

УДК 612(063)(17)

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2010 г.

М.В. Козак

Астраханский госуниверситет

mkozak@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.10.2009

Установлена положительная взаимосвязь осмотической резистентности эритроцитов с общей антиокислительной активностью плазмы крови. При введении альфа-токоферола минимальная осмотическая резистентность эритроцитов у старых животных возрастает. Обнаружен протекторный эффект воздействия тималина на осмотическую резистентность эритроцитов в условиях стресса у молодых и старых самок крыс.

Ключевые слова: возраст, осмотическая резистентность эритроцитов, альфа-токоферол, тималин.

Введение

Общий баланс антиоксидантной системы животных меняется с возрастом и при стрессе. Отмечено возрастное изменение соотношения антиоксидантов и прооксидантов, а также общего содержания витаминов А, С, Е в различных тканях. Концентрация витамина Е в печени животных увеличивается, в эритроцитах уменьшается, имеются также половые различия в накоплении витамина Е в печени [1–3]. При увеличении возраста животных, а также в процессе старения организма разнонаправлено изменяется активность некоторых ферментов антиокислительной защиты. В эритроцитах у лабораторных грызунов понижается базальная активность супероксиддисмутазы, а базальная активность глутатионредуктазы в эритроцитах пожилых людей наоборот повышается [4–6]. Накопление продуктов перекисного окисления и возрастное уменьшение общей антиокислительной активности может приводить к изменению функционирования мембран клеток.

Исследования показали, что иммобилизационный и тепловой стресс также неоднозначно влияют на активность супероксиддисмутазы в эритроцитах крыс разного возраста. Снижение активности этого фермента обнаружено у молодых крыс. У старых животных, напротив, отмечено увеличение его активности [5, 7, 8]. В процессе старения организма изменяется способность адаптироваться к экстремальным воздействиям. Значительная роль в этом механизме принадлежит возрастным изменениям функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпо-

чечниковой системы [9, 10]. В ответ на стрессовое воздействие в тканях и, быстрее всего, в плазме крови наблюдается подъём концентрации активных форм кислорода, развивается окислительный стресс, который способствует запуску механизмов клеточной адаптации. Для определения направленности происходящих при этом изменений необходимо учитывать общую антиокислительную активность плазмы крови.

Цель работы – изучение различий осмотической резистентности эритроцитов при увеличении возраста животных, а также при введении животным альфа-токоферола и тималина.

Экспериментальная часть

Материал и методика. Опыты проводились в зимний период на двух группах половозрелых белых крыс линии Вистар: I – группа молодых животных – возраст 4 месяца, средняя масса тела самцов 250 г, самок – 220 г.; II – возраст 20 месяцев, средняя масса тела самцов 350 г, самок – 280 г.

Все животные были разделены, в свою очередь, на экспериментальные группы, самцы и самки отдельно: по 6 вариантов воздействия у самцов и самок (10 животных в каждой экспериментальной группе). Первый вариант – контроль (К) – без воздействия. Второй (Е) – животным *per os* вводили 10%-ный раствор α -токоферола ацетата (ТФ) в дозе 1 мг на 100 г массы животного, в течение 14 дней (до декапитации) один раз в сутки в утренние часы. Третий вариант («Стресс») –

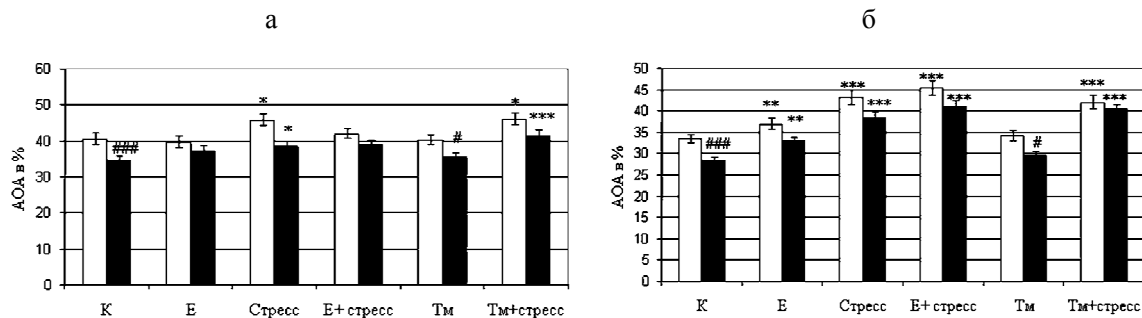


Рис. 1. Возрастные различия общей антиокислительной активности плазмы самок (а) и самцов (б) белых крыс; молодые – светлые столбики, старые – темные столбики
Примечание: достоверность разности с контролем: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; достоверность разности между возрастными группами: # $p \leq 0.05$; ### $p \leq 0.001$.

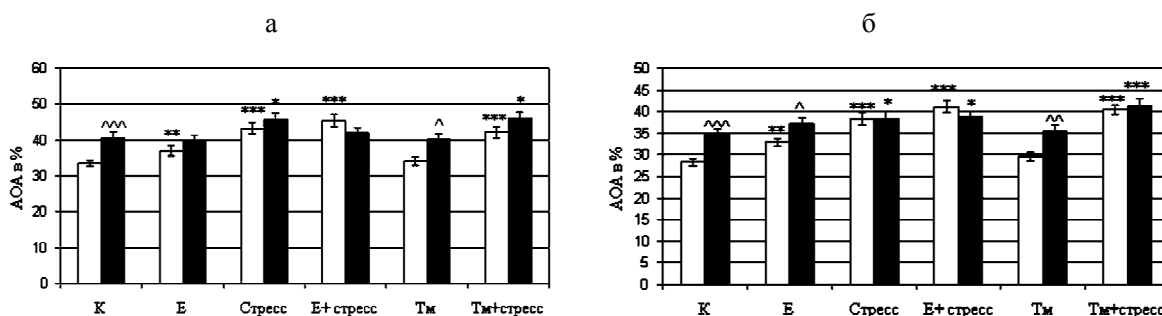


Рис. 2. Половые различия общей антиокислительной активности плазмы молодых (а) и старых (б) белых крыс; самцы – светлые столбики, самки – темные столбики
Примечание: достоверность разности с контролем: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; достоверность разности между полами: ^ $p \leq 0.05$; ^^ $p \leq 0.01$; ^^ $p \leq 0.001$.

животных подвергали иммобилизационному стрессу, для чего животных в течение 5 дней на 1 час помещали в пластиковый пенал по размеру тела. Четвёртая группа животных (Е+стресс) подвергалась 5-дневному стрессу в сочетании с двухнедельным введением ТФ. Пятый вариант воздействия: животным внутрибрюшинно вводился тималин (Тм) в дозе 1.7 мг на 100 г массы, в течение 5 дней. Введение заканчивали за два дня до окончания опытов. Шестой вариант (Тм+стресс): животных подвергали 5 дневному стрессу в сочетании с введением тималина, как и животным пятой группы.

Декапитацию животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», под хлоралгидратным наркозом внутрибрюшинно (2.5%-ный раствор, 1 мл на 100 г массы тела животного). Общую антиокислительную активность (АОА) плазмы крови определяли по величине торможения перекисного окисления липидов в модельном субстрате [11]. Осмотическую резистентность эритроцитов определяли по устойчивости к гипотоническим растворам натрия хлорида [12].

Результаты и их обсуждение

Проведённые исследования показали существование различий общей антиокислительной активности плазмы крови интактных молодых и старых животных.

На рис. 1 представлена общая антиокислительная активность плазмы самок и самцов белых крыс разного возраста при экспериментальных воздействиях.

Молодые самки имеют наиболее высокий уровень АОА, значительно ниже этот показатель у молодых самцов ($p < 0.001$). Старые животные показали более низкий уровень АОА в сравнении с молодыми ($p < 0.001$), при сохранении половых различий. У самок уровень АОА оказался более высоким ($p < 0.001$). Ежедневное введение витамина Е самцам достоверно увеличило АОА вне зависимости от возраста ($p < 0.05$ в обоих случаях). У самок резерв антиоксидантной защиты оказался изначально достаточно высоким, в связи с чем дополнительное введение витамина Е не привело к увеличению АОА ($p > 0.05$).

Иммобилизационный стресс, вне зависимости от возраста, значительно увеличил общую антиокислительную активность плазмы крови,

причём у самцов это произошло в большей степени ($p < 0.001$), чем у самок ($p < 0.05$). Наибольшее разнообразие ответной реакции АОА наблюдалось при введении ТФ на фоне стресса. У молодых и старых самцов отмечалось увеличение АОА, в то же время у молодых самок дополнительное введение ТФ привело к её снижению. Иная реакция отмечалась у старых самок – дополнительное введение ТФ на фоне стресса не изменило общую антиокислительную активность плазмы в сравнении с вариантом «Стресс».

Введение тималина не изменило АОА независимо от пола и возраста животных ($p > 0.05$ в сравнении с контролем). Однако были выявлены различия между молодыми и старыми животными в уровне АОА в варианте «ТМ + стресс». Дополнительное введение ТМ на фоне стресса привело к несколько большей активации АОА у старых животных, чем только действие стресса. Эта разница оказалась недостоверной ($p > 0.05$ в обоих случаях, в сравнении с вариантом «Стресс»).

Анализ результатов измерения уровня АОА показал, что молодые самки в сравнении с молодыми самцами изначально имеют более высокий резерв общей антиокислительной активности плазмы крови, который связан с половыми различиями стероидного профиля (рис. 2). Более низкий уровень АОА у старых животных может быть связан с возрастным уменьшением резерва антиоксидантной защиты, но у самок он остаётся на более высоком уровне в сравнении с самцами. Дополнительное введение ТФ самкам разного возраста не отразилось на общей антиокислительной активности плазмы крови по причине изначально высокого уровня АОА. У самцов введение ТФ повысило АОА вне зависимости от возраста.

Действие острого иммобилизационного стресса значительно активировало резервы антиокислительной защиты плазмы крови, вне зависимости от пола и возраста за счёт действия антиоксидантных ферментных систем. При дополнительном введении ТФ на фоне стресса сохраняются половые различия активации процесса АОА. У самцов вне зависимости от возраста она возрастает, у молодых самок не изменяется, что свидетельствует о значительном резерве антиоксидантной защиты плазмы крови у самок.

Введение тималина интактным животным не отразилось на уровне АОА, но введение его на фоне стресса увеличивает АОА вне зависимости от пола и возраста. Эффект влияния тималина на уровень АОА при стрессе, вероятно, обусловлен влиянием его на некоторые звенья

антиоксидантной защиты (ферментные системы), не исключаются и другие малоизученные эффекты действия тималина, в частности изменение чувствительности рецепторов к некоторым гормонам.

Осмотическая резистентность эритроцитов. Измерения показали, что *максимальная осмотическая резистентность* мембраны эритроцитов у молодых животных не имеет достоверных различий у животных разного пола и практически не меняется во всех вариантах опыта (разница с контролем не достоверна). Половые различия максимальной осмотической резистентности выявлены у старых крыс, где этот показатель значительно выше у старых самцов ($p < 0.01$). К изменениям *максимальной резистентности* мембраны эритроцитов приводят факторы стимуляции эритропоэза с последующим выходом в кровь молодых, более устойчивых эритроцитов (при отсутствии патологии эритропоэза и гемолитических анемий). В наших опытах отсутствовали факторы стимуляции эритропоэза. Более высокая максимальная осмотическая резистентность эритроцитарной мембраны старых самцов (в сравнении со старыми самками), скорее всего, связана с более низкой АОА плазмы крови. С возрастом уменьшается концентрация витаминов А и Е в плазме. Возрастное увеличение уровня перекисного окисления липидов приводит к ускоренному разрушению «старых» и относительному увеличению доли «молодых» эритроцитов.

Минимальная осмотическая резистентность эритроцитов оказалась более изменчивым показателем функционирования определённой части эритроцитов. У крыс в норме эритроциты со сниженной осмотической резистентностью (низкостойкие) составляют около 20% [13].

Минимальная осмотическая резистентность мембраны эритроцитов (рис. 3, 4) молодых самцов выше, чем у молодых самок ($p < 0.01$), подобная закономерность прослеживается и у старых животных ($p < 0.001$). Введение ТФ молодым животным разного пола не отразилось на уровне *минимальной осмотической резистентности* ($p > 0.05$ в сравнении с контролем) и значительно увеличило её показатели у старых самок ($p < 0.001$).

Снижение *минимальной осмотической резистентности* обнаружено у молодых самцов после стресса ($p < 0.01$). Дополнительное введение ТФ на фоне стресса привело к достоверному увеличению минимальной осмотической резистентности у молодых и старых самцов ($p < 0.01$ по сравнению с вариантом «Стресс»).

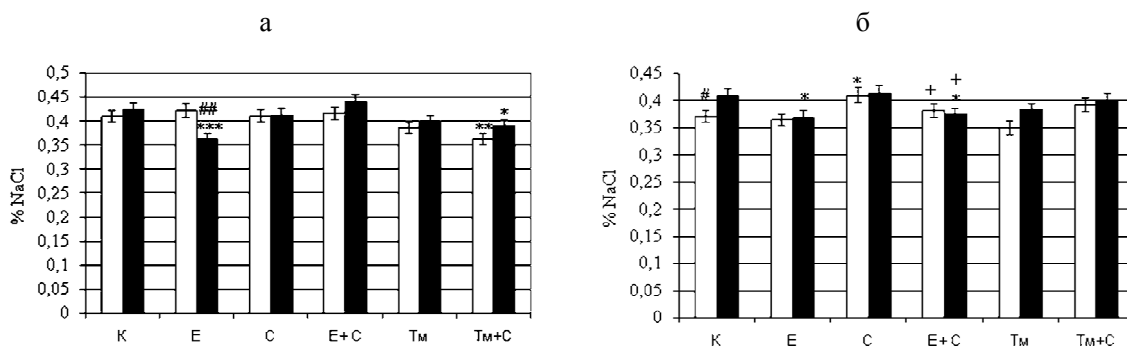


Рис. 3. Возрастные различия минимальной осмотической резистентности эритроцитов белых крыс, самок (а) и самцов (б); молодые животные – светлые столбики, старые – темные столбики

Примечание: достоверность разности с контролем: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; достоверность разности между возрастными группами: # $p \leq 0.05$; ### $p \leq 0.001$; достоверность разности с вариантом «Стресс»: + $p \leq 0.05$

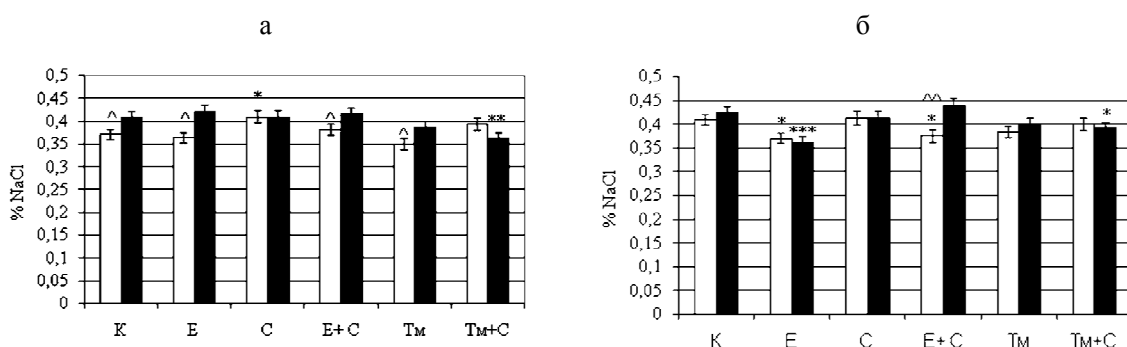


Рис. 4. Половые различия минимальной осмотической резистентности эритроцитов молодых (а) и старых (б) белых крыс; самцы – светлые столбики, самки – темные столбики

Примечание: достоверность разности с контролем: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; достоверность разности между полами: ^ $p \leq 0.05$; ^^ $p \leq 0.01$; ^^^ $p \leq 0.001$.

У молодых и старых самок воздействие стресса не отразилось на показателях *минимальной осмотической резистентности*, так же как и дополнительное введение альфа-токоферола ($p > 0.05$). Обнаружено увеличение *минимальной осмотической резистентности* при введении тималина на фоне стресса, независимо от возраста самок, в сравнении с вариантом «Стресс» ($p < 0.01$ у старых), ($p < 0.001$ у молодых). Введение только тималина не отразилось на изменении минимальной осмотической резистентности эритроцитов интактных животных.

Эти закономерности становятся понятными при сопоставлении результатов обоих направлений исследования. Более высокий антиоксидантный резерв плазмы крови самок обеспечивает защиту эритроцитарной мембраны от внешних воздействий, в том числе активизации процессов перекисного окисления. Высокая АОА плазмы крови самок увеличивает продолжительность жизни эритроцитов и позволяет сохранять в крови больше клеток со сниженной осмотической резистентностью. Наши опыты

показали, что с возрастом снижается АОА плазмы. Это связано с уменьшением концентрации содержания витаминов А, С, Е, с изменением активности ферментных систем. При этом истощается резерв антиоксидантной защиты и в самих эритроцитах, что приводит к снижению минимальной осмотической резистентности. Поэтому введение витамина Е старым животным увеличивает минимальную осмотическую резистентность независимо от пола особи.

Заключение

Дополнительное введение альфа-токоферола на фоне стресса оказывает протекторный эффект на эритроцитарную мембрану самцов независимо от возраста животных. Половые различия данного факта можно объяснить возрастными изменениями стероидного статуса и общей АОА самок.

У молодых самок более высокий уровень АОА позволяет увеличить продолжительность жизни низкостойких эритроцитов и дополни-

тельное введение альфа-токоферола не увеличивает минимальную осмотическую резистентность. У старых самок изменение уровня стероидов значительно снижает степень антиоксидантной защиты эритроцитов, и даже дополнительного введения ТФ в дозе 1 мг на 100 г массы животного не достаточно для заметного повышения минимальной осмотической резистентности эритроцитов. В пользу этого факта говорит более значительное увеличение минимальной осмотической резистентности при введении ТФ старым интактным самкам, в сравнении с самцами.

Обнаружен значительный протекторный эффект воздействия тималина на минимальную осмотическую резистентность эритроцитов на фоне стресса у молодых и старых самок, который имеет положительную взаимосвязь с уровнем АОА.

Список литературы

1. Rikans L.E., Moore D.R., Snowden C.D. Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver // *Biochim. et Biophys. Acta. Gen. Subj.* 1991. V. 1074. N 1. P. 195–200.
2. Matsuo M., Gomi F., Dooley M.M. Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain liver and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rat // *Mech. Ageing and Dev.* 1992. V. 64. N 3. P. 273–292.
3. Yanagawa K., Takeda H., Matsumiya T., Takasaki M. Age-related change in the alphas-tocopherol / alphas-tocopherol ratio in the rat erythrocyte membrane // *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 1999. V. 36. N 5. P. 335–341.
4. Andersen H.R., Jeune B., Nybo H. Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarians // *Age Ageing.* 1998. V. 27. № 5. P. 643–648.
5. Ozturk O., Gumuslu S. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, copper, zinc-superoxide dismutase and catalase activities, glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age // *Exp. Geront.* 2004. V. 39. № 2. P. 211–216.
6. Moorthy K., Sharma D., Basir S.F., Baquer N.Z. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferase in naturally menopausal rats // *Exp. Geront.* 2005. V. 40. P. 295–302.
7. Sahin E., Gumuslu S., Ozturk O. Marked changes in erythrocyte antioxidants and lipid peroxidation levels of rats exposed to acute, repeated and chronic restraint stress // *Pharmazie.* 2004. V. 59. № 12. P. 961–964.
8. Bhat M.S., Rao G., Murthy K.D., Bhat P.G. Housing in pyramid counteracts neuroendocrine and oxidative stress caused by chronic restraint in rats // *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2007. V. 4. № 1. P. 35–42.
9. Sapolsky R.M., Krey L.D., McEwen B.S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis // *Endocr. Rev.* 1986. V. 7. P. 284–301.
10. Pedersen W.A., Wan R.Q., Mattson M.P. Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems // *Mech. Ageing Dev.* 2001. V. 122. P. 963–983.
11. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Комаров О.С., Владимиров Ю.А. Оценка антиоксидантной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов. // *Лабораторное дело.* 1988. № 5. С. 59–62.
12. Гительзон И.М., Терсков И.А. Фотоэлектрическое исследование стойкости эритроцитов и некоторые результаты его применения // *Физиол. журн. СССР.* 1956. Т. 42. № 5. С. 397–402.
13. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте М.: Медицина, 1978. 176 с.

AGE-RELATED CHANGES IN ERYTHROCYTE OSMOTIC RESISTANCE

M.V. Kozak

A positive relationship between the erythrocyte osmotic resistance and the total antioxidant activity of blood plasma has been established. At introduction of alpha-tocopherol, the minimum erythrocyte osmotic resistance of old animals grows. A protective effect of thymaline action upon the erythrocyte osmotic resistance has been found in young and old female rats under stress.

Keywords: age, erythrocyte osmotic resistance, alpha-tocopherol, thymaline.