

На правах рукописи

Лаптева Ирина Азатовна

**СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ПРООКСИДАНТНОЙ И
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМАМИ В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ
ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ У КРЫС**

03.00.04-биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2009

Работа выполнена на кафедре биохимии в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Челябинская Государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук,
профессор

Цейликман Вадим Эдуардович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор медицинских наук,
профессор

Зимин Юрий Викторович

доктор биологических наук,
доцент

Малиновская Светлана Львовна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Государственное учебно-научное учреждение
Факультет фундаментальной медицины
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Защита состоится 26 ноября 2009 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при ГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (603950, г. Нижний Новгород, ул. Гагарина, 23)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, ул. Гагарина, 23, корп.1.

Автореферат разослан 23 октября 2009г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н., доцент

Копылова Светлана Вячеславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Человек, постоянно соприкасающийся с современной цивилизацией, вынужден регулярно подвергаться действию хронического стресса, обозначаемого как стресс повседневной жизни. В настоящее время получены убедительные доказательства того, что структурно-функциональное состояние эритроцитов характеризуется высокой чувствительностью к действию разнообразных экстремальных раздражителей (Е.М. Микаэлян, 1988; В.Э. Цейликман, 1998; В.В. Новицкий, 2002). Патогенез стрессорных повреждений, как известно, тесно связан с активацией процессов свободнорадикального окисления (П.Д. Горизонтов, 1983; В.А. Барабой и соавт., 1992; Н.К. Зенков и соавт., 2001; А.Г. Голубев, 2003; И.А. Волчегорский и соавт., 2007). В настоящее время установлено, что при различных стрессорных воздействиях меняется как количество эритроцитов, так и их структурно-функциональные характеристики (В.Э. Цейликман, 1998; Н.В. Рязанцева, 2001; Н.А. Кленова, 2004). Метаболические изменения в красных клетках крови при действии экстремальных раздражителей проявляются: в изменении уровня 2,3-дифосфоглицерата, регулирующего сродство гемоглобина к кислороду, соотношения между пентозо-фосфатным путём превращения глюкозы и гликолизом, изменением функционирования транспортных систем мембран эритроцитов, нарушением соотношения между прооксидантными и антиоксидантными системами и др. (Н.В. Рязанцева, 2001; В.В. Новицкий, 2006). Степень и направленность подобных изменений зависит как от продолжительности и интенсивности действия раздражителя, так и от исходной резистентности клеток (D.E. Discher, 2000).

Ранее было показано, что в условиях воздействия повторных 1 часовых иммобилизаций, в зависимости от режима стрессирования, возможно воспроизвести как стимуляцию, так и угнетение периферического звена эритрона. Причём развитие эритроцитоза у стрессированных животных ассоциируется со сниженной устойчивостью к гипоксии, а постстрессорная эритропения ассоциирована с повышенной устойчивостью к гипоксии (В.Э. Цейликман, 1998). Это противоречие можно объяснить различным кислородным запросом тканей у крыс, подвергнутых исследуемым режимам стрессирования. Кроме того, нельзя исключить наличие функциональных и метаболических различий между эритроцитами стрессированных животных с повышенной и пониженной устойчивостью к гипоксии. Между тем, функциональные возможности эритроцитов во многом определяются активностью их антиоксидантных систем. В реальных условиях жизнедеятельности постоянно сохраняется потенциальная опасность сдвига равновесия в системе про- и антиоксидантных стимулов за счет активации перекисного окисления липидов и аутокаталитического возрастания количества его продуктов. В таком случае, если резервная мощность антиоксидантной системы оказывается недостаточной для полной компенсации процессов

окисления, соотношение изменяется в пользу прооксидантных факторов и окислительная деструкция становится одним из повреждающих звеньев, приводящих к прогрессированию патологических процессов.

К сожалению, до сих пор отсутствуют данные по оценке соотношения между антиоксидантной и прооксидантной системами эритроцитов стрессированных животных с повышенной и пониженной устойчивостью к гипоксии. Между тем на их основе можно объяснить многие противоречия, касающиеся влияния иммобилизационного стресса на систему эритронов.

Поэтому наше исследование, посвящённое изучению свободнорадикального окисления и активности ряда про- и антиоксидантных ферментов в эритроцитах представляется актуальным.

Цель исследования

Определение соотношения между активностью антиоксидантных ферментов и состоянием свободнорадикального окисления в эритроидном звене системы крови на ранних и отдаленных сроках при различных режимах повторных эпизодов 1 часового иммобилизационного стресса с повышенной и пониженной чувствительностью к гипоксии.

Задачи исследования

1. Изучить соотношение между активностью антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы в эритроцитах и прооксидантного фермента ксантинооксидазы в крови животных, подвергнутых редко чередующимся 1 часовым иммобилизациям.
2. Изучить соотношение между липопероксидацией и окислением белков в эритроцитах животных, подвергнутых редко чередующимся 1 часовым иммобилизациям.
3. Изучить соотношение между активностью антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы в эритроцитах и прооксидантного фермента ксантинооксидазы в крови животных через 24 часа после завершения серии ежедневных 1 часовых иммобилизаций.
4. Изучить соотношение между липопероксидацией и окислением белков в эритроцитах животных через 24 часа после завершения серии ежедневных 1 часовых иммобилизаций.
5. Изучить соотношение между активностью антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы в эритроцитах и прооксидантного фермента ксантинооксидазы в крови животных через 96 часов после завершения серии ежедневных 1 часовых иммобилизаций.

6. Изучить соотношение между липопероксидацией и окислением белков в эритроцитах животных через 96 часов после завершения серии ежедневных 1 часовых иммобилизаций.

Научная значимость

Впервые установлено, что при стрессорных воздействиях с повышенной чувствительностью к гипоксии (РЧИМ) (на ранних этапах после завершения стрессорного воздействия – 24 часа), развитие эритроцитоза сочетается с улучшением деформационных свойств эритроцитов, увеличением представительства трансформированных форм клеток - стоматоцитов. Также, при РЧИМ выявлено увеличение содержания продуктов окислительной деструкции белков стромы эритроцитов при одновременном снижении содержания общего стромального белка. Установлено, что развитие эритроцитоза у стрессированных животных ассоциируется с увеличением в костном мозге соотношения между реконструирующими и инволюционирующими эритробластическими островками, снижением уровня окислительной деструкции белков в костном мозге при одновременном увеличении темпов окисления белков в селезёнке и липопероксидации в плазме крови.

Обнаружено, что постстрессорное снижение устойчивости к гипоксии (поздние сроки после завершения редко чередующихся иммобилизаций – 96 часов) характеризуется снижением осмотической резистентности эритроцитов на фоне усиления липопероксидации в мембранах при одновременном снижении активности в эритроцитах глутатионпероксидазы.

Обнаружено, что постстрессорное увеличение устойчивости к гипоксии (ранние сроки после завершения ежедневных иммобилизаций – 24 часа) характеризуется увеличением осмотической резистентности эритроцитов при одновременном снижении уровня липопероксидации в мембранах. Отмечено, что после завершения ежедневных иммобилизаций через 24 часа в крови снижается представительство дискоцитов и увеличивается количество сфероцитов.

Теоретическая и практическая значимость

Исследования по состоянию свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы в эритроцитах при различных режимах иммобилизационного стресса позволяют детализировать механизмы стрессорных изменений чувствительности к гипоксии. Полученные результаты можно использовать при разработке новых путей коррекции стрессорных и гипоксических расстройств.

Положения, выносимые на защиту

1. На ранних этапах (через 24 часа) после завершения серии РЧИМ сниженная устойчивость к гипоксии сопряжена с улучшением

деформационных свойств эритроцитов, с усилением процессов липопероксидации и окислительной деструкции белков; на поздних этапах (через 96 часов) сохраняется сниженная устойчивость к гипоксии, сопряженная с усилением процессов липопероксидации в мембранах и снижением осмотической резистентности эритроцитов.

2. На ранних этапах (через 24 часа) после завершения серии ЕИМ повышенная устойчивость к гипоксии сопряжена с увеличением активности в эритроцитах глутатионпероксидазы и СОД, со снижением уровня липопероксидации в мембранах и повышением осмотической резистентности эритроцитов.

3. На поздних этапах (через 96 часов) после завершения серии ЕИМ сниженная устойчивость к гипоксии сопряжена со снижением активности в эритроцитах глутатионпероксидазы, увеличением уровня липопероксидации мембран и снижением осмотической резистентности эритроцитов.

Апробация работы

Основные положения работы изложены и представлены на Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские чтения» (Санкт-Петербург, 2005); научно - практической конференции с международным участием «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 2006); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной биохимии» (Киров, 2007).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 2 – в рецензируемых журналах по перечню ВАК Минобразования РФ.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 2 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов. Библиографический указатель включает 236 источников: 161 – на русском языке и 75 – иностранных. Работа содержит 18 таблиц, 12 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Моделирование изучаемых состояний

В работе проводилось экспериментальное моделирование режимов иммобилизационного стресса с различным характером господствующей адаптационной стратегии. Исследование выполнено на 343 лабораторных крысах массой 180 – 300 г. обоего пола. В экспериментах использовались

беспородные животные.

Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами, и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными (Р.А. Кополадзе, 1998), отражёнными в “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Моделирование иммобилизационного стресса

Хронический стресс воспроизводился одночасовыми иммобилизациями, которые осуществлялись путём фиксации животного за конечности на спине с применением для этих целей прямоугольных планшет из фанеры (И.А. Волчегорский и соавт., 2000). Были использованы два режима повторных стрессорных воздействий. Первый режим воспроизводился путём ежедневных одночасовых иммобилизаций в течение 3 суток (ЕИМ). Согласно полученным ранее данным В.Э. Цейликмана, при таком способе моделирования хронического стресса доминирует толерантная стратегия адаптации (В.Э. Цейликман, 1998). Для второго режима повторных стрессорных воздействий характерно доминирование резистентной стратегии адаптации и наличие поведенческих расстройств тревожно-депрессивного характера (И.А. Волчегорский, 2002). Его воспроизводили одночасовыми иммобилизациями, с интервалом 72 часа между отдельными стрессорными эпизодами (РЧИМ). Всего животные четырежды подвергались одночасовому иммобилизационному стрессу.

Оценка устойчивости к острой гипоксической гипоксии.

Устойчивость животных к острой гипоксии изучали с помощью метода В.И. Кулинского и др. (1986), модифицированного И.А. Волчегорским и соавт. для работы с крысами. У животных, помещенных в воду, регистрировалась латентность развития гипоксической комы (в секундах) по критерию прекращения спонтанных движений.

Биохимические методы

Окислительную модификацию белков оценивали по уровню образования динитрофенилгидразонов по методу Е.Е. Дубининой (1995).

Содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрически в липидном экстракте исследуемых тканей по методике И.А. Волчегорского и др. (1989; 2000).

Активность ксантиноксидазы оценивали спектрофотометрически по методу Hashimoto (1974), по образованию мочевой кислоты из ксантина.

Активность эритроцитарной супероксиддисмутазы (СОД) измеряли в супернатантах гемолизатов эритроцитов, приготовленных по методу Nishikimi N. e. a. (1972). Активность СОД определяли по методике, описанной Е. Е. Дубининой и соавт. (1983). Принцип определения активности энзима основан на реакции восстановления формазанов из солей тетразолия в слабощелочной среде.

В гемолизатах эритроцитов и гомогенатах селезенки определяли каталазную активность по методу М.А. Королук и соавт. (1988). Метод основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Активность эритроцитарной глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали спектрофотометрически по накоплению окисленного глутатиона. Использовали метод, описанный С.Н. Власовой и соавт. (1990).

Содержание гемоглобина в крови определяли гемоглобинцианидным методом.

Гематологические методы

Мембраны эритроцитов получали методом гипоосмотического гемолиза.

Количество эритроцитов подсчитывали в камере Горяева. Мазки периферической крови, также как мазки-отпечатки костного мозга (КМ) перед окраской фиксировали метанолом.

Ретикулоциты окрашивали насыщенным раствором бриллиантового крезилового синего на предметных стеклах во влажной камере.

Клеточные суспензии селезенки получали при помощи стеклянного гомогенизатора, осторожно “выжимая” клетки пестиком. Костный мозг забирали из диафиза бедренной кости, промывая костномозговой канал 0.9% раствором натрия хлорида после удаления эпифизов.

В мазках-отпечатках костного мозга, окрашенных по Романовскому-Гимзе, подсчитывали количество эритроидных клеток-прекурсоров. Расчет показателей миелограммы проводили не менее чем на 500 клеток.

Выделение эритробластических островков из костного мозга осуществлялось по методике Ю.М. Захарова и др. (1984).

Для выявления количества патологически деформированных эритроцитов, клетки фиксировали в растворе глутарового альдегида (0,25% в 0,15М фосфатном буфере с рН 7,2) при 4°C. Форму эритроцитов наблюдали с помощью микроскопа.

Осмотическую стойкость эритроцитов оценивали по степени гемолиза эритроцитов в гипоосмолярных растворах мочевины. Оценку степени гемолиза проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм.

Для оценки деформационных свойств эритроцитов проводили тест растекания крови.

Статистическая обработка результатов

Данные обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики (Г.Ф. Лакин, 1990) и выражались в виде среднеарифметической (M) и её стандартной ошибки (m). Оценка достоверности различий осуществлялась с помощью непараметрических критериев (U- критерия Манна-Уитни; WW- критерия Вальда-Вольфовица).

Применялись только односторонние критерии. Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при $p \leq 0,05$. Статистические

взаимосвязи изучали при помощи непараметрического корреляционного анализа по Спирмену (r_s) и Кенделлу (r_k). Для обработки результатов исследований использовали пакет прикладных программ «Statistica 6.0 for Windows».

Результаты собственных исследований и обсуждение

1. Свободнорадикальное окисление в эритроцитах и состояние эритрона при редко чередующихся иммобилизациях у крыс.

Установлено, что у беспородных животных через 24 ч после завершения серии редко чередующихся иммобилизаций (РЧИМ) наблюдалось снижение на 14,4% латентности развития гипоксической комы (контроль $89,6 \pm 3,22$ сек ($n=10$); РЧИМ $76,6 \pm 2,6$ сек ($n=10$), $P=0,01U$).

Через 96 ч после завершения серии РЧИМ сохранялась сниженная устойчивость к гипоксии, что проявлялось в снижении латентности развития гипоксической комы (контроль $96,34 \pm 1,45$ сек ($n=10$); РЧИМ $88,21 \pm 2,32$ сек ($n=10$), $P=0,01U$).

Для оценки влияния стрессорного воздействия на прооксидантную систему, в крови крыс определяли активность ксантиноксидазы. Выявили увеличение активности фермента в крови стрессированных животных относительно группы контрольных через 24 ч после завершения серии РЧИМ и снижение активности ксантиноксидазы через 96 ч после завершения серии РЧИМ (таблица 1).

В эритроцитах крыс определяли активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Через 24 ч после завершения серии РЧИМ наблюдали тенденцию к увеличению активности СОД и достоверное увеличение активности ГПО (таблица 1). Через 96 ч после завершения стрессорного воздействия выявили снижение активности ГПО в эритроцитах стрессированных животных. При этом активность СОД находилась в пределах контрольных значений. Однако наблюдали повышение соотношения СОД/ГПО (таблица 1).

Для оценки сбалансированности в системе «свободнорадикальное окисление – антиоксидантная активность» в строме эритроцитов определяли продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ). Полученные данные свидетельствуют, что в строме эритроцитов не наблюдалось увеличения уровня липопероксидации через 24 ч после завершения стрессорного воздействия (таблица 1). Возможно, это связано с поддержанием в эритроцитах на высоком уровне активности антиоксидантного фермента ГПО, что позволило смягчить выраженность оксидативного стресса на данном этапе.

Однако через 96 ч после завершения серии РЧИМ в эритроцитах на фоне снижения активности ГПО наблюдали интенсификацию ПОЛ, что проявилось в

увеличении содержания в строме эритроцитов гептанрастворимых диеновых конъюгатов (таблица 1).

Таблица 1

Активность ксантиноксидазы в крови, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы в эритроцитах, показатели перекисного окисления липидов стромы эритроцитов крыс на различных этапах после завершения серии РЧИМ

Показатели	Контроль n=10	РЧИМ 24 * n=10	РЧИМ 96 ** n=10
СОД (мМ/гр Нв/мин)	15,38±3,74	16,18±2,49	15,45±2,60
Ксантиноксидаза (ммоль/мл/мин)	0,081±0,013	0,118±0,006	0,08 ± 0,014
ГПО (мкм/г Нв/мин)	0,658±0,045	1,03±0,20 P=0,012U	0,375± 0,01 P=0,01U
СОД/ГПО	23,3±2,13	16,18±4,11	41,2±3,97 P=0,021 U
Диеновые конъюгаты (гептановая фракция)	0,88 ±0,03	0,92±0,09	1,10±0,03 P=0,044U
Кетодиены и сопряженные триены (гептановая фракция)	0,09±0,01	0,09±0,04	0,18±0,02 P=0,024U
Диеновые конъюгаты (изопропанольная фракция)	0,70±0,10	0,68±0,09	0,71±0,15
Кетодиены и сопряженные триены (изопропанольная фракция)	0,34±0,07	0,35±0,08	0,36±0,09

Пр и м е ч а е и е. * - через 24 ч после завершения серии стрессорных воздействий; ** - через 96 ч после завершения стрессорных воздействий; уровень продуктов ПОЛ выражен в условных ед. окислительного индекса (отношение оптических плотностей E_{232}/E_{220} для первичных, E_{278}/E_{220} для вторичных продуктов ПОЛ); U – критерий Манна Уитни

Через 24 ч после завершения серии РЧИМ в строме эритроцитов стрессированных животных наблюдалось увеличение содержания окислительно-модифицированных белков (ОМБ). Это проявлялось в увеличении в 2,7 раза ($P=0,047U$) содержания нейтральных карбонилированных белков при одновременном возрастании в 2,5 раза ($P=0,044U$) содержания основных карбонилированных белков (таблица 2). Важно отметить, что одновременно снижалось содержание общего белка эритроцитарной стромы (Контроль $21,80 \pm 4,11$ ($n = 7$); РЧИМ24 $7,78 \pm 3,96$ ($n=7$), $P=0,022 U$).

Таблица 2

Влияние различных режимов иммобилизации на содержание окислительно-модифицированных белков в строме эритроцитов

Показатель	Контроль n=7	РЧИМ 24* n=7	Контроль n=7	ЕИМ 24* n=7
Общий белок стромы %	$27,00 \pm 9,32$	$7,78 \pm 4,51$ $P=0,022U$	$21,80 \pm 4,73$	$12,48 \pm 4,84$
Нейтральные карбонилированные белки (мкг/ мг стромы)	$1,69 \pm 0,92$	$4,54 \pm 1,97$ $P=0,047U$	$2,58 \pm 0,94$	$2,12 \pm 0,90$
Основные карбонилированные белки (мкг/мг стромы)	$3,78 \pm 1,34$	$9,45 \pm 3,18$ $P=0,044U$	$2,62 \pm 0,76$	$1,99 \pm 0,60$
ОМБ, индуцированные в системе Fe+2–H2O2 (мкг/мг стромы)	$5,98 \pm 2,72$	$6,84 \pm 3,11$	$7,85 \pm 1,22$	$5,26 \pm 1,31$ $P=0,044WW$

Примечание: * - через 24 часа после завершения серии стрессорных воздействий; U – критерий Манна Уитни

Процессы окислительного повреждения белков цитоскелета эритроцитов проявились в нарушении citoархитектоники (появлении трансформированных форм эритроцитов). Так, через 24 ч после завершения серии РЧИМ в крови стрессированных крыс наблюдали увеличение количества стоматоцитов (контроль $2,0 \pm 0,2\%$ ($n=12$); РЧИМ $7,4 \pm 1,7$ ($n=10$), $P=0,02U$). Также выявлено увеличение на 61% индекса деформабельности эритроцитов (контроль $0,29 \pm 0,05$ ($n=12$); РЧИМ $0,46 \pm 0,11$ ($n=10$), $P=0,049U$).

Как видно из таблицы 3, через 24 ч после завершения серии РЧИМ не менялась чувствительность эритроцитов к осмотическому гемолизу. Однако через 96 ч после завершения стрессорного воздействия наблюдалось снижение осмотической резистентности эритроцитов в опытной группе животных по сравнению с контрольной группой (таблица 3).

Таким образом, наблюдаемому снижению осмотической резистентности эритроцитов у стрессированных крыс на поздних сроках после завершения стрессорного воздействия соответствовала активация процессов липопероксидации в эритроцитах.

Осмотическая стойкость эритроцитов крыс на разных этапах после завершения стрессорных воздействий

№ пробирки с раствором мочевины	Режим воздействия		
	Контроль n=12	РЧИМ 24* n=10	РЧИМ 96** n=8
1	3,92±2,089	4,51±1,26	11,58±0,84 P=0,022U
2	9,79±2,96	11,76±2,10	15,78±1,11 P=0,024U
3	50,78±5,92	36,47±5,60	58,61±4,98
4	81,95±4,10	77,87±6,92	84,23±6,12
5	92,00±1,54	90,21±2,60	95,70±2,33
6	97,95±0,51	97,86±0,78	98,94±1,25

Примечание: степень гемолиза выражена в % гемолизированных эритроцитов; концентрация мочевины в гемолизирующих растворах составляла: 1 - 0,12 моль/л, 2 - 0,135 моль/л, 3 - 0,15 моль/л, 4 - 40,165 моль/л, 5 - 0,18 моль/л, 6 - 0,195 моль/л; * - через 24 часа после завершения серии стрессорных воздействий; ** - через 96 часов после завершения стрессорных воздействий; U – критерий Манна Уитни

Через 24 ч после завершения серии РЧИМ в опытной группе отмечалось увеличение количества эритроцитов на 20% (контроль $5,30 \pm 0,17 \times 10^{12}$ кл/л, (n=12); РЧИМ $6,36 \pm 1,2 \times 10^{12}$ кл/л) (n=10), P = 0,035U) с одновременным увеличением уровня гематокрита (контроль $57,1 \pm 3,1\%$ (n=12); РЧИМ $82,3 \pm 6,4\%$ (n=10), P=0,042U). Кроме того, в опытной группе отмечено увеличение на 20% концентрации гемоглобина (контроль $161,12 \pm 7,47$ г/л (n=12), РЧИМ $193 \pm 5,8$ г/л (n=10), P=0,015U).

При этом показатели формулы эритробластических островков (ЭО), считающихся основными морфофункциональными единицами эритропоэза в костном мозге, свидетельствуют об определенном напряжении эритропоэза. Так, у животных, подвергнутых РЧИМ, количество ЭО инволюционирующих снизилось на 29 % (контроль $179,33 \pm 19,20 \times 10^3$ (n=11); РЧИМ $128,58 \pm 12,15 \times 10^3$ (n=7), P=0,032U). Количество ЭО реконструирующихся повысилось на 50 %. (контроль $104,77 \pm 9,43 \times 10^3$ (n=11), РЧИМ $156,8 \pm 16,26 \times 10^3$ (n=7), P=0,019U) За счет этого показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз повысился почти в 2,5 раза.

Следовательно, при данном варианте стрессирования стабилизация эритропоэза достигается за счет высокой скорости перехода ЭО инволюционирующих в ЭО реконструирующиеся. Помимо этого, для РЧИМ характерно увеличение на 32% показателя вовлечения КОЕэ в

дифференцировку (контроль $155,77 \pm 18,88$ ($n=11$); РЧИМ $200,12 \pm 25,92$ ($n=7$), $P=0,043U$). Такие изменения развиваются за счёт усиления пролиферативного потенциала кроветворных клеток костного мозга. Установлено, что после завершения РЧИМ характерно увеличение количества S -фазных клеток в костном мозге (контроль $18,4 \pm 0,9$ % ($n=6$); РЧИМ $21,31 \pm 0,51$ %, ($n=6$), $P=0,045U$).

Интересно, что через 96 ч после завершения РЧИМ купировался характерный для ранних этапов эритроцитоз (контроль $5,10 \pm 0,84$ ($\times 10^{12}$ кл/л), ($n=12$); РЧИМ $5,22 \pm 0,99$ ($\times 10^{12}$ кл/л) ($n=10$), $P = 0,039U$).

Таким образом, на основании данных по состоянию периферического звена эритрона представляется затруднительным определить причину сниженной устойчивости к гипоксии. Особенно затруднительно это установить применительно к первым суткам после завершения РЧИМ, когда наблюдается снижение латентности гипоксической комы на фоне эритроцитоза. Поэтому на следующих этапах исследования оценивалось состояние свободнорадикального окисления в костном мозге и селезенке.

В костном мозге опытных животных через 24 ч после завершения серии РЧИМ было отмечено снижение уровня ОМБ. Так, у стрессированных животных наблюдалось снижение спонтанного уровня карбонилированных белков (контроль $5,16 \pm 0,72$ мМ/мл костномозговой суспензии ($n=12$); РЧИМ $2,54 \pm 0,68$ мМ/мл костномозговой суспензии ($n=10$), $P=0,023U$) при одновременном снижении количества ОМБ при воздействии индуктора - перекиси водорода (контроль $10,44 \pm 0,71$ мМ/мл костномозговой суспензии ($n=12$); РЧИМ $7,06 \pm 0,61$ мМ/мл костномозговой суспензии ($n=10$), $P=0,007U$). При этом количество молекулярных продуктов ПОЛ не претерпело статистически значимых изменений

Как видно из таблицы 4, через 24 ч после завершения серии РЧИМ в селезенке отмечено существенное увеличение активности ксантинооксидазы при неизменном уровне активности СОД и каталазы. Одновременно наблюдалось увеличение содержания карбонилированных белков. При этом обнаружены статистически значимые изменения в содержании молекулярных продуктов ПОЛ в органе, достоверно увеличилось содержание первичных гептанфильных и вторичных изопропанолрастворимых продуктов.

Таким образом, полученные результаты дают основание для предположения об индукции оксидативного стресса как факторе, обуславливающим гипоплазию селезенки.

Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости периферического звена эритрона к действию РЧИМ на ранних этапах после завершения воздействия. В пределах контрольных значений находились показатели, характеризующие осмотическую резистентность эритроцитов. Наблюдалось улучшение их деформационных свойств. В этой серии экспериментов удалось воспроизвести, отмеченную ранее, стимуляцию периферического звена системы эритрона.

**Показатели перекисного окисления липидов, белков,
активность каталазы, СОД, ксантиноксидазы в селезенке
через 24 часа после завершения серии редко чередующихся
иммобилизаций (РЧИМ 24)**

Показатели	Контроль n = 12	РЧИМ 24 n=10
Диеновые конъюгаты (гептановая фракция)	0,75±0,03	0,84±0,04 P=0,026WW
Кетодиены и сопряженные триены (гептановая фракция)	0,1±0,02	0,15±0,02
Диеновые конъюгаты (изопропанольная фракция)	0,45±0,03	0,4±0,04
Кетодиены и сопряженные триены (изопропанольная фракция)	0,26±0,02	0,29±0,02 P=0,034WW
Нейтральные карбонилированные белки (мМ/ г ткани)	1,57±0,3	2,65±0,69 P=0,044WW
Основные карбонилированные белки (мМ/ г ткани)	1,54±0,37	2,11±0,58 P=0,0073WW
СОД (у.е.а./г ткани/мин)	0,56±0,19	1,11±0,38
Ксантиноксидаза (ммоль/ г ткани)	7,98±0,25	10,56±0,86 P=0,0088U
Каталаза (мкмоль/г ткани/мин)	0,38±0,07	0,24±0,05

П р и м е ч а н и е: Уровень продуктов ПОЛ выражен в условных единицах окислительного индекса (отношение оптических плотностей E_{232}/E_{220} для первичных, E_{278}/E_{220} для вторичных продуктов ПОЛ); U – критерий Манна Уитни; WW – критерий Вальда-Вольфовица

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что у адаптированных животных развивается эритроцитоз. В этом проявляется сходство данного режима стрессорных воздействий с адаптацией к гипоксии.

2. Показатели системы эритрона и свободнорадикального окисления в эритроцитах при ежедневных иммобилизациях (ЕИМ).

Выполненные исследования показали, что через 24 ч после завершения последнего стрессорного эпизода латентность развития гипоксической комы повысилась на 10% по сравнению с контролем (контроль $89,6 \pm 3,22$ сек ($n=10$); РЧИМ $98,4 \pm 2,3$ сек ($n=10$), $P=0,024U$).

В поздние сроки после завершения ежедневных иммобилизаций наблюдалась инверсия гипоксотропных эффектов хронического стресса. Так, через 72 ч и через 96 ч после завершения серии ЕИМ наблюдалось снижение устойчивости к острой гипоксической гипоксии. Это проявлялось в уменьшении на 25 % ($P=0,035U$) в опытной группе латентности развития гипоксической комы через 72 ч после завершения ЕИМ и на 27% ($p=0,032 U$) через 96 ч после завершения последнего стрессорного эпизода.

Через 24 ч после завершения серии ЕИМ в крови стрессированных животных наблюдалось снижение на 48% активности прооксидантного фермента ксантиноксидазы ($P=0,033U$) (таблица 1). Через 96 ч не выявлено различий активности ксантиноксидазы с активностью этого фермента в крови контрольных животных.

Для данного режима повторных стрессорных воздействий характерно увеличение мощности антиоксидантных систем в эритроцитах через 24 ч после завершения серии ЕИМ. Это проявлялось в увеличении на 47% активности глутатионпероксидазы ($P=0,024U$) (таблица 5). Также повышалась на 65% активность СОД (таблица 5). Соотношение СОД/ГПО у стрессированных крыс в этот период не отличалось от контрольных значений.

Через 96 ч после завершения серии ЕИМ в эритроцитах стрессированных крыс выявили снижение активности ГПО, значения активности СОД в этот период находились в пределах контрольных значений. Соотношение СОД/ГПО также не изменялось (таблица 5).

Через 24 ч после завершения серии ЕИМ выявили уменьшение уровня липопероксидации в строме эритроцитов стрессированных крыс. Это проявилось в снижении содержания гептанфильных молекулярных продуктов ПОЛ. Так, через 24 ч после завершения серии ЕИМ, в строме эритроцитов стрессированных животных на 35% снижено содержание гептан-растворимых диеновых конъюгатов ($P=0,035U$) и на 40% снижено содержание кетодиенов и сопряжённых триенов ($P=0,025U$) по сравнению с контрольной группой (таблица 5).

Характерное для ежедневных иммобилизаций снижение уровня липопероксидации наблюдалось и в более поздние сроки после завершения

ПОЛ. Так, через 72 ч после завершения повторных стрессорных воздействий в эритроцитарной строме наблюдалось снижение содержания гептан-растворимых кетодиенов и сопряжённых триенов (контроль $0,361 \pm 0,02$ ($n=7$), РЧИМ $0,45 \pm 0,011$ ($n=7$), $P=0,017U$).

Таблица 5

Активность ксантиноксидазы в крови, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы в эритроцитах крыс и показатели перекисного окисления липидов стромы эритроцитов крыс на различных этапах после завершения серии ЕИМ

Показатели	Контроль	ЕИМ 24 * n=10	ЕИМ 96 ** n=10
Ксантиноксидаза (ммоль/мл/мин)	$0,096 \pm 0,022$	$0,048 \pm 0,02$ $P=0,033U$	$0,094 \pm 0,015$
СОД (мм/гр Нв/мин)	$14,15 \pm 2,70$	$23,38 \pm 5,3$ $P=0,047U$	$13,35 \pm 3,70$
ГПО (мкм/г Нв/мин)	$0,59 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,13$ $P=0,024U$	$0,40 \pm 0,02$ $P=0,035U$
СОД/ГПО	$23,98 \pm 2,86$	$27,18 \pm 3,91$	$33,12 \pm 3,84$
Диеновые конъюгаты (гептановая фракция)	$0,90 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,07$ $P=0,035U$	$0,84 \pm 0,04$
Кетодиены и сопряженные триены (гептановая фракция)	$0,43 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,02$ $P=0,025U$	$0,49 \pm 0,05$
Диеновые конъюгаты (изопропанольная фракция)	$0,72 \pm 0,09$	$0,65 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,04$
Кетодиены и сопряженные триены (изопропанольная фракция)	$0,35 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,07$ $P=0,043WW$

Примечание. * - через 24 часа после завершения серии стрессорных воздействий; ** - через 96 часов после завершения стрессорных воздействий; Уровень продуктов ПОЛ выражен в условных единицах окислительного индекса (отношение оптических плотностей E_{232}/E_{220} для первичных, E_{278}/E_{220} для вторичных продуктов ПОЛ); U – критерий Манна Уитни

Однако, через 96 ч после завершения серии ЕИМ наблюдалось увеличение содержания изопропанол растворимых кетодиенов и сопряжённых триенов (таблица 5).

В отличие от режима РЧИМ, при ЕИМ через 24 ч после завершения воздействия не наблюдалось усиления окислительной деструкции белков стромы эритроцитов (таблица 6). Не выявлено также различий содержания общего белка эритроцитарной стромы у стрессированных и контрольных животных. Более того, через 24 ч после завершения ежедневных иммобилизаций наблюдалось снижение на 33% содержания окислительно-модифицированных белков индуцированных в системе $Fe^{+2}-H_2O_2$ (контроль $7,85 \pm 1,22$ мкг/мг стромы (n=7), ЕИМ $5,26 \pm 1,31$ мкг/мг стромы (n=7), $P=0,044WW$). Этот факт свидетельствует о повышенной устойчивости белков эритроцитарной стромы к индуктору свободнорадикального окисления.

На этом фоне отмечен трёхкратный прирост относительного содержания сфероцитов-субпопуляции эритроцитов с высокой предрасположенностью к гемолизу (контроль $8,5 \pm 2,16\%$ (n=12); ЕИМ $25,71 \pm 4,11$ (n=12), $P = 0,034U$).

Как видно из таблицы 6, через 24 ч после завершения серии трёхкратных ежедневных иммобилизаций повышалась устойчивость эритроцитов к осмотическому гемолизу.

Таблица 6

Осмотическая стойкость эритроцитов крыс на разных этапах после завершения серии ЕИМ

№ пробирки с раствором мочевины	Режим воздействия		
	Контроль n=12	ЕИМ 24* n=9	ЕИМ 96** n=7
1	4,12±1,33	3,17±1,97	7,32±2,76
2	12,61±1,98	8,96±2,11	25,12±2,95 P=0,022 U
3	50,43±3,56	29,7±3,72 P=0,011 U	57,18±4,11
4	83,99±4,12	78,99±2,86	88,14±4,87
5	91,69±5,11	92,93±3,11	94,76±2,40
6	98,63±1,98	98,85±1,54	98,13±1,71

Примечание: степень гемолиза выражена в % гемолизированных эритроцитов; концентрация мочевины в гемолизирующих растворах составляла: 1 - 0,12 моль/л, 2 - 0,135 моль/л, 3 - 0,15 моль/л, 4 - 0,165 моль/л, 5 - 0,18 моль/л, 6 - 0,195 моль/л; * - через 24 ч после завершения серии стрессорных воздействий; ** - через 96 ч после завершения стрессорных воздействий; U – критерий Манна Уитни

Наблюдаемая через 96 ч активация ПОЛ в строме эритроцитов ассоциируется со снижением осмотической резистентности эритроцитов стрессированных крыс (таблица 5, 6).

В процессе повторных стрессорных воздействий отмечались существенные изменения в системе эритрона. Через 24 ч после завершения серии ЕИМ отмечалось достоверное снижение количества эритроцитов (контроль $5,82 \pm 0,24 \times 10^{12}$ кл/л, (n=14); ЕИМ $5,25 \pm 0,52 \times 10^{12}$ кл/л (n=15), $P = 0,027U$), а также снижение концентрации гемоглобина (контроль $146,77 \pm 2,95$ г/л (n=14); ЕИМ $126,934 \pm 3,90$ г/л (n=15), $P = 0,019U$) и уменьшение значения гематокрита (контроль $44,37 \pm 0,97\%$, (n=14); ЕИМ $39,62 \pm 1,41\%$ (n=10), $P = 0,035U$).

Наблюдаемое после серии ЕИМ уменьшение показателей периферического звена системы эритрона не сопровождалось изменением уровня эритроидных клеток-прекурсоров в костном мозге.

В этой серии экспериментов у беспородных животных удалось воспроизвести характерное для популяции Вистар постстрессорное угнетение эритрона.

Выполненные нами исследования свидетельствуют, что в условиях повторных 1-часовых иммобилизаций цитодеструктивные эффекты стресса могут опосредоваться циркулирующими продуктами липопероксидации. Так, через 24 ч после завершения ЕИМ наблюдался прирост уровня вторичных гептанфильных молекулярных продуктов ПОЛ в плазме крови (контроль 0.527 ± 0.063 (n=14), ЕИМ 0.345 ± 0.034 (n=13), $P=0,043U$). Уместно напомнить, что у животных группы ЕИМ наблюдалось снижение количества эритроцитов. При этом между уровнем вторичных гептанфильных продуктов ПОЛ и количеством эритроцитов имеется отрицательная корреляционная зависимость ($r_k = - 0.560$, $n = 13$, $P = 0.040$). Основываясь на вышеприведённой корреляции можно предположить, что циркулирующие продукты ПОЛ, растворимые в гептане, причастны к снижению уровня эритроцитов при ЕИМ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что стрессорные воздействия со сниженной устойчивостью к гипоксии характеризуются сниженной мощностью антиоксидантных систем и повышением уровня свободнорадикального окисления. Причём в одних случаях наблюдалось усиление окисления белков (РЧИМ), а в других случаях наблюдалось усиление ПОЛ (ЕИМ 96). Напротив стрессорные воздействия с повышенной устойчивостью к гипоксии характеризуются повышенной активностью антиоксидантных систем и сниженным уровнем ПОЛ. Это связано с тем, что на функциональную активность эритроцитов существенное влияние оказывает процесс свободнорадикального окисления компонентов клеточных мембран и цитоскелета.

ВЫВОДЫ

1. При редко чередующихся 1 часовых иммобилизациях, характеризующихся повышенной чувствительностью к гипоксии, развитие эритроцитоза ассоциировано с увеличением деформабельности эритроцитов при одновременном развитии дисбаланса между прооксидантными и антиоксидантными ферментативными системами, проявлявшемся в одновременном увеличении активности ксантиоксидазы и глутатионпероксидазы и усилении свободнорадикального окисления
2. После завершения серии редко чередующихся 1 часовых иммобилизациях происходит усиление окислительной деструкции эритроцитарных белков при одновременном уменьшении содержания белков эритроцитарной стромы.
3. Через 24 часа после завершения ежедневных 1 часовых иммобилизаций развитие повышенной устойчивости к гипоксии ассоциировано с увеличением осмотической резистентности эритроцитов и увеличением мощности ферментативной антиоксидантной системы эритроцитов, проявляющемся в увеличении активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы при одновременном снижении ксантинооксидазной активности.
4. Наблюдаемое через 24 часа после завершения ежедневных 1 часовых иммобилизаций увеличение активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы ассоциировано со снижением уровня липопероксидации при отсутствии статистически значимых изменений со стороны окислительной деструкции белков.
5. Через 96 часов после завершения ежедневных 1 часовых иммобилизаций развитие повышенной чувствительности к гипоксии ассоциировано со снижением осмотической резистентности эритроцитов и снижением мощности ферментативной антиоксидантной системы эритроцитов, проявляющейся в снижении активности глутатионпероксидазы и каталазы.
6. Наблюдаемое через 96 часов после завершения ежедневных 1 часовых иммобилизаций снижение активности глутатионпероксидазы и каталазы ассоциировано с увеличением уровня липопероксидации, проявляющемся в повышении содержания изопропанол-растворимых кетодиенов и сопряжённых триенов.

Список опубликованных научных работ

- 1 Сысаков, Д.А. Усиление повторными стрессовыми воздействиями цитокин- зависимого монооксигеназного и оксидативного стресса в печени / А.Б Горностаева., Д.А. Сысаков, О.Б. Цейликман, **И.А. Лаптева**, Н.В. Бубнов, Т.Г Тимофеева, А.И Сеницкий // Материалы III итоговой научно-практической конференции молодых ученых ЧелГМА - Челябинск, 2005.- С.41-43.
2. Лаптева, И.А. Увеличение устойчивости к токсическому действию адреналина в условиях непродолжительной гипокинезии / А.И. Сеницкий, А.Б. Горностаева, **И.А. Лаптева**//«Санкт-Петербургские чтения»: тезисы международного молодежного медицинского конгресса. - Санкт – Петербург, 2005. - С.111-112.
3. Лаптева, И.А. Повышенная устойчивость к гипоксии и усиление иммунореактивности при ежедневных иммобилизациях. / А.Б. Горностаева, **И.А. Лаптева**, Т.Г. Тимофеева, Д.А. Козочкин, А.И. Сеницкий, Н.В. Бубнов // Материалы IV конференции иммунологов Урала. – Уфа, 2005. – С. 19.
4. Сеницкий, А.И. Анксиогенный стресс как модификатор эффекта при аллоксановом диабете /**И.А. Лаптева**, А.И. Сеницкий, А.Б. Горностаева // Материалы итоговой научно-практической конференции молодых ученых ЧелГМА. – Челябинск, 2006. - С.108.
5. Цейликман, В.Э. Адаптивные и дезадаптивные последствия резистентной и толерантной биохимических стратегий адаптации / В.Э. Цейликман, О.Б. Цейликман, А.И. Сеницкий, **И.А. Лаптева**, Д.А. Романов, Т.А. Филимонова // «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины». Материалы научно-практической конференции с международным участием. - Астрахань, 2006. – С. 25-28.
6. Цейликман, В.Э. Чувствительность к адреномиметикам и содержание окислительно-модифицированных белков во внутренних органах со сниженной устойчивостью к гипоксии / В.Э. Цейликман, А.И. Сеницкий, **И.А. Лаптева**, А.Б. Горностаева, Л.И. Крупицкая // «Актуальные вопросы современной биохимии», Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Киров, 2007. – С. 167-168.
- 7*. Лаптева, И.А Биохимические стратегии адаптации в условиях хронического стресса / О.Б. Цейликман, В.Э. Цейликман, А.И.Сеницкий, **И.А. Лаптева**, Е.А. Лавин, А.Б. Горностаева // Вестник Южно-Уральского Государственного Университета. Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура». - Челябинск, 2008. - №4 (104). - С.56-57.
- 8*. Цейликман, В.Э. Влияние повторных стрессорных воздействий с повышенной чувствительностью к гипоксии на окисление белков и липопероксидацию у крыс / В.Э.

Цейликман, **И.А. Лаптева**, Л.И. Крупицкая, А.И. Синицкий, Е.А. Лавин, А.Б. Горностаева//
Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. - 2008. - т. 94, №12. -С. 1407 – 1413.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКР активные кислородные радикалы
ГНС гипоталамо-гипофизарная система
ГПО глутатионпероксидаза
ЕИМ ежедневные одночасовые иммобилизации
КМ костный мозг
КО ксантиноксидаза
ОМБ окислительно модифицированные белки
ПОЛ перекисное окисление липидов
РЧИМ редкочередующиеся одночасовые
иммобилизации
САС симпатоадреналовая система
СОД супероксиддисмутаза
ЭО эритробластический островок
U критерий Манна-Уитни
WW критерий Вальда-Вольфовица

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Лаптева Ирина Азатовна

**СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ПРООКСИДАНТНОЙ И
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМАМИ В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ
ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ У КРЫС**

03.00.04-биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2009

Подписано в печать
Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.
Формат 60x84. 1/16. Усл. печ. листов 1,5 Уч.- изд. л. 1,7
Тираж 100 экз. Заказ №

454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64,
ГОУ ВПО « Челябинская государственная медицинская академия Росздрава»

