russia;  
tel.: (831) 436-25-31; fax: (831) 436-05-91; e-mail: sannag5@mail.ru

Metabolic processes were investigated in plasma and erythrocytes of Wistar rats exposed to daily 10-min sessions of NO inhalation for 30 days. These included determination of glucose and lactate, catalase activity, and activities of aldehyde dehydrogenase (ALDH), lactate dehydrogenase (LDH), and catalase. NO inhalation in a concentration of 20 ppm, 50 ppm and 100 ppm caused an increase in glucose and lactate. Inhalation of 100 ppm NO also increased catalase activity. Inhalation of all NO concentrations resulted in a decrease of ALDH activity, while the decrease in LDH activity was observed at NO concentrations of 50-100 ppm.

**Key words:** nitric oxide, blood, lactate, glucose, oxidoreductase