

На правах рукописи

ФИЛИПОВА
Ольга Николаевна

**МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ
АНЕМИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИЯХ**

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск-2005

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Рязанцева
Наталья Владимировна

доктор медицинских наук,
академик РАМН, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ

Новицкий
Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Степовая
Елена Алексеевна

кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник

Фомина
Татьяна Ивановна

Ведущая организация:

ГОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия Росздрава

Защита состоится «___» _____ 2005 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан «___» _____ 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Большая распространенность метгемоглобинообразователей в среде обитания человека определяет высокую частоту и неблагоприятные исходы отравлений данными веществами. Расширяющееся с каждым годом внедрение химических соединений в различные виды промышленности, быта, науки создает условия для повышенного образования метгемоглобина (metHb) в крови при действии окислителей, амидо- и нитропроизводных бензола, анилина, гидразина и его производных, окислов азота, нитритов натрия и калия [Pach J. et al., 1996; Струков М.А., 1999; Жаткин О.А., 1999; Башарин В.А., 2001]. Метгемоглобинообразующими свойствами обладает ряд лекарственных препаратов: фенацетин, нитроглицерин, викасол, некоторые сульфаниламиды и противомаларийные средства, анестетики [Могош Г., 1984; Curry S.C. et al., 1991; Rudlof B. et al., 1995; Khan N.A. et al., 1999; Тино Г. и соавт., 2001], бензилпенициллин [Сальникова Л.А. и соавт., 1989], альмагель [Самсыгина Г.А. и соавт., 1989], тетрациклины [Петренко Ю.М. и соавт., 1995].

Отравления метгемоглобинообразующими ксенобиотиками приводят к развитию полиорганных осложнений в постинтоксикационном периоде, характеризующихся длительными нарушениями со стороны нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной систем, печени, почек, а также системы красной крови [Scalfaro P. et al., 2000; Choi I.S., 2001; Pach J. et al., 2001].

Интерес к всестороннему изучению патологических процессов, протекающих в эритроцитах при воздействии на организм метгемоглобинообразователей, остается весьма значимым, поскольку гипоксия является ведущим синдромом данной патологии, а эритроцит представляет собой клетку, во многом определяющую кислородный статус организма [Моран Р., 1998; Тино Г. и соавт., 2001].

Известно, что развивающаяся при воздействии метгемоглобинообразователей на организм анемия носит гемолитический характер [Каюмова А.Ф., 1990; McMillan D.C. et al., 1991; Волжская А.М. и соавт., 1993; Кисляков Ю.Я. и соавт., 1993; Магакян Ю.А. и соавт., 1993, 1997]. При этом в патологический процесс вовлекаются как костномозговой компартмент, так и периферическое звено эритрона. Прежде всего страдает гемоглобиновый компонент красной

кровяной клетки. Качественные изменения гемоглобина оказывают влияние на структурные и функциональные свойства мембраны эритроцитов [Шиффман Ф.Дж, 2000].

Между тем остаются неясными основные патогенетические пути развития нарушений периферического звена эритрона при остром воздействии метгемоглобинообразователей. Тем более, что реакция циркулирующих эритроцитарных клеток на развивающийся патологический процесс характеризуется дезорганизацией белкового и липидного компонентов мембраны, дисфункцией ионтранспортирующих систем, нарастанием полиморфизма зрелых циркулирующих эритроцитов, а также нарушением функциональных свойств красных кровяных клеток [Fujii S., 1981; Терещенко И.П. и соавт., 1996; Новицкий и соавт., 2004]. В указанном аспекте особый интерес представляет комплексная оценка структурных свойств мембраны красных клеток крови и их роли в механизмах развития гемолитической анемии при экспериментальных метгемоглобинемиях.

Учитывая этот факт, вскрытие механизмов развития гемолитической анемии в ответ на острое воздействие метгемоглобинообразователей закономерно диктует необходимость сосредоточения научного интереса на исследовании структуры и функции мембраны эритроцитов.

Цель исследования. Определить роль нарушений структурных и функциональных свойств мембраны эритроцитов в механизмах развития гемолитической анемии при действии метгемоглобинообразователей в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Дать комплексную характеристику структурных свойств мембраны эритроцитов в остром и отдаленном периодах после однократного воздействия нитрита натрия (LD_{50}).

2. Выявить характер изменений периферического звена эритрона при развитии острой фенилгидразин-индуцированной метгемоглобинемии.

3. Выявить общие закономерности и особенности повреждения эритроцитарной мембраны при экспериментальной метгемоглобинемии, вызванной однократным воздействием нитрита натрия (LD_{50}) и солянокислого фенилгидразина (LD_{50}).

4. Получить новые данные о механизмах развития гемолитической анемии при экспериментальных метгемоглобинемиях.

Научная новизна. Впервые с использованием современных методов исследования дана комплексная сравнительная оценка периферического звена эритрона при экспериментальных метгемоглобинемиях, вызванных однократным введением нитрита натрия и фенилгидразина. Показано, что введение крысам метгемоглобинообразователей — нитрита натрия в дозе 90 мг/кг (LD_{50}) и солянокислого фенилгидразина в дозе 150 мг/кг (LD_{50}) — индуцирует развитие гемолитической анемии, одним из основных звеньев патогенеза которой является выраженная и длительная модификация мембраны красных клеток крови. Впервые установлено, что характер и степень выраженности нарушений периферического звена эритрона при экспериментальных метгемоглобинемиях зависят от химических особенностей ксенобиотиков, концентрации метгемоглобина в крови и продолжительности острого периода метгемоглобинемии. Обнаружено, что введение солянокислого фенилгидразина в дозе 150 мг/кг (LD_{50}) оказывает более выраженный повреждающий эффект на эритроцитарную популяцию, чем введение нитрита натрия в дозе 90 мг/кг (LD_{50}).

Практическая значимость работы. В результате проведенного исследования получены новые данные фундаментального характера, дополняющие существующие представления о патогенезе нарушений в системе эритрона при метгемоглобинемиях. Полученные по итогам работы данные могут быть использованы для разработки новых целенаправленных патогенетически обоснованных способов предупреждения и коррекции нарушений со стороны системы красной крови при токсических метгемоглобинемиях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Однократное внутрибрюшинное введение крысам метгемоглобинообразователей нитрита натрия в дозе 90 мг/кг (LD_{50}) и солянокислого фенилгидразина в дозе 150 мг/кг (LD_{50}) вызывает развитие гемолитической анемии, механизмы развития которой сопряжены с изменением структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов.

2. Изменения структурно-функционального статуса мембраны эритроцитов при остром воздействии нитрита натрия (LD_{50}) и солянокислого фенилгидразина (LD_{50}) носят однонаправленный характер и характеризуются дестабилизацией липидного спектра, повышением микровязкости липидной фазы, увеличением уровня мембранно-связанного гемоглобина и угнетением активности Na^+, K^+ -АТФазы.

3. Степень выраженности модификации мембраны эритроцитов при острым воздействии метгемоглобинообразователей — нитрита натрия (LD_{50}) и солянокислого фенилгидразина (LD_{50}) — определяется химическими особенностями ксенобиотиков, концентрацией метгемоглобина в крови и продолжительностью острого периода метгемоглобинемии.

Апробация и реализация результатов работы. Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 2004), VI Международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2005), итоговых научно-практических конференциях профессорско-преподавательского состава и слушателей Томского военно-медицинского института (Томск, 2004; 2005), Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2005).

Диссертационная работа выполнена в рамках отраслевой программы Росздрава «Гематология и трансфузиология» (раздел «Фундаментальные механизмы нарушений мембран эритроцитов в клинике внутренних болезней», договор №005/037/002).

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом по грантам при Президенте РФ для ведущих научных школ РФ по проблеме «Молекулярные механизмы нарушения структуры, метаболизма и функции клеток крови при патологии» (НШ-1051.2003.4).

Основные результаты диссертационного исследования включены в лекционный курс по патологической физиологии (раздел «Патофизиология клетки») и гематологии (раздел «Приобретенные гемолитические анемии») на лечебно-профилактическом, педиатрическом и медико-биологическом факультетах ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из которых 1 — в центральном рецензируемом журнале.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и библиографического списка, включающего 298 источников (205 отечественных и 93 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 15 рисунками.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 240 крысах-самцах линии Wistar массой 190-250 г. Метгемоглобинемию моделировали однократным внутрибрюшинным введением 0,6% раствора нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (LD_{50}) и 2% раствора солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг массы животного (LD_{50}). Для определения LD_{50} метгемоглобинообразователей использовали экспресс-метод, предложенный В.Б. Прозоровским [1994].

Забор крови у экспериментальных животных осуществляли из хвостовой вены [Западнюк И.П. и соавт., 1983] через 1,5 ч, 1, 3, 5, 7, 13-е и 21-е сут после введения нитрита натрия и фенилгидразина. Кровь стабилизировали гепарином (50 ЕД/мл). Все проводимые вмешательства осуществлялись с соблюдением принципов Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации [пересмотр 48-й Генеральной ассамблеей, 1996] о гуманном обращении с животными.

Распределение подопытных животных в зависимости от содержания эксперимента и использованных методов исследования представлено в таблице.

Степень тяжести гипоксии, развивающейся у животных в ходе эксперимента, определяли по критериям, предложенным Н.Ф. Иваницкой [1976].

Определение содержания гемоглобина, количества эритроцитов, ретикулоцитов и величины цветового показателя проводили стандартными гематологическими методами [Козинец Г.И., Макаров В.А., 1997].

Уровень метгемоглобина (metHb) определяли по методу, предложенному М.С. Кушаковским [1968] и основанному на определении разницы поглощения света длиной волны 630 нм растворами метгемоглобина и цианметгемоглобина.

Индекс деструкции эритроцитов в крови у экспериментальных животных рассчитывали с целью изучения интенсивности внутрисосудистого гемолиза. Для этого определяли содержание внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) и гемоглобина крови. Определение уровня ВЭГ проводили гемиглобинцианидным методом [Левина Л.Д. и соавт., 1993]. Концентрацию гемоглобина в крови определяли унифицированным методом. Индекс деструкции эритроцитов (ИДЭ) рассчитывали по формуле: $ИДЭ = ВЭГ \times 1000 / Hb$ [Шперлинг И.А., 2002].

Об относительном содержании мембранно-связанного гемоглобина (МСГ) в эритроцитах судили по спектроскопической убыли дериватов гемоглобина из гемолизатов после центрифугирования [Токтамысова З.С. и соавт., 1990] в нашей модификации.

Мембраны эритроцитов выделяли по методу J. T. Dodge [1963], основанном на феномене гипоосмотического гемолиза клеток. Определение активности Na^+, K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов проводили методом, предложенным А.М. Казенновым и соавт. [1984] и основанном на накоплении неорганического фосфора (P_i) в среде, содержащей АТФ, в результате его гидролиза под действием АТФазы. Уровень P_i определяли по методу P.S. Chen et al. [1956].

Липиды мембраны эритроцитов экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью по методу J. Folch et al. [1957]. Для определения абсолютного содержания общих липидов и фосфолипидов использовали метод, предложенный W. Bloor [1947] и J. Bragdon [1951]. Разделение нейтральных липидов проводили методом тонкослойной хроматографии. Для этого использовали систему растворителей гептан:диэтиловый эфир:этилацетат (в соотношении 80:20:1,5) и пластины «Sorbfil» (Россия) [Финдлей Дж. Б., Эванз У.Г., 1990]. Для разделения фракций фосфолипидов мембраны эритроцитов методом тонкослойной хроматографии сухой липидный остаток разводили гептаном и наносили на пластинки «Sorbfil» (Россия). Пластины помещали в камеру с системой хлороформ:метанол:вода (в соотношении 32:12,5:2) [Финдлей Дж. Б., Эванз У.Г., 1990]. Идентификацию фракций липидов осуществляли с использованием стандартов (фирма «Sigma», США). Количественную оценку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы.

Измерение собственной флуоресценции теней эритроцитов, а также определение спектральных характеристик взаимодействия мембран с флуорофором пирен проводили на спектрофлуориметре «Hitachi – MPF4» (Япония). Для оценки микровязкостных свойств липидной фазы и гидрофобного объема мембран эритроцитов рассчитывали коэффициент эксимеризации пирена (I_{470}/I_{370}), равный отношению максимумов интенсивностей флуоресценции эксимерной формы зонда к мономерной при длинах волн возбуждающего света 285 и 340 нм. Полярность окружения молекул пирена оценивали по соотношению I_{370}/I_{390}

при длине волны возбуждающего света 340 нм. Процент индуктивно-резонансного переноса энергии с триптофана на пирен, позволяющий судить о белково-липидных взаимодействиях в мембране, рассчитывали по формуле: $R = (1 - I^*_{340} / I_{340}) \cdot 100 \%$, где I_{340} – интенсивность собственной флуоресценции мембраны эритроцитов при возбуждении светом с длиной волны 285 нм в отсутствии пирена, I^*_{340} – интенсивность собственной флуоресценции мембраны эритроцитов при возбуждении светом с длиной волны 285 нм при добавлении пирена [Добрецов Г.Е., 1989].

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с использованием стандартного пакета программ «Statistica for Windows» (2000, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc.». Нормальность распределения количественных показателей была проверена с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Затем проверяли статистическую гипотезу о равенстве средних значений с помощью t-критерия Стьюдента. Для сравнения признаков, не отвечающих требованиям нормального распределения, был использован непараметрический тест Манна-Уитни (U-тест). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Славин М.Б., 1989].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы наметилась очевидная тенденция к увеличению случаев отравления людей соединениями, обладающими метгемоглобинообразующими свойствами [Майоров В.М. и соавт., 1998; Головки А.И. и соавт., 2000; Ostapenko Y.N. et al., 2001]. Эти отравления характеризуются скоротечностью и высокой частотой смертельных исходов [Сиваченко В.Н., 1995; Лужников Е.А. и соавт., 2000; Онищенко Г.Г., 2002].

Современные сведения о токсикологии НН и ФГ позволяют говорить о большом многообразии эффектов, вызываемых этими соединениями, включая метгемоглобинообразование, активацию свободно-радикального окисления, подавление активности антиоксидантных систем клеток, что для эритроцита чревато изменением структурно-метаболического и функционального статуса (рис. 1).

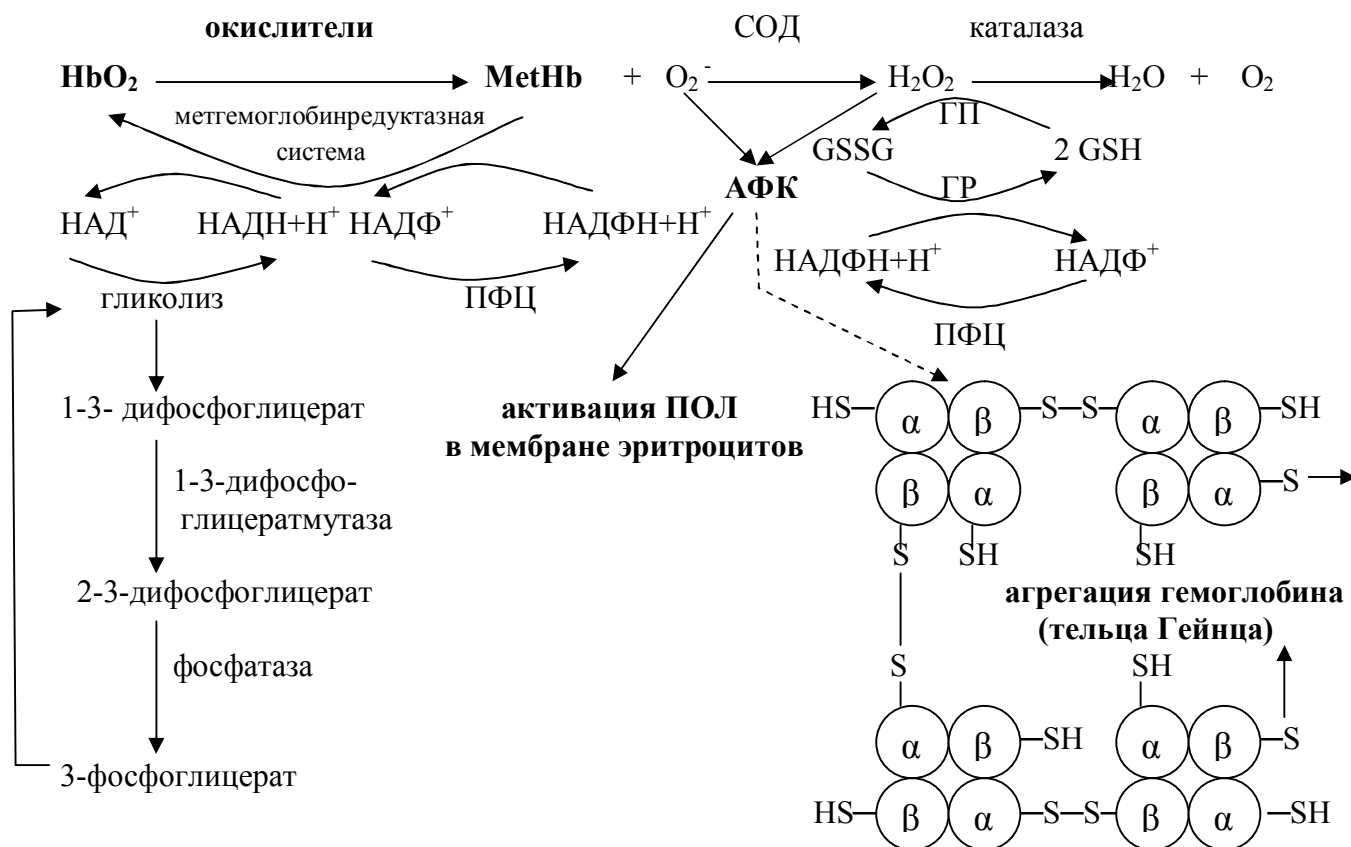


Рис. 1. Молекулярные механизмы повреждения эритроцитов при воздействии метгемоглобинообразователей [по данным В.В. Новицкого и соавт., 2004; Т. С. Федоровой, 2005].

В основе действия метгемоглобинообразующих ксенобиотиков лежат окисление двухвалентного железа гемоглобина в трехвалентное с потерей возможности обратимой связи с O_2 , снижение активности дыхательных ферментов [Штабский Б. М. и соавт., 1996; Лукьянова Л. Д., 1997; Артамонов Р.Г., 2004].

Результаты проведенного нами исследования показали, что через 1,5 ч после однократного введения крысам НН в дозе 90 мг/кг существенно возрастало содержание metHb в крови ($51,95 \pm 1,59\%$ при $1,19 \pm 0,24\%$ в контроле, $p < 0,001$). В последующие сроки наблюдения (с 1-х сут и вплоть до окончания эксперимента - 21 сут) уровень metHb в крови экспериментальных животных не отличался от такового у крыс контрольной группы (рис. 2).

Однократное введение крысам ФГ в дозе 150 мг/кг приводило через 30 мин к резкому возрастанию концентрации metHb в крови (до $22,31 \pm 1,10\%$ при $1,19 \pm 0,24\%$ в контроле, $p < 0,001$). Через 24 ч после введения ксенобиотика уровень metHb в крови у подопытных животных сохранялся достоверно повышен-

ным ($p < 0,001$), составляя в среднем $7,50 \pm 0,19\%$. В последующем значение изучаемого показателя постепенно снижалось и с 3-х по 21-е сут эксперимента достоверно не отличалось от нормы (рис. 2).

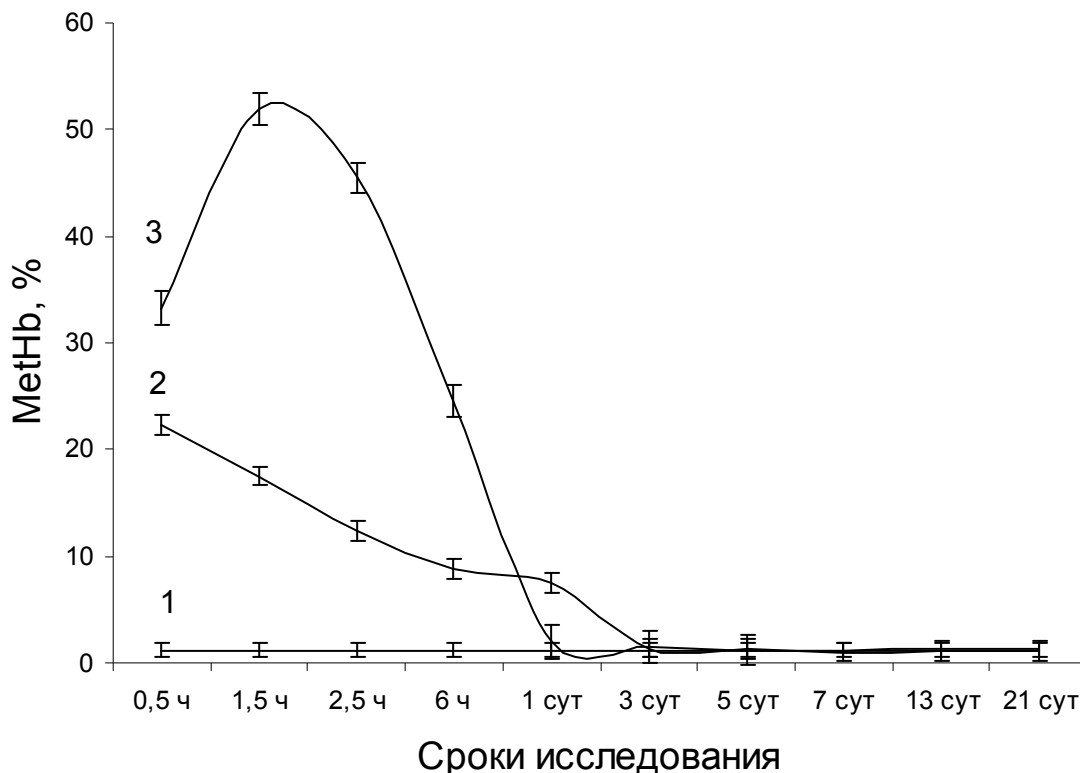


Рис. 2. Динамика содержания метгемоглобина (MetHb) в крови у крыс после однократного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (1 - контроль; 2 - после введения ФГ; 3 - после введения НН)

Однократное воздействие НН сопровождалось развитием анемии в острый период метгемоглобинемии. Явления анемического синдрома носили кратковременный характер – уже на 3-и сут эксперимента отмечалась нормализация изученных показателей (количество циркулирующих эритроцитов, концентрация гемоглобина, величина гематокрита).

При ФГ-индуцированной метгемоглобинемии у экспериментальных животных, напротив, анемия носила более пролонгированный характер и регистрировалась в течение 7-ми сут с момента начала эксперимента. Наиболее выраженные изменения количественных показателей периферического звена эритроцитоза были установлены на 3-и сут эксперимента. Таким образом, однократное

введение метгемоглобинообразователей подопытным животным вызывало развитие анемии, более выраженной и продолжительной после воздействия солянокислого ФГ.

Причинами развития анемии у экспериментальных животных после однократного введения метгемоглобинообразователей могут являться гемодилюция и усиление эритродиереза [Шперлинг И.А., 2002]. Развитие гемодилюции могло быть следствием перемещения в кровеносное русло внесосудистой жидкости в ответ на снижение системного артериального давления, вызванного фармакологическим действием ксенобиотиков и гипоксией [Середенко М.М. и соавт., 1987; Лисаченко Г.В., 1992; Джурко Б.И., 1994; Сиваченко В.Н., 1995; Банных С.В., 1996]. Процесс ускорения эритродиереза при повышенном метгемоглобинообразовании может быть обусловлен несколькими причинами. В основе ряда из них лежит истощение антиокислительного потенциала клетки [Рубина Х.М., 1979; Бурбелло А.Т. и соавт., 1991; Pirmohamed M. et al., 1996]. Усилению разрушения циркулирующих эритроцитов способствует образование агрегатов гемоглобина под воздействием окислительной деструкции глобина (тельца Гейнца), а также снижение деформационных свойств и изменение формы красных клеток крови в условиях окислительной модификации белковых и липидных молекул мембраны эритроцитов [Гольдберг Е.Д., 1989; Bunn H.F., 1994; Шиффман Ф. Дж., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004].

В проведенных нами исследованиях также был выявлен факт повышенного разрушения циркулирующих эритроцитов у экспериментальных животных после введения метгемоглобинообразователей. Так, в течение длительного периода от начала эксперимента (до 7-х сут) отмечался высокий уровень внеэритроцитарного гемоглобина и индекса деструкции эритроцитов, что указывало на гемолитическую природу развивающейся анемии. Следует отметить, что более интенсивный гемолиз был зарегистрирован при рассмотрении анемии, обусловленной введением солянокислого фенилгидразина (рис. 3).

По всей видимости, в ответ на длительное гипоксическое состояние в организме животных вследствие блокады кислородтранспортной функции гемоглобина и эритроцитопении при метгемоглобинемиях развивается компенсаторная стимуляция регенераторной активности эритроидного ростка костного мозга [Морозова О.А., 1988; Быкова И.А., 1993; Шиффман Ф.Дж., 2001]. Ретикулоцитоз, более выраженный при ФГ-индуцированной метгемоглобинемии,

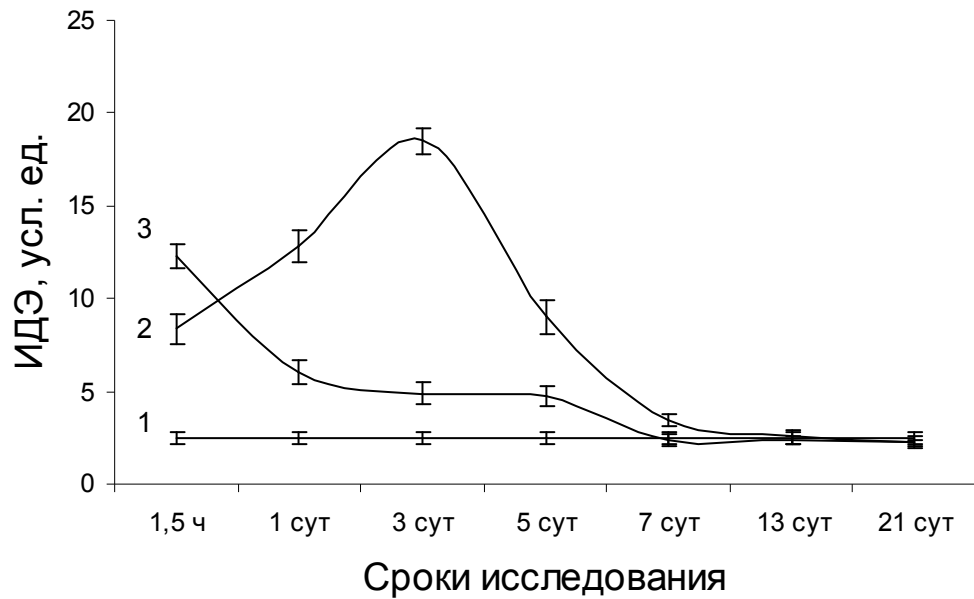


Рис. 3. Изменения индекса деструкции эритроцитов (ИДЭ) у крыс после однократного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (1 - контроль; 2 - после введения ФГ; 3 - после введения НН)

развивался в ответ на тяжелую гипоксию. Однако длительное функциональное напряжение эритроидного ростка костного мозга способно приводить к поступлению в кровотоки функционально неполноценных эритроцитов.

Причина выявленных различий действия ксенобиотиков на количественные показатели периферического звена эритрона может быть связана со специфическими свойствами данных веществ. Так, солянокислый ФГ обладает более выраженными прооксидантными свойствами [Башарин В.А., 2001; Шперлинг И.А., 2002], медленно выводится из организма (в течение 1 сут) [Springer D.L. et al., 1981], тогда как НН быстро элиминируется из кровотока (около 1 ч) [Сиваченко В.Н., 1995]. Известно, что нитрит-ион диффундирует внутрь эритроцита через мембрану благодаря обмену с моновалентными анионами [Shingles R. et al., 1997], окисляет Нb путем смещения электронной плотности у атома железа [Реутов В.П. и соавт., 1983]. Различия в динамике изменения уровня MetHb и количества эритроцитов при нитрит- и фенилгидразининдуцированной анемии, видимо, связано как с более выраженным гемолизом, так и с нарушениями гликолитического пути восстановления MetHb при действии фенилгидразина [Овчинников В.В., 1967; Гадачкян Н.А., 1972].

Анализ данных, полученных в ходе проведенного нами исследования структурных свойств эритроцитарной мембраны у крыс в динамике метгемоглобинемий, индуцированных однократным введением НН и ФГ, позволил выявить комплекс нарушений липидного матрикса мембраны красных клеток крови. Так, в мембране эритроцитов у животных, подвергнутых воздействию НН в дозе 90 мг/кг, было обнаружено снижение абсолютного содержания общих липидов и фосфолипидов в эритроцитарной мембране в течение первых 7-ми сут от начала эксперимента. Фракционный состав липидов мембраны эритроцитов также претерпевал значительные изменения: было отмечено увеличение относительного содержания холестериновой фракции на фоне снижения уровня общих фосфолипидов и повышения доли фракции эфиров холестерина, что приводило к изменению соотношения холестерин/фосфолипиды, имеющего большое значение для поддержания стабильного состояния мембраны эритроцитов (рис. 4, а).

Наряду с этим обращало на себя внимание отчетливое перераспределение относительного содержания фракций фосфолипидов в мембране эритроцитов у животных в динамике метгемоглобинемии, вызванной действием нитрита натрия. Существенные изменения фосфолипидной композиции мембраны красных кровяных клеток у экспериментальных животных характеризовались увеличением уровня лизофосфатидилхолина, сфингомиелина, фосфатидилсерина при одновременном снижении доли фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (рис. 5, а).

Аналогичная динамика изменений абсолютного и относительного количества компонентов липидного бислоя эритроцитарной мембраны была отмечена при исследовании структурных свойств мембраны красных клеток крови у животных после введения солянокислого ФГ (максимальные отклонения соответствовали 3-им сут от начала эксперимента) (рис. 4, б; 5, б). Однако при воздействии указанного ксенобиотика изменения липидной фазы мембраны эритроцитов были выражены в большей степени и сохранялись в течение более длительного периода времени, чем при воздействии НН, что, по всей видимости, было связано со спецификой влияния солянокислого ФГ, являющегося более мощным прооксидантом в отличие от НН [Башарин В.А., 2001; Шперлинг И.А., 2002].

Выявленные изменения липидного компонента мембраны эритроцитов явились, вероятно, следствием многофакторного воздействия на клетки красной крови и эритроцитарную мембрану, в частности. Считается, что важными механизмами модификации липидного компартмента мембраны эритроцитов являются усиление процессов перекисного окисления липидов и ферментативного гидролиза [Кожевников Ю.Н., 1985; Владимиров Ю.А., 1989; Микаелян Н.А. и соавт., 1997]. Наряду с активацией ПОЛ, накопление в эритроцитах ионов Ca^{2+} - вторичного мессенджера, переносящего сигнал от поверхности внутрь клетки, запускает совокупность процессов, к которым относятся активация Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз, аминокислотной трансферазы, скрамблазы, протеаз, приводящих к нарушению структуры эритроцитарной мембраны [Владимиров Ю.А., 2002].

После введения НН у экспериментальных животных было выявлено значительное увеличение уровня мембранно-связанного гемоглобина (МСГ) в течение 5-ти сут от момента начала эксперимента. Анализ относительного содержания мембранно-связанного гемоглобина у животных после воздействия ФГ выявил более выраженные и длительные изменения изучаемого показателя (в течение 7-ми сут наблюдения) (рис. 6).

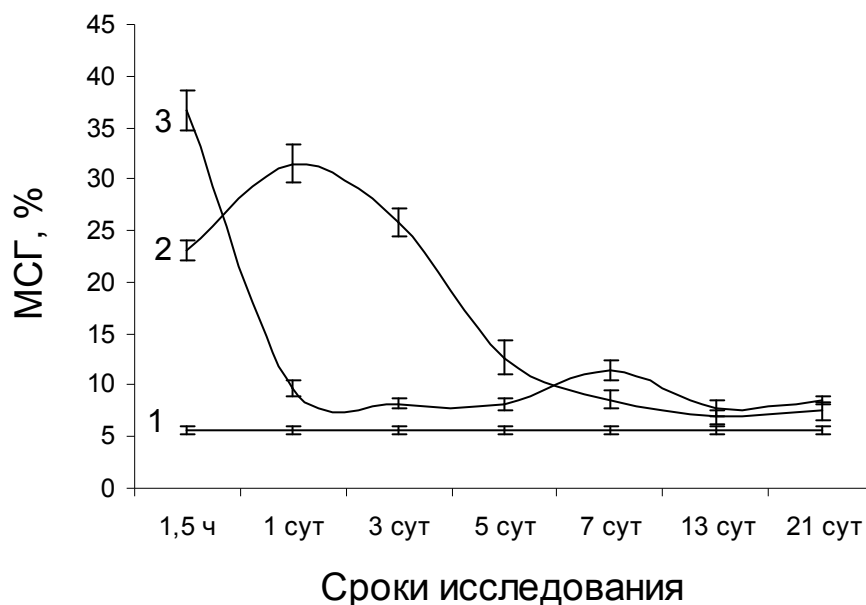


Рис. 6. Уровень мембранно-связанного гемоглобина (МСГ) у крыс после однократного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (1 - контроль; 2 - после введения ФГ; 3 - после введения НН)

На наш взгляд, объяснение причины выявленных изменений можно найти в сущности сложного взаимодействия структурных компонентов мембраны эритроцита и гемоглобина. Известно, что взаимодействие гемоглобина с мембраной эритроцита обусловлено комплексом факторов: структурным состоянием липидного компартмента эритроцитарной мембраны, микровязкостными свойствами липидного бислоя, природой полярных групп липидов, плотностью поверхностного заряда, а также структурно-функциональным состоянием молекулы гемоглобина [Бондаренко С.В. и соавт., 1985; Шиффман Ф. Дж., 2000].

Сравнивая степень выраженности количественных изменений мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах при анемиях, вызванных различными соединениями, необходимо отметить, что при воздействии НН эти изменения в острый период были более выражены по сравнению с фенилгидразиновой моделью анемии. Анализ указанных изменений в динамике дает право говорить об их обратимости, так как изучаемые параметры обладали выраженной лабильностью, в то время как после воздействия ФГ изменения уровня мембранно-связанного гемоглобина были относительно стабильны при тех же условиях. По всей видимости, образование MetHb при воздействии НН приводит к образованию мембранно-связанного комплекса по механизму обратимого ионного взаимодействия, а при воздействии ФГ — более прочных ковалентных связей [Ушакова И.П. и соавт., 1981].

Определение степени эксимеризации флуоресцентного зонда пирен в мембране эритроцитов у крыс после однократного воздействия нитрита натрия позволило установить существенные изменения структуры мембраны в течение 13-ти сут эксперимента, наиболее выраженные в острый период метгемоглобинемии (через 1,5 ч от начала эксперимента) и характеризующиеся повышением упорядоченности молекул как интегрального липидного бислоя, оцениваемой при $\lambda_{\text{в}}=340$ нм (коэффициент $I_{470}/I_{370} = 0,273 \pm 0,011$ усл.ед. при соответствующем значении контрольной группы — $0,560 \pm 0,014$ усл.ед., $p < 0,001$), так и анулярной липидной фракции (коэффициент I_{470}/I_{370} при $\lambda_{\text{в}}=285$ нм был равен $0,237 \pm 0,015$ усл.ед., что в 1,7 раза ниже контрольного значения).

После однократного введения ФГ у животных были выявлены признаки возрастания микровязкости липидного компонента эритроцитарной мембраны на протяжении всего периода наблюдения, при этом наиболее выраженные из-

менения структурных свойств мембраны красных кровяных клеток соответствовали острому периоду метгемоглобинемии. Так, через 1 сут после введения ФГ было выявлено увеличение микровязкости липидной фазы как в области белок-липидных контактов, на что указывало достоверное снижение по сравнению с соответствующим показателем у животных контрольной группы степени эксимеризации пирена при $\lambda_{\text{в}}=285$ нм до $0,255\pm 0,009$ усл.ед. (при $0,402\pm 0,011$ усл.ед. в норме), так и суммарной липидной фазы (степень эксимеризации пирена при $\lambda_{\text{в}}=340$ нм была снижена до $0,287\pm 0,012$ усл. ед. при $0,560\pm 0,014$ усл. ед. в норме).

Выявленное снижение текучести липидного компонента мембраны эритроцитов могло быть следствием интенсификации процессов перекисного окисления липидов. Это предположение согласуется с обнаруженным нами значительным увеличением показателя I_{370}/I_{390} при $\lambda_{\text{в}}=340$ нм, указывающим на возрастание полярности микроокружения зонда в интегральной липидной фазе эритроцитарной мембраны, одной из причин которого может быть повышение содержания полярных молекул воды в условиях интенсификации липопероксидации.

Как показало проведенное в нашей лаборатории исследование, в эритроцитарной мембране у животных при остром воздействии НН и ФГ имело место отчетливое угнетение активности мембранно-ассоциированного ионтранспортирующего энзима Na^+, K^+ -АТФазы, носящее пролонгированный характер (до 21-х сут). Минимальный уровень активности Na^+, K^+ -АТФазы в мембране красных кровяных клеток у животных после введения НН был зафиксирован через 1,5 ч от начала эксперимента и составлял в среднем 15 % от среднестатистической нормы ($0,050\pm 0,004$ мкмоль P_i /час·мг белка при контроле $0,326\pm 0,005$ мкмоль P_i /час·мг белка, $p<0,001$). После введения ФГ через 1 сут средний уровень активности Na^+, K^+ -АТФазы был равным $0,101\pm 0,003$ мкмоль P_i /час·мг белка, еще более значимое угнетение активности этого ионтранспортирующего фермента было выявлено на 3-и сут наблюдения ($0,049\pm 0,003$ мкмоль P_i /час·мг белка, что в 6,7 раза ниже аналогичного показателя у животных контрольной группы). В дальнейшем отмечалась тенденция к нормализации активности изучаемого энзима.

Не исключено, что ингибирование активности Na^+, K^+ -АТФазы является результатом выявленной структурной модификации липидного матрикса эритроцитарной мембраны. Так, повышенное содержание лизофосфатидилхолина оказывает ингибирующее влияние на активность Na^+, K^+ -насоса в мембране красных клеток крови [Lijnem P. et al., 1990]; накопление холестерина приводит к увеличению микровязкости липидного бислоя и нарушению функционирования мембранассоциированных энзимов [Каплан О.В., 1995; Левшина И.П. и соавт., 1995; Rock E. et al., 1995; Sein K.K., 1998]. Кроме того, ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы возможно и путем прямого воздействия на фермент свободно-радикальных соединений, химической атаки SH-групп Na^+, K^+ -АТФазы [Болдырев А.А. и соавт., 1996] в условиях усиления липопероксидации, в результате чего происходит ее разобщение с активным транспортом ионов, а затем и ингибирование гидролитической активности [Elmoselhi A.B. et al., 1994]. Долговременное снижение активности энзима при действии НН и ФГ можно считать следствием необратимых изменений в мембране как циркулирующих эритроцитов, так и юных форм, генерируемых в условиях напряженного эритропоэза в гипоксический период [Зюзьков Г.Н. и соавт., 2004].

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что однократное введение нитрита натрия в дозе 90 мг/кг (LD_{50}) приводило к повышению относительного содержания метгемоглобина в крови (в среднем до 52%), а также выраженным нарушениям структуры и функции мембраны циркулирующих эритроцитов. Относительное восстановление изученных количественных характеристик периферического звена эритрона происходило лишь через 13-21 сут после введения ксенобиотика. Выявленный факт, на наш взгляд, является следствием повышенной окислительной нагрузки на эритроциты в острый период метгемоглобинемии и «истощения» метаболического резерва эритроцитов, что приводило к ускоренному старению клеток в отдаленный период.

Метгемоглобинемия у крыс, вызванная однократным введением солянокислого фенилгидразина в дозе 150 мг/кг (LD_{50}), характеризовалась большей пролонгированностью, чем метгемоглобинемия, индуцированная введением нитрита натрия. Ответная реакция периферического звена эритрона на действие этого ксенобиотика характеризовалась выраженными деструктивными процессами, приводящими к развитию анемического синдрома, глубоким изменениям

структурно-функциональных свойств эритроцитов. Сохранившиеся в течение всего эксперимента нарушения статических и динамических свойств липидного матрикса мембраны красных клеток крови, а также дисфункция ионотранспортирующих систем эритроцитарной мембраны, как нам представляется, являлись причиной повышенной деструкции эритроцитов.

Следует отметить, что анемический синдром, развивающийся при метгемоглобинемиях, имеет достаточно сложный генез (рис. 7). Результаты настоящего исследования позволяют сделать вывод о факте выраженной дезорганизации мембраны эритроцитов после острого воздействия метгемоглобинообразователей, влекущей за собой развитие гемолитической анемии. Степень выраженности и длительность анемического синдрома зависит от химического строения токсикантов, концентрации метгемоглобина в крови, продолжительности острого периода метгемоглобинемии, а также степени структурно-метаболической и функциональной сохранности красных клеток крови. В период повышенного содержания метгемоглобина в крови наряду со снижением ее кислородной емкости и повышенной потребности организма в кислороде в условиях гипоксического стресса, нарушения функциональных свойств эритроцитов, без всякого сомнения, вносили существенный вклад в усугубление гипоксических расстройств и повышали риск срыва адаптивных механизмов при действии метгемоглобинообразователей.

ВЫВОДЫ

1. Однократное внутрибрюшинное введение крысам метгемоглобинообразователей нитрита натрия в дозе 90 мг/кг и солянокислого фенилгидразина в дозе 150 мг/кг индуцирует развитие гемолитической анемии.

2. Выраженность и длительность нарушений периферического звена эритрона при экспериментальных метгемоглобинемиях определяются химическими особенностями ксенобиотиков, концентрацией метгемоглобина в крови и продолжительностью острого периода метгемоглобинемии.

3. Механизмы анемии, развивающейся при экспериментальных метгемоглобинемиях, связаны с повышенным гемолизом циркулирующих эритроцитов

вследствие нарушения структурных и функциональных свойств мембраны красных клеток крови.

4. Нарушения структурного статуса эритроцитарной мембраны у крыс, подвергшихся острому воздействию нитрита натрия (LD_{50}) и солянокислого фенилгидразина (LD_{50}), характеризуются снижением абсолютного содержания общих липидов и фосфолипидов, нарушением липидного спектра — увеличением доли холестерина, лизофосфатидилхолина, сфингомиелина и фосфатидилсерина на фоне снижения содержания фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина, увеличением содержания мембраносвязанной фракции гемоглобина, возрастанием микровязкости как в области интегральной липидной фазы, так и в области анулярных липидов, а также угнетением активности Na^+, K^+ -АТФазы.

5. Признаки структурной модификации мембраны эритроцитов при введении нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина (LD_{50}) в эксперименте носят пролонгированный характер, сохраняясь в период ликвидации метгемоглобинемии и восстановления количественных параметров периферического звена эритрона.

6. Изменения структурных особенностей эритроцитарной мембраны при метгемоглобинемиях, индуцированных действием нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина в LD_{50} , носят однонаправленный характер, при этом действие фенилгидразина характеризуется более выраженным и длительным мембранодестабилизирующим эффектом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль мембранно-связанного гемоглобина в патогенезе отравлений метгемоглобинообразователями // Сборник статей по материалам научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины», Астрахань, 6-10 мая 2004. — Астрахань, 2004. — С. 109-111 (в соавт. с Шперлингом И.А., Рязанцевой Н.В., Басом В.В., Роговым О.А.).
2. О составе мембранно-связанного гемоглобина // Материалы заочной электронной конференции «Современные проблемы науки и образования», 15-20 ноября 2004. — Современные наукоёмкие технологии. — 2004.

- № 6. — С. 104-105 (в соавт. с Шперлингом И.А., Рязанцевой Н.В., Басом В.В., Роговым О.А.).
3. Изучение структурных свойств мембраны эритроцитов методом флуоресцентного зондирования в динамике нитритной метгемоглобинемии // Материалы заочной электронной конференции «Фундаментальные исследования», 20-25 февраля 2005. — Фундаментальные исследования. — 2005. — № 4. — С. 90-91 (в соавт. с Шперлингом И.А., Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Роговым О.А., Куприной Н.П., Акимовой В.В.).
 4. Исследование активности Na^+, K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов в динамике нитритной метгемоглобинемии // Материалы заочной электронной конференции «Фундаментальные исследования», 20-25 февраля 2005. — Фундаментальные исследования. — 2005. — № 4. — С. 91-92 (в соавт. с Шперлингом И.А., Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Роговым О.А., Куприной Н.П., Акимовой В.В., Басом В.В.).
 5. К вопросу о модификации белкового состава мембран эритроцитов при воздействии гематотропных ксенобиотиков // Материалы заочной электронной конференции «Фундаментальные исследования», 20-25 февраля 2005. — Фундаментальные исследования. — 2005. — № 4. — С. 92-94 (в соавт. с Шперлингом И.А., Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Роговым О.А., Куприной Н.П., Акимовой В.В., Басом В.В.).
 6. Активность Na^+, K^+ -АТФазы в эритроцитах при гемолитической анемии // Материалы заочной электронной конференции «Фундаментальные исследования», 10-15 апреля 2005. — Фундаментальные исследования. — 2005. — № 5. — С. 116-117 (в соавт. с Шперлингом И.А., Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Роговым О.А., Акимовой В.В., Басом В.В.).
 7. Механизмы нарушения функциональных свойств эритроцитов при экспериментальной фенилгидразининдуцированной метгемоглобинемии // Бюллетень сибирской медицины. — 2005. — № 3. — С. 37-44 (в соавт. с Шперлингом И.А., Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Роговым О.А., Басом В.В.).
 8. Отдаленные эффекты в мембранах эритроцитов при воздействии метгемоглобинообразователей // Сборник статей по материалам Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии»

- Санкт-Петербург, 2005 г. — СПб., 2005. — С. 55-57 (в соавт. с Шперлингом И.А., Рязанцевой Н.В., Роговым О.А.).
9. Мембранные факторы разрушения эритроцитов при гемолитической анемии // Сборник статей по материалам VI Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», Томск, 19-20 мая 2005. — Томск, 2005. — С. 69 (в соавт. с Акимовой В.В., Шперлингом И.А., Рязанцевой Н.В.).
10. Функциональные свойства мембран эритроцитов при экспериментальной гемолитической анемии // Сборник статей по материалам VI Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», Томск, 19-20 мая 2005. — Томск, 2005. — С. 83-84 (в соавт. с Роговым О.А., Шперлингом И.А.).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | | |
|------------------|---|------------------------------------|
| АОЗ | - | антиокислительная защита |
| АТФ | - | аденозинтрифосфат |
| АФК | - | активные формы кислорода |
| ВЭГ | - | внеэритроцитарный гемоглобин |
| Г-6-ФДГ | - | глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа |
| ГП | - | глутатионпероксидаза |
| ГР | - | глутатионредуктаза |
| ИДЭ | - | индекс деструкции эритроцитов |
| МСГ | - | мембранно-связанный гемоглобин |
| НАД | - | никотинамидадениндинуклеотид |
| НАДФ | - | никотинамидадениндинуклеотидфосфат |
| НН | - | нитрит натрия |
| ПОЛ | - | перекисное окисление липидов |
| ПФЦ | - | пентозофосфатный цикл |
| СОД | - | супероксиддисмутаза |
| СРО | - | свободно-радикальное окисление |
| ФГ | - | фенилгидразин |
| 2,3-ДФГ | - | 2,3-дифосфоглицерат |
| GSH | - | восстановленный глутатион |
| GSSG | - | окисленный глутатион |
| Hb | - | гемоглобин |
| HbO ₂ | - | оксигемоглобин |
| LD ₅₀ | - | 50% летальной дозы |
| MetHb | - | метгемоглобин |
| SH-группа | - | сульфгидрильная группа |