

ИЗМЕНЕНИЕ РЕДОКСА-СТАТУСА ЭРИТРОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В ДИНАМИКЕ ГИПЕРОКСИИ

Дмитриев М.М.

Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра биологической химии,
г. Минск

Ключевые слова: эритроциты, гипероксия, осмотическая резистентность эритроцитов.

Резюме: воздействие гипероксии на организм новорожденных животных ведет к уменьшению активности антиоксидантных ферментов эритроцитов и снижению их осмотической резистентности.

Resume: exposure of newborn animals to hyperoxia leads to a decrease in the activity of antioxidant enzymes of red blood cells and reduction of their osmotic resistance.

Актуальность. Практически каждый недоношенный новорожденный ребёнок в процессе лечения получает кислород, необходимый для развития легочной ткани, выработки сурфактанта и поддержания полноценного газообмена. Однако широкое использование оксигенотерапии в большинстве случаев ведет к развитию многочисленных осложнений [1]. На первое место по частоте встречаемости выступает бронхолегочная дисплазия, также могут развиваться ретинопатия, внутримозговые кровоизлияния и другие осложнения. Среди причин возникновения патологических изменений выделяют незрелость легочной ткани и недостаточность антиоксидантных систем у недоношенных детей [2].

Особую актуальность приобретает изучение влияния высоких доз кислорода на эритроциты - единственные клетки, которые имеют только клеточную мембрану и цитоплазму. Особенности строения эритроцитов соответствуют их функциям: большая площадь поверхности обеспечивает эффективность газообмена, эластичная клеточная мембрана облегчает движение по узким капиллярам, специальная ферментативная система защищает эти клетки от активных форм кислорода. Именно в период новорожденности происходят мощные, онтогенетически обусловленные, адаптационные процессы, такие как смена гемоглобина F на гемоглобин A. В этот период изменяется тип газообмена - с плацентарного (внутриутробно) на лёгочный (при рождении) в сочетании с началом энтерального питания. Изменяется сродство гемоглобина к кислороду, появляется склонность к гемолитическим реакциям с последующей анемизацией [3]. Накопление активных форм кислорода в значительных количествах сопровождается целым рядом негативных изменений, среди которых наибольшее значение имеют снижение прочности и разрушение биологических мембран в результате нарушения структуры липопротеинов мембран, структурно-функциональные нарушения ферментных систем, ослабление биосинтеза макроэр-

гических соединений, разрушение мембран эритроцитов, ослабление процессов клеточного дыхания и развитие гемолиза.

Цель: изучить изменение активности антиоксидантных ферментов и осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) у новорожденных морских свинок, которые в течение 7 и 14 суток находились в условиях гипероксии.

Задачи: 1. Определить активность каталазы и СОД в эритроцитах при воздействии гипероксии в течение 7 и 14 суток. 2. Определить содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион-зависимых ферментов в эритроцитах при воздействии гипероксии в течение 7 и 14 суток. 3. Исследовать осмотическую резистентность эритроцитов в динамике гипероксии.

Материал и методы. Эксперименты проводили с использованием новорожденных морских свинок, находившихся на стандартном рационе вивария БГМУ. Исследование проводилось с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными животными. Сразу после рождения животных опытной группы ($n = 4-6$) помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70% (температура 20-25°C, относительная влажность 50-80%). Концентрацию кислорода в камере контролировали с помощью анализатора кислорода ПГК-06-100Р (ЗАО «Инсовт», РФ). Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 7 и 14 дней. Животные контрольной группы ($n = 4-6$) в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг интраперитонеально) и получали кровь для исследования.

По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг интраперитонеально) и получали кровь для исследования.

Кровь использовали для определения осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ). В отмытых эритроцитах спектрофотометрически определяли содержание гемоглобина, активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический тест Манна-Уитни для независимых выборок. Данные представлены как Me (25 перцентиль – 75 перцентиль). Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение.

В эритроцитах новорожденных морских свинок, которые находились в условиях гипероксии в течение 7 суток, активность СОД увеличилась в 2,1 раза по сравнению с интактными животными (табл.1). СОД участвует в обезвреживании супероксидного радикала, источником которого в эритроцитах является процесс спонтанного окисления гемоглобина в метгемоглобин [4]. В обычных условиях окислению подвергается только 0,5% двухвалентного железа в составе гемоглобина, но в условиях гипероксии этот процесс может протекать более интенсивно, что приведет к увеличению продукции супероксидного радикала.

Обезвреживание супероксидного радикала в реакции дисмутации, которую катализирует СОД, ведет к образованию менее токсичного пероксида водорода. По-

этому увеличение активности СОД может привести к увеличению продукции пероксида водорода в эритроцитах. Непосредственной опасности для клетки пероксид водорода не представляет, поскольку быстро разрушается каталазой. Однако, как видно из таблицы 1, активность каталазы в эритроцитах крови новорожденных животных хотя и имела тенденцию к увеличению, но достоверно не изменялась.

Таблица 1 - Активность СОД, каталазы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в эритроцитах новорожденных морских свинок после содержания в условиях гипероксии

Показатель	Время воздействия	Контроль	Опыт
СОД (U/гHb)	7 сут	467,34 435,26 – 576,78	1003,33 * 701,14 – 1256,31
	14 сут	627,07 522,15 – 836,01	689,215 669,04 – 738,23
Каталаза (E/гHb)	7сут	195,33 142,97 – 223,99	234,61 203,30 – 288,96
	14 сут	221,25 151,70 – 222,28	73,05 * 67,85 – 78,25
Гл-6-ф-ДГ (мкмоль/мин/гHb)	7сут	26,51 25,84 – 28,650	22,73 19,00 – 27,20
	14 сут	20,61 19,31 – 22,41	11,9 * 8,32 – 15,02

Примечание: * Различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$

Кроме каталазы в обезвреживании перекисей, в том числе пероксида водорода, активно участвует система глутатиона и глутатионзависимых ферментов (ГП и ГР). ГП непосредственно катализирует расщепление пероксида водорода, используя для этого G-SH. В эритроцитах животных, находившихся в условиях гипероксии 7 суток, активность этого фермента не изменилась, а активность ГР даже снизилась в 1,4 раза по сравнению с контролем (см. рисунок). Последний фермент катализирует реакцию восстановления окисленного глутатиона. Однако содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах новорожденных морских свинок, находившихся в условиях гипероксии, достоверно не изменялось. Этому могло способствовать известное из литературы увеличение при гипероксии поступления в клетки SH-содержащих аминокислот, в частности, цистеина, который используется для синтеза глутатиона [5].

При увеличении сроков содержания животных в среде с высокой концентрацией кислорода до 14 суток в эритроцитах резко падает активность антиоксидантных ферментов: активность каталазы снижается в 2,5 раза по сравнению с интактным контролем (табл.1), активность глутатионпероксидазы падает в 1,3 раза, а активность глутатионредуктазы - в 2,5 раза по сравнению с контролем (рис. 1).

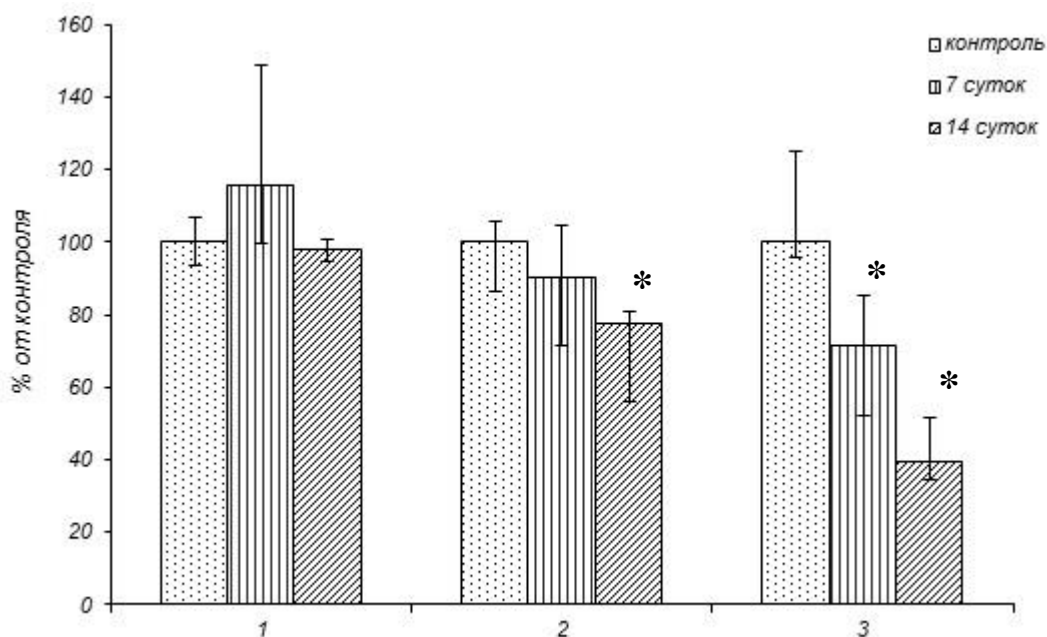


Рис. 1 -Содержание восстановленного глутатиона (GSH) - 1, активность глутатионпероксидазы (ГП) - 2 и глутатионредуктазы (ГР) - 3 в эритроцитах новорожденных морских свинок в условиях гипероксии в динамике (в % от контрольных значений)

Примечание: * Различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$

Одной из причин снижения активности этих ферментов может быть недостаток коферментов, необходимых для их работы. ГП является селензависимым ферментом, а запасы селена, согласно данным литературы, в условиях интенсификации процессов свободнорадикального окисления в организме, быстро истощаются [6]. ГР активно работает только при наличии в клетке достаточного количества восстановленного НАДФН \cdot H $^+$, источником которого является реакция, катализируемая глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой. Активность последней в эритроцитах экспериментальных животных снижалась с 20,61 (19,31 – 22,41) мкмоль/мин/гHb до 11,90 (8,32 – 15,02) мкмоль/мин/гHb ($p < 0,05$) (табл. 2). Так как сниженной активности ГР в эритроцитах сопутствует низкая активность одного из ключевых ферментов, участвующих в образовании кофермента этого фермента - восстановленного НАДФ $^+$, это дает основание предполагать наличие причинно-следственной связи между обнаруженным изменением этих двух показателей. Нельзя исключить и другие возможные механизмы снижения активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах при гипероксии. В частности, из литературы хорошо известно повреждение ферментов продуктами свободнорадикального окисления. Причем, в первую очередь, повреждаются те из них, которые имеют в своем составе свободные SH-группы.

Дисбаланс в функционировании антиоксидантных систем может привести к изменению свойства мембран эритроцитов новорожденных животных. Мы исследовали осмотическую резистентность эритроцитов в опытных и контрольных группах. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Осмотическая резистентность эритроцитов (ОРЭ) новорожденных морских свинок при воздействии гипероксии

Показатель	Контроль	Гипероксия 7 сут	Гипероксия 14 сут
ОРЭ (% гемолиза в 0,45%-р-ре NaCl)	23,71 (22,47-25,63)	86,39* (84,56-90,43)	70,21* (68,94-71,83)

Примечание: * Различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$

У контрольных новорожденных морских свинок в растворе NaCl с концентрацией 0,45% гемолизу подвергались 23,14% (22,47 – 25,63) эритроцитов, то после содержания животных в течение 7 и 14 суток в условиях гипероксии при той же концентрации NaCl гемолизировалось соответственно 65,02% (64,76 – 68,43) и 86,39% (84,56 – 90,43) всего эритроцитарного пула ($p < 0,05$), что свидетельствует о выраженном снижении осмотической резистентности эритроцитов.

Выводы: 1. В эритроцитах новорожденных животных, находившихся в среде с повышенным содержанием кислорода в течение 7-ти суток, резко возрастает активность СОД, в то время как активность других антиоксидантных ферментов не изменяется. 2. При более длительной инкубации (в течение 14 суток) в эритроцитах снижается активность практически всех антиоксидантных ферментов и, в большей степени, ферментов, участвующих в метаболизме глутатиона (ГП и ГР). 3. Недостаточность антиоксидантных систем в эритроцитах ведет к снижению их осмотической резистентности, что свидетельствует о снижении их устойчивости к окислительному стрессу.

Литература

1. Гребенников В. А. Респираторный дистресс-синдром у новорожденных. / В.А. Гребенников, О.Б. Миленин, И.И. Рюмина // «Вестник медицины», 1995. -С.31-32.
2. Шишко, Г.А. Современные подходы к ранней диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии: учебно-методическое пособие для врачей. Минск, БелМАПО, 2006.
3. Балашов Д.Н. Заместительные трансфузии нейтрофильных лейкоцитов и альтернативные методы при неонатальной нейтропении и дисфункции гранулоцитов. / Д.Н. Балашов, О.А. Майорова, А.Г. Румянцев // Детская больница 2002, №1(7), С.53.
4. Dyke, K.V. Luminol-dependent chemiluminescence analysis of human platelets / K.V. Dyke [et al.] // Microchemical J. - 1980. - Vol. 25. - P. 514-523.
5. Deneke, S.M. Regulation of cellular glutathione / S.M. Deneke, B.L. Fanburg // Am. J. Physiol. - 1989. – Vol. 257. – P. L163-L173.
6. Баранова, Т.И. Патогенетическая роль дефицита селена и структурно-функциональных нарушений мембран эритроцитов при железодефицитной анемии у детей раннего возраста: автореф. дисс.... канд. мед. наук. Чита. 2004.