

На правах рукописи

Шперлинг Игорь Алексеевич

**ПАТОМОРФОЗ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ЭРИТРОЦИТА
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ГЕМАТОТРОПНЫХ КСЕНОБИОТИКОВ**

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2006

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и Томском военно-медицинском институте Министерства обороны Российской Федерации

Научные консультанты:

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

Новицкий Вячеслав Викторович

доктор медицинских наук, профессор

Рязанцева Наталья Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Степовая Елена Алексеевна

доктор медицинских наук, профессор

Лисаченко Геннадий Васильевич

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

Шкурупий Вячеслав Алексеевич

Ведущая организация:

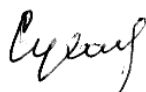
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «__» _____ 2006 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2).

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

Автореферат разослан «__» _____ 200__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Стремительное развитие «химического окружения» человека связано с опасностью непосредственного и отдаленного эффектов химических воздействий [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Онищенко Г.Г., 2002].

Патофизиологическая классификация токсических веществ группирует ксенобиотики в зависимости от ведущего патогенетического механизма отравления. В соответствии с этой классификацией в ряду опасных для человека веществ преобладают гипоксические яды. Яркими представителями этой группы являются гемические яды – метгемоглобинообразователи и монооксид углерода, нарушающие кислородтранспортную функцию гемоглобина с развитием гипоксического состояния в организме [Оксегендлер О.А., 1991].

Большая распространенность метгемоглобинообразователей и монооксида углерода в среде обитания человека определяет высокую частоту и неблагоприятные исходы отравлений данными веществами. Отравления гемическими ядами являются причиной развития полиорганных осложнений, характеризующихся длительными нарушениями со стороны нервной, сердечно-сосудистой и дыхательной систем [Лужников Е.А. и соавт., 2000; Scalfaro P. et al., 2000; Pach J. et al., 2001; Бадюгин И.С. и соавт., 2006]. По данным ряда отечественных и зарубежных авторов, летальность при отравлениях монооксидом углерода составляет в среднем 12-16% [Литвинов Н.Н. и соавт., 1997; Hawkins M. et al., 2000; Ostapenko Y.N. et al., 2001; Ridde L. et al., 2001], при отравлениях метгемоглобинообразователями – 25-33% [Сиваченко В.Н., 1995; Петров С.И. и соавт., 2005].

Реакция образования метгемоглобина протекает в эритроцитах при воздействии на гемоглобин большой группы различных веществ, включающей нитраты и нитриты, хлорновато- и хлорноватистокислые соли, феррицианиды, мышьяковистый водород, токсины инфекционного происхождения, ряд лекарственных веществ. Метгемоглобин отличается высокой прочностью связи железа геминовой группировки с кислородом [Токарев Ю.Н. и соавт., 1979; Pach J. et al., 1996; Куценко С.А., 2004]. Взаимодействие монооксида углерода с гемоглобином приводит к образованию карбоксигемоглобина, в котором молекула токсиканта находится в ковалентной связи с двухвалентным железом гемопорфирина. В таком состоянии гемоглобин утрачивает способность присоединять кислород; осуществление его газотранспортирующей функции становится невозможным [Тиунов Л.А. и соавт., 1980; Маркова И.В., 1999; Takeuchi A. et al., 2000].

Исход отравлений гемическими ядами в острой (токсигенной) стадии определяется выраженностью гипоксического синдрома, связанного с уровнем патологических дериватов гемоглобина в крови, а в отдаленные сроки (соматогенная стадия) – степенью структурно-функциональных нарушений органов и систем. В свою очередь прогноз развития патологического процесса в соматогенной стадии любой интоксикации во многом зависит от обеспеченности клеток и тканей организма кислородом [Лужников Е.А. и соавт., 2000].

Основными факторами адекватного кислородного транспорта в организме являются функциональная активность эритроцитов и связанные с ней гемореологические свойства крови [Рябов А.Г., 1988; Reinhart W.H., 1995; Тино Г. и соавт., 2001; Senturk U.K. et al., 2001; Ройтман Е.В., 2004]. Морфологическая трансформация, нарушение обратимой агрегации и деформируемости эритроцитов лежат в основе сложного процесса изменения микрореологических характеристик крови, что неизбежно влияет на качество снабжения кислородом органов и тканей. Это осложняет течение основного заболевания, снижает эффективность терапии, увеличивает вероятность развития осложнений и неблагоприятных исходов заболеваний различного генеза, в том числе – отравлений [Прозоровский В.Б. и соавт., 1996; Давыдова Е.В., 2000; Рязанцева Н.В. и соавт., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Очевидно, что в условиях выраженных нарушений кислородтранспортной функции крови роль этих изменений может быть существенно повышена в связи с изменениями характеристик капиллярного кровотока.

Однако имеющиеся в литературе сведения о качественных изменениях эритроцитов периферической крови при отравлениях гемическими ядами весьма фрагментарны; не уделяется достаточного внимания метаболическим нарушениям, происходящим в эритроцитах периферической крови при отравлениях вышеперечисленными веществами, что затрудняет объяснение механизмов развития гипоксии. Вместе с тем нарушения в эритроците в различные фазы течения любого патологического процесса требуют дифференцированных и патогенетически обоснованных методов коррекции [Рязанцева Н.В. и соавт., 2002-2004; Степовая Е.А. и соавт., 2004; Новицкий В.В. и соавт., 2001-2005].

Отсутствие четких представлений о механизмах вовлечения эритроциты в патологический процесс при экзогенной интоксикации, в частности при воздействии метгемоглобинообразователей и монооксида углерода, явилось основой для проведения комплексного исследования, направленного на вскрытие механизмов развития эритроцитарных расстройств при отравлениях вышеуказанными ксенобиотиками.

Цель работы: установить общие закономерности, особенности и механизмы нарушений структурно-метаболического и функционального статуса эритроцитов периферической крови при воздействии метгемоглобинообразователей и монооксида углерода в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Установить характер, степень выраженности и длительность нарушений периферического звена эритроциты при остром токсическом воздействии нитрита натрия (DL_{50}), солянокислого фенилгидразина (DL_{50}) и монооксида углерода (CL_{50}).
2. Выявить общие закономерности и особенности вовлечения в патологический процесс мембраны эритроцитов при остром токсическом воздействии метгемоглобинообразователей (нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина в DL_{50}) и монооксида углерода (CL_{50}).

3. Получить новые данные о молекулярных механизмах дисфункции мембраны эритроцитов при остром токсическом действии метгемоглобинообразователей и монооксида углерода.

4. Оценить характер и установить механизмы нарушения функциональных характеристик (деформируемость и агрегационная способность) и морфологического статуса эритроцитов при остром токсическом действии нитрита натрия (DL_{50}), солянокислого фенилгидразина (DL_{50}) и монооксида углерода (CL_{50}).

Научная новизна. Впервые с привлечением современных гематологических, биохимических, морфологических и биофизических методов выявлены существенные нарушения структурно-метаболических и функциональных свойств эритроцитов периферической крови у крыс в острый период и отдаленные сроки после токсического воздействия метгемоглобинообразователей в среднететальной дозе и монооксида углерода в среднететальной концентрации. Показано, что общими закономерностями вовлечения периферического звена эритрона в патологический процесс при токсическом воздействии нитрита натрия, солянокислого фенилгидразина и монооксида углерода являются однонаправленные изменения физико-химических свойств мембраны эритроцитов периферической крови (модификация липидного состава мембраны, увеличение микровязкости липидного бислоя, в том числе в области белок-липидных контактов, повышение содержания мембранно-связанного гемоглобина, угнетение активности Na^+, K^+ -АТФазы), сопровождающиеся нарушением ультраструктуры, поверхностной архитектоники, деформируемости и агрегационной способности красных клеток крови. Впервые установлено, что механизмы нарушения периферического звена эритрона при экзогенной интоксикации гематотропными ксенобиотиками у экспериментальных животных связаны с изменением структурно-метаболического статуса циркулирующих красных кровяных клеток в условиях интенсификации свободно-радикального окисления, а также поступлением в кровотоки качественно неполноценных эритроцитов из костномозгового компартмента эритрона. Показано, что острое токсическое воздействие метгемоглобинообразователей (нитрит натрия, солянокислый фенилгидразин в DL_{50}) индуцирует развитие пролонгированной гемолитической анемии, выраженность и длительность которой наиболее значима при интоксикации солянокислым фенилгидразином (до 7 сут); острое воздействие монооксида углерода приводит к кратковременному компенсированному гемолизу.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты проведенного исследования носят фундаментальный характер, расширяют существующие представления о механизмах развития нарушений периферического звена эритрона при остром токсическом воздействии метгемоглобинообразователей нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина, а также монооксида углерода. Показана важная роль нарушений структуры эритроцитарной мембраны и метаболизма циркулирующих зрелых красных клеток крови в развитии анемии в ранний период и отдаленные сроки после острого воздействия нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина. Полученные по итогам работы данные могут быть использованы для разработки новых патогенетически обоснованных способов предупреждения и коррекции нарушений в системе эритрона при токсических метгемоглобинемиях и отравлениях монооксидом углерода. По результа-

там исследования разработан и внедрен в научно-исследовательскую практику способ оценки интенсивности внутрисосудистого гемолиза с помощью расчета индекса деструкции эритроцитов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Однократное внутрибрюшинное введение крысам метгемоглобинообразователей нитрита натрия в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина в дозе 150 мг/кг (DL_{50}) вызывает развитие гемолитической анемии, механизмы развития которой сопряжены с нарушением структурно-метаболических свойств мембраны эритроцитов. Однократное ингаляционное воздействие на крыс монооксида углерода в концентрации 4000 мг/м³ в течение 75 мин (CL_{50}) приводит к формированию нарушений структурно-функционального статуса красных клеток крови при отсутствии явных признаков анемического синдрома.

2. Изменения структурно-метаболического и функционального статуса эритроцитов у экспериментальных животных при острой интоксикации нитритом натрия, солянокислым фенилгидразином в среднелетальной дозе и монооксидом углерода в среднелетальной концентрации носят неспецифический характер и включают модификацию структуры мембраны эритроцитов, нарушения ультраструктуры, поверхностной архитектуры, деформируемости и обратимой агрегации красных клеток крови.

3. Дезорганизация мембраны эритроцитов при токсическом воздействии нитрита натрия, солянокислого фенилгидразина и монооксида углерода характеризуется нарушением липидного состава, повышением вязкости липидной фазы, увеличением уровня мембранно-связанного гемоглобина, а также снижением активности Na^+, K^+ -АТФазы, наиболее выражена в острый период после воздействия токсикантов и сохраняется в отдаленные сроки (14-21-е сут).

Апробация и реализация результатов работы

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на Всероссийской конференции «Актуальные вопросы современной медицины» (Новосибирск, 2001), Всероссийской конференции «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической морфологии» (Томск, 2002), научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 2004), VI и VII Международных конгрессах молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2005, 2006), итоговых научно-практических конференциях профессорско-преподавательского состава и слушателей Томского военно-медицинского института (Томск, 2000-2005), межгородских конференциях «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2004, 2005).

Диссертационная работа выполнена в рамках отраслевой программы Минздрава России «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).

Реализация результатов работы. Результаты диссертационного исследования включены в лекционный курс по патологической физиологии (раздел «Патофизиология клетки») и гематологии (раздел «Приобретенные гемолитические анемии») для студентов лечебного, педиатрического и медико-биологического факультетов ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, а также используются в процессе обучения курсантов и слушателей факультетов подготовки врачей на кафедре военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова Министерства обороны РФ (г. Санкт-Петербург), кафедры военно-полевой терапии Самарского военно-медицинского института Министерства обороны РФ (г. Самара) и кафедры токсикологии и медицинской защиты Томского военно-медицинского института Министерства обороны РФ (г. Томск).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 35 работ, 7 из которых – в центральных рецензируемых журналах, одна монография в соавторстве.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 334 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и библиографического списка, включающего 627 источников (402 отечественных и 225 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 35 таблицами и 49 рисунками.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 784 крысах-самцах линии Вистар массой 190-250 граммов. Опыты с животными осуществлялись в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными [1996].

Для моделирования токсической метгемоглобинемии крысам первой группы вводили однократно внутривенно 0,6 % раствор нитрита натрия (НН), приготовленный на физиологическом растворе (0,145 М NaCl), второй группы – 2,0 % раствор солянокислого фенилгидразина (ФГ), также приготовленный на физиологическом растворе, в половинной летальной дозе (DL₅₀), составлявшей соответственно 90 и 150 мг/кг. Животным контрольной группы (18 особей) вводили эквивалентное количество 0,145 М раствора NaCl. DL₅₀ рассчитывали по методу В.Б. Прозоровского [1998].

Экспериментальную интоксикацию монооксидом углерода (СО) осуществляли путем динамической затравки крыс в камере с непрерывной подачей газо-воздушной смеси в концентрации СО около 4000 мг/м³ в течение 75 мин (половинная летальная концентрация, CL₅₀). СО получали в замкнутой системе, собранной из колбы Вюрца и газомера, путем смешивания муравьиной и концентрированной серной кислот в равных количествах (по 50,0 мл). Рабочую газо-воздушную смесь готовили, смешивая полученный газ с чистым атмосферным воздухом. Концентрацию СО измеряли с помощью универсального газоанализатора «УГ-2». Животных контрольной группы (18 крыс) помещали в затравочную камеру с непрерывным пропусканием чистого атмосферного воздуха (на 75 мин). CL₅₀ рассчитывали по методу В.Б. Прозоровского [1998].

Степень тяжести гипоксии, развивающейся у животных после введения метгемоглобинообразователей, определяли по критериям, предложенным Н.Ф. Иваницкой [1976] (табл. 1), а при интоксикации СО – в соответствии с критериями, разработанными нами в ходе предварительных экспериментов (табл. 2).

Взятие крови у наркотизированных эфиром подопытных животных осуществляли методом декапитации [Западнюк И.П. и соавт., 1983] через 1,5 ч; 1, 3, 5, 7, 14 и 21 сут от начала воздействия ксенобиотиков. Полученную кровь стабилизировали гепарином (50 ЕД/мл крови).

Таблица 1

Степень тяжести гипоксии у крыс линии Вистар при острой токсической метгемоглобинемии

Степени гипоксии	Клинические проявления	Уровень MetHb в крови, %
Легкая	Общее состояние удовлетворительное, цианоз слизистых и незначительное учащение дыхания	18,5±0,9
Средняя	Разлитой цианоз и выраженная одышка	35,9±0,9
Тяжелая	Резко выраженный цианоз ушей, лапок, слизистых оболочек, периодическое дыхание типа Чейн-Стокса	53,4±1,4

Таблица 2

Степень тяжести гипоксии у крыс линии Вистар в зависимости от продолжительности воздействия монооксида углерода в концентрации 4000 мг/м³

Степени гипоксии	Продолжительность воздействия СО, мин	Клинические проявления	Уровень HbCO в крови, %
Легкая	15-30	Общее состояние удовлетворительное, незначительное учащение и углубление дыхания, умеренная гиперемия глаз и слизистых. Положение тела «лежа на животе»	43-49
Средняя	31-45	Выраженная гиперемия глаз и слизистых, поверхностное дыхание с нормальной частотой, редкое ползание по дну затравочной камеры	50-52
Тяжелая	Более 45	Ярко выраженная гиперемия глаз и слизистых, поверхностное редкое дыхание, «заваливание тела набок», обездвиженность животного	53-55

Комплексное исследование периферического звена эритрона у животных контрольной и опытных групп включало: определение относительного содержания в крови метгемоглобина и карбоксигемоглобина, оценку количественных показателей красной крови, определение уровня внеэритроцитарного гемоглобина в плазме крови с расчетом индекса деструкции эритроцитов; изучение особенностей поверхностной архитектоники, ультраструктуры, деформируемости и обратимой агрегации эритроцитов; оценку липидного состава и активности Na⁺, K⁺-АТФазы; оценку содержания мембранно-связанного гемоглобина; исследование активности процессов перекисного окисления липидов и состояния ферментативной антиоксидантной системы красных клеток крови (табл. 3).

Количественная характеристика исследований по группам экспериментальных животных и методам исследования

№ п/п	Методы исследования	Группы животных			
		Воздействие НН	Воздействие ФГ	Воздействие СО	Контроль
1.	Определение количественных показателей периферического звена эритрона	70	70	70	20
2.	Определение относительного содержания метгемоглобина и карбоксигемоглобина в крови	70	70	70	20
3.	Определение индекса деструкции эритроцитов	70	70	70	20
4.	Определение уровня мембранно-связанного гемоглобина	70	70	70	20
5.	Изучение структурных свойств мембраны эритроцитов методом флуоресцентного зондирования	56	58	49	16
6.	Определение активности Na^+, K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов	56	56	56	16
7.	Определение содержания общих липидов в мембране эритроцитов	56	56	56	16
8.	Определение общего количества фосфолипидов в мембране эритроцитов	70	70	56	16
9.	Изучение липидного спектра мембраны эритроцитов	70	70	56	16
10.	Определение содержания диеновых конъюгатов в мембране эритроцитов	70	70	56	16
11.	Определение содержания малонового диальдегида в эритроцитах	70	70	56	16
12.	Определение активности каталазы в эритроцитах	70	70	56	16
13.	Исследование поверхностной архитектоники эритроцитов методом сканирующей электронной микроскопии	56	56	56	16
14.	Исследование ультраструктуры эритроцитов методом трансмиссионной электронной микроскопии	4	4	6	4
15.	Исследование деформационных свойств эритроцитов	49	49	56	16
16.	Исследование обратимой агрегации эритроцитов	49	49	56	16
17.	Определение содержания SH-групп в эритроцитах	42	42	–	6
18.	Определение содержания липопротеинов в эритроцитах	42	42	–	6
Количество животных в программе исследования (опыт / контроль)		140	170	126	436 / 36
Количество животных в эксперименте (опыт / контроль)		258	293	233	784 / 36

Концентрацию метгемоглобина (MetHb, %) в крови у экспериментальных животных определяли спектрофотометрически по методу М.С. Кушаковского [1968], концентрацию карбоксигемоглобина (HbCO, %) – по методу Н.П. Шестаковой [1999].

Определение в крови количества эритроцитов (Т/л), концентрации гемоглобина (Hb, г/л), количества ретикулоцитов (‰) и величины гематокрита (Ht, %) проводили стандартными гематологическими методами [Козинец Г.И. и соавт., 1997].

Индекс деструкции эритроцитов (ИДесЭ) рассчитывали с целью определения интенсивности внутрисосудистого гемолиза. Для этого определяли концентрацию внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ, г/л) в плазме крови гемиглобинцианидным методом [Левина Л.Д. и соавт., 1993] и гемоглобина крови. Индекс деструкции эритроцитов рассчитывали по формуле: ИДесЭ (усл. ед.) = ВЭГ × 1000 / Hb.

Поверхностную архитектуру эритроцитов оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Образцы для исследования готовили по методике Г.И. Козинца и соавт. [1982, 1984]. Готовые образцы изучали в электронном микроскопе JEM-100 CXII («JEOL», Япония) на растровой приставке ASID-4D при ускоряющем напряжении 35 кВ, силе тока 0,63 А, под углом наклона 35°, проводили их микрофотосъемку при увеличении 1500-4000. Просматривали 1000 клеток и определяли процентное соотношение эритроцитов с различным типом рельефа по классификации Г.И. Козинца и соавт. [1977] и Б.В. Ионова и соавт. [1981]. Кроме того, на каждом образце измеряли диаметр центральной впадины и внешний диаметр эритроцита у 50 произвольно выбранных клеток с последующим вычислением соотношения (усл. ед.) величины внутреннего диаметра к внешнему.

Изучение ультраструктуры эритроцитов проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии [Карупу В.Я., 1984]. Фиксированные (глутаровый альдегид, четырехокись осмия) и дегидратированные (спирт, ацетон) форменные элементы крови пропитывали эпон-аралдитовой смесью. Ультратонкие срезы толщиной 30-60 нм готовили на ультрамикротоме «Ultrotome III» («LKB», Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Полученные образцы просматривали в электронном микроскопе JEM-100 CXII («JEOL», Япония) с апертурной диафрагмой 25-30 мкм при ускоряющем напряжении 80 кВ. Проводили микрофотосъемку при увеличении 7200-100000. Морфологическими признаками повреждения эритроцитов считали отслоение плазматической мембраны от стромы, экзовезикулы, эндовезикулы, а также наличие клеток с различной электронной плотностью.

Обратимую агрегацию эритроцитов исследовали методом силлектометрии [Габриэлян Э.С. и соавт., 1985]. Для регистрации параметров агрегации использовали микроколориметр МКМФ-1 [Плотников М.Б. и соавт., 1995]. В качестве характеристики агрегационной способности эритроцитов применяли показатель полупериода ($T_{1/2}$, сек) агрегации эритроцитов. В работе исследовали суспензию эритроцитов, приведенную физиологическим раствором NaCl (0,145 М) после центрифугирования нативной крови при 1500 об/мин в течение 5 мин к значению гематокрита 40 %.

Деформационные свойства эритроцитов исследовали с помощью эктацитометра [Bessis M. et al., 1980] при скоростях сдвига 90, 180, 360 и 890 с⁻¹. В качестве вязкой среды использовали раствор высокомолекулярного полиэтиленоксида с молекулярной массой $M \approx 5,8 \times 10^6$ в концентрации 0,2 % и вязкостью 13 сПз. Для количественной оценки деформируемости красных клеток крови рассчитывали индекс деформируемости (ИДЭ, усл. ед.).

Мембраны эритроцитов выделяли по методу J.T. Dodge [1963], содержание белка определяли микробиуретовым методом. Липиды мембраны эритроцитов экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью по методу J. Folch et al. [1957].

Определение содержания общих липидов проводили методом, предложенным W. Bloor [1947] и J. Bragdon [1951], в основу которого положена сульфо-фосфованилиновая реакция. Содержание общих фосфолипидов определяли ферротитационным способом. Результаты выражали в мг/мг белка.

Разделение нейтральных липидов проводили методом тонкослойной хроматографии [Финдлей Дж. Б. и соавт., 1990] с использованием системы растворителей гептан:диэтиловый эфир:этилацетат (в соотношении 80:20:1,5) и пластины «Sorbfil» (Россия). Идентификацию фракций липидов осуществляли с использованием существующих стандартов (фирма «Sigma», США). Количественную оценку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы, которая предусматривала введение цифрового изображения фракций липидов в компьютер путем сканирования хроматографических пластинок в сканере «HP deskjet 3605», их преобразование через систему нелинейных операторов и систему автоматически настраиваемых оптимальных фильтров в спектрограмму.

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

Спектрофлуориметрическое исследование мембраны эритроцитов выполняли с использованием флуоресцентного зонда пирена. Измерение собственной флуоресценции теней эритроцитов, а также определение спектральных характеристик взаимодействия мембран с флуорофором проводили на спектрофлуориметре «Hitachi – MPF4» (Япония) при длине волны возбуждающего света 285 нм и 340 нм, щелях 2/3 нм [Владимиров Ю.А. и соавт., 1980]. Для оценки микровязкостных свойств липидной фазы и гидрофобного объема мембраны эритроцитов рассчитывали коэффициент эксимеризации пирена (I_{470}/I_{370}), равный отношению максимумов интенсивностей флуоресценции эксимерной формы зонда (I_{470}) к мономерной (I_{370}) при длинах волн возбуждающего света ($\lambda_{в}$) 285 и 340 нм. Полярность окружения молекул пирена оценивали по соотношению I_{370}/I_{390} при длине волны возбуждающего света 340 нм (все показатели выражали в усл. ед.). 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 мембран эритроцитов при возбуждении светом с длиной волны 340 нм в от-

сутствие пирена, I_{340}^* – интенсивность собственной флуоресценции мембран эритроцитов при возбуждении светом с длиной волны 340 нм при добавлении пирена [Добрецов Г.Е., 1989].

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]. Активность фермента выражали в мкмоль P_i /час·мг белка.

Определение содержания диеновых конъюгатов (ДК) в мембране эритроцитов проводили по методу А.Б. Косухина и соавт. [1987]. Результаты выражали в усл. ед. /мг белка. Для определения содержания малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах использовали метод М. Uchiyama [1978] с тиобарбитуровой кислотой. Результаты выражали в нмоль/г Нв. Определение активности каталазы в красных клетках крови проводили ферментативным способом [Королюк М.А. и соавт., 1988]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин·г Нв.

Сульфгидрильные группы (SH-группы) выявляли феррицианидным методом по M. Chevremont et al. [1943], липопротеиновый комплекс – с применением судана черного-В (Chemapol, ЧССР) в 70-процентном растворе этанола по M.C. Varenbaum [1956]. Уровень исследованных субстратов оценивали цитофотометрически (усл. ед).

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания [Славин М.Б., 1989; Леонов В.П. и соавт., 1997]. Все количественные показатели были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Результаты исследования обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением для каждой выборки среднего арифметического (\bar{X}), ошибки среднего арифметического (m). Сравнение средних величин осуществляли с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным, если вероятность их тождества оказывалась менее 5 % ($p < 0,05$). Для выявления взаимосвязей между явлениями применяли коэффициент корреляции Спирмена (r). Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с использованием стандартного пакета прикладных программ «Excel 2003» на персональной ЭВМ «Pentium IV».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ МЕТГЕМОГЛОБИНОБРАЗОВАТЕЛЕЙ

Патогенез гипоксии при токсической метгемоглобинемии связан с инактивацией эритроцитарного гемоглобина ввиду выраженного тропизма окислителей к легко окисляемому атому гемового железа. Наряду с этим немаловажную роль в снижении кислородной емкости крови при воздействии метгемоглобинообразователей может иметь ане-

мия, носящая гемолитический характер. При этом анемия при интоксикации рядом веществ, несмотря на компенсаторную активацию костномозгового кроветворения, нередко приобретает ярко выраженный характер. Считается, что гемолиз при токсическом действии окислителей является следствием истощения метаболического резерва красных клеток крови в ответ на чрезмерную окислительную нагрузку. В связи с этим, на наш взгляд, целесообразно затронуть вопрос о токсикологических особенностях ксенобиотиков, различающихся по выраженности гемолитического действия.

1.1. Краткая токсико-патогенетическая характеристика метгемоглобинообразователей

Биологическая активность нитрита натрия (химическая формула – NaNO_2) связана с образованием иона NO_2^- либо радикала NO_2^{\cdot} , окисляющих Hb в MetHb [Ажипа Я.И. и соавт., 1990; Штабский Б.М. и соавт., 1996; Khon M.C. et al., 2002]. Попадая в кровоток, НН диссоциирует на нитрит-ионы, концентрация которых быстро (в течение одного-двух часов после внутрибрюшинного введения) снижается до нормальных величин [Сиваченко В.Н., 1995]. Вещество обладает прооксидантным свойством, в связи с чем активизирует процесс липопероксидации в эритроцитах и угнетает активность ряда ферментов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ) и антиоксидантные (супероксиддисмутаза, каталаза) ферменты) [Штабский Б.М. и соавт., 1996; Мышкин В.А. и соавт., 1999; Allison R.W. et al., 2000]. У крыс редукция MetHb, образованного при введении НН в DL_{50} (около 90 мг/кг), происходит в течение одних суток [Середенко М.М. и соавт., 1987; Сиваченко В.Н., 1995]. Взаимодействие НН с цитохромами *c* и *a* снижает их активность, что приводит к нарушению процесса утилизации кислорода (O_2) тканями и вызывает развитие метаболического ацидоза [Середенко М.М. и соавт., 1987; Афанасьев В.В. и соавт., 1999]. При воздействии НН на организм отмечается снижение артериального давления, вплоть до коллапса, в связи с увеличением общего пула оксида азота, являющегося эндотелий-релаксирующим фактором [Гацура В.В. и соавт., 1977; Сиваченко В.Н., 1995; Афанасьев В.В. и соавт., 1999]. В литературе дискутируется вопрос о тератогенном и эмбриотоксическом эффектах нитритов [Опополь Н.И., 1990; Егорова В.В. и соавт., 1993]. Введение крысам НН в дозе 70 мг/кг вызывает нарушение функциональных свойств и метаболической активности нейтрофилов периферической крови, угнетает развитие гуморального иммунного ответа и гиперчувствительности замедленного типа [Бровкина И.Л. и соавт., 2004].

Фенилгидразин (химическая формула – $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNH}_2$; солянокислый фенилгидразин – $[\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_2\text{H}_4]\text{Cl}$) – органическое соединение, относящееся к группе производных гидразина. Действие ФГ на эритроциты приводит к образованию MetHb, концентрация которого в крови медленно (до 2 сут) снижается, и окислительной деструкции Hb с образованием телец Гейнца [Springer D.L. et al., 1981; Shetlar M.D. et al., 1985; Гольдберг Е.Д., 1989; Bunn H.F., 1994]. Механизм окисления Hb при воздействии ФГ окончательно не выяснен. Предполагается, что метгемоглобинемия связана с инактивацией Г-6-ФДГ, снижением уровня восстановленного глутатиона (GSH), образованием активных

форм кислорода (АФК) и угнетением активности антиоксидантных ферментов (каталаза, глутатионпероксидаза) [Идельсон Л.И. и соавт., 1975; Tylor D., 1975; Бойтлер Э., 1981; Kappus H.A., 1987; Shahal Y. et al., 1992; Ohno H. et al., 1993]. Максимальная концентрация ФГ в крови у крыс достигается практически сразу после введения; вещество быстро проникает в ткани и накапливается в органах с высокой метаболической активностью (печень, почки, головной мозг). Полное удаление ксенобиотика из этих органов происходит в среднем за 4 сут после введения [Архипова О.П., 1970; Колла В.Э. и соавт., 1976; Филов В.А. и соавт., 1982].

Производные гидразина нарушают синтез пиридоксальфосфата, подавляют активность пиридоксаль-зависимых ферментов, принимающих участие в обмене углеводов, белков, жиров, некоторых гормонов, биогенных аминов и ряда физиологически активных соединений [Chatterjee A.K. et al., 1980; Познанская А.А. и соавт., 1989; Портяная Н.И. и соавт., 1998]. Гидразин и его производные обладают нейротоксическим действием, сопровождающимся клиникой возбуждения центральной нервной системы, в связи с нарушением обмена γ -аминомасляной кислоты [Asnis D.S. et al., 1993; Головкин А.И. и соавт., 1996; Башарин В.А., 2001]. Реализация прооксидантного действия ФГ в гепатоцитах приводит к жировой дистрофии печени [Lopes-Mendoza D. et al., 1971; Майоре А.Я. и соавт., 1986]. Вещества данной группы вызывают лабильность артериального давления вплоть до коллапса [Колла В.Э. и соавт., 1976], обладают эмбриотоксическим, тератогенным и канцерогенным свойствами [Мусийчук Ю.И. и соавт., 1998].

Развитие токсической гипоксии вызывает активацию компенсаторных механизмов, направленных на повышение оксигенации тканей, в том числе рефлекторное учащение и углубление дыхательных движений, мобилизацию резервных альвеол и увеличение альвеолярной вентиляции, учащение сердечных сокращений, увеличение венозного притока и объема циркулирующей крови, централизацию кровообращения, активацию эритропоэза, усиление продукции глюкокортикоидов и катехоламинов [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

1.2. Динамика метгемоглобинемии у крыс при токсическом действии метгемоглобинообразователей

В ходе проведенных нами исследований было установлено, что в течение первых 12-15 ч после введения крысам НН в среднететальной дозе (90 мг/кг) уровень MetHb в крови у животных был повышен с максимальными значениями через 1,5 ч после начала опыта ($53,4 \pm 2,8\%$ при $1,4 \pm 0,1\%$ в контроле, $p < 0,001$). В динамике наблюдения с первых суток и вплоть до окончания эксперимента (21-е сут) уровень MetHb в крови у крыс не отличался от аналогичного показателя у интактных животных (рис. 1). В течение первых 8-10 ч эксперимента у животных проявлялись внешние признаки гипоксии, достигавшие на пике метгемоглобинемии уровня тяжелой степени. В этот период исследования часть животных погибла. Через 24 ч и вплоть до окончания эксперимента (21-е сут) внешние симптомы гипоксии не определялись.

Через 30 мин после введения крысам ФГ в дозе 150 мг/кг уровень MetHb составлял в среднем $27,3 \pm 1,9\%$ от общего содержания Hb крови ($p < 0,001$). В дальнейшем

уровень MetHb постепенно снижался, составляя через 1 сут в среднем $7,5 \pm 0,2$ % ($p < 0,001$), и с 3-х по 21-е сут эксперимента достоверно не отличался от нормы (рис. 1). На протяжении первых трех-четырех суток от момента введения ФГ у животных регистрировалась гипоксия средней степени тяжести. Несмотря на снижающийся уровень MetHb в крови, к исходу 2-х сут эксперимента состояние животных ухудшалось, вызывая гибель части животных. С 5-х сут и до окончания эксперимента (21-е сут) внешние признаки гипоксии у крыс не обнаруживались.

В целом, нитритиндуцированная метгемоглобинемия у экспериментальных животных протекала с большим, по сравнению с фенилгидразиновой моделью, уровнем MetHb, но была менее продолжительной (рис. 1).

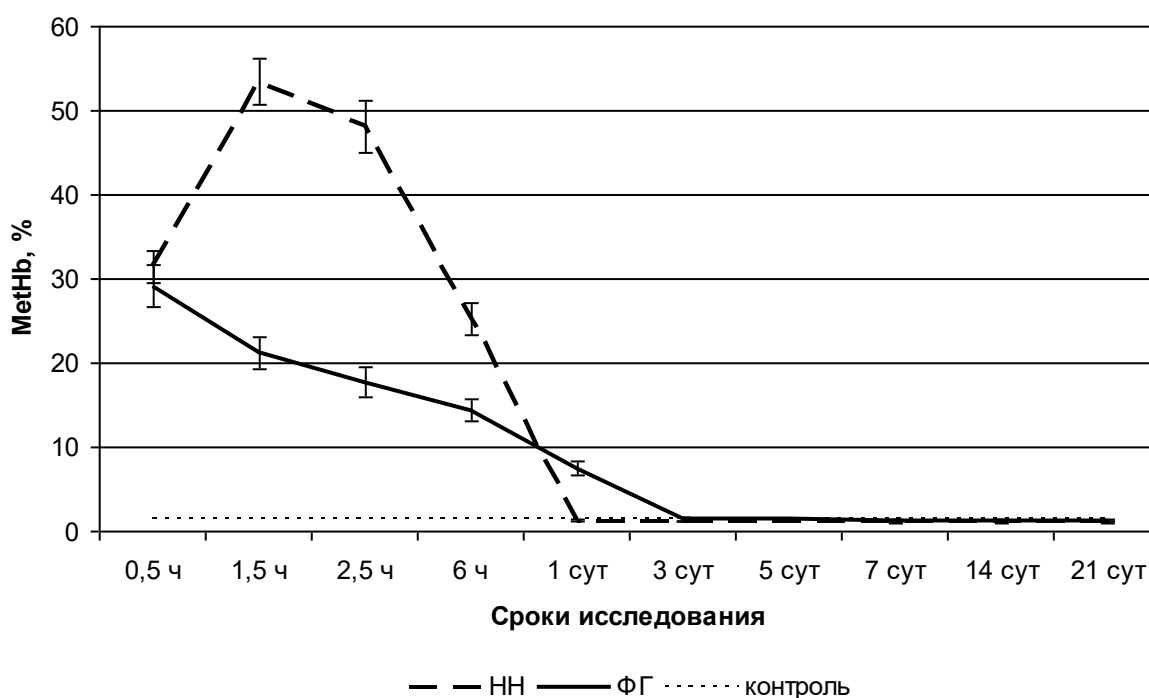


Рис. 1. Динамика уровня метгемоглобина (MetHb) в крови у крыс после однократного внутривенного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (DL_{50})

1.3. Количественные показатели красной крови у крыс при токсическом действии метгемоглобинообразователей

В ряде случаев патогномичным признаком, «визитной карточкой» токсических метгемоглобинемий является эритроцитопения. Однако вопрос о механизмах и глубине развивающейся анемии, а также механизмах ее компенсации при воздействии метгемоглобинообразователей остается открытым и активно дискутируется [McMillan D.C. et al., 1991; Магакян Ю.А. и соавт., 1993,1997; Anic V. et al., 1999; Зюзьков Г.Н. и соавт., 2004; Мясоедова Е.Е. и соавт., 2004].

В наших исследованиях также были получены фактические данные о развитии анемии у подопытных животных, выраженность и продолжительность которой зависела от вида вводимого ксенобиотика. Так, однократное введение НН вызывало у крыс анемию, наиболее выраженную в острый период метгемоглобинемии (через 1,5 ч от начала

эксперимента), когда количество эритроцитов в крови составляло $5,48 \pm 0,19$ Т/л (при $6,38 \pm 0,18$ Т/л в контроле, $p < 0,05$), концентрация Нб – $133,9 \pm 3,0$ г/л (при $161,3 \pm 2,6$ г/л в контроле, $p < 0,001$) и величина гематокрита – $37,8 \pm 0,5$ % (при $42,5 \pm 0,7$ % в контроле, $p < 0,01$). Вместе с тем признаки анемии носили кратковременный характер, так что уже на 3-и сут эксперимента отмечалось полное восстановление изученных параметров. При этом в течение первых 5 сут эксперимента в крови у крыс регистрировался ретикулоцитоз, максимально выраженный к исходу 3-х сут наблюдения, когда количество ретикулоцитов в крови повышалось в среднем до $132,8 \pm 6,7$ ‰ (при $26,3 \pm 1,1$ ‰ в контроле, $p < 0,001$).

При ФГ-индуцированной метгемоглобинемии у крыс развивалась более выраженная и продолжительная анемия (в течение первых 7 сут эксперимента), максимально проявлявшаяся к исходу 3-х сут после введения вещества. В этот период исследования в крови у экспериментальных животных количество эритроцитов составляло $2,00 \pm 0,23$ Т/л ($p < 0,001$), концентрация гемоглобина – $37,7 \pm 1,9$ г/л ($p < 0,001$), величина Нт – $14,4 \pm 0,2$ % ($p < 0,001$). Ретикулоцитоз характеризовался существенным (более чем в 19 раз) повышением количества ретикулоцитов в крови ($510,3 \pm 14,4$ ‰, $p < 0,001$) по сравнению с соответствующими значениями у крыс контрольной группы.

На фоне анемии у животных были определены очевидные признаки усиленного внутрисосудистого гемолиза (повышение уровня ВЭГ и значений ИДесЭ) в течение 5 и 7 сут после воздействия НН и ФГ соответственно, однако более выраженный после введения ФГ (рис. 2).

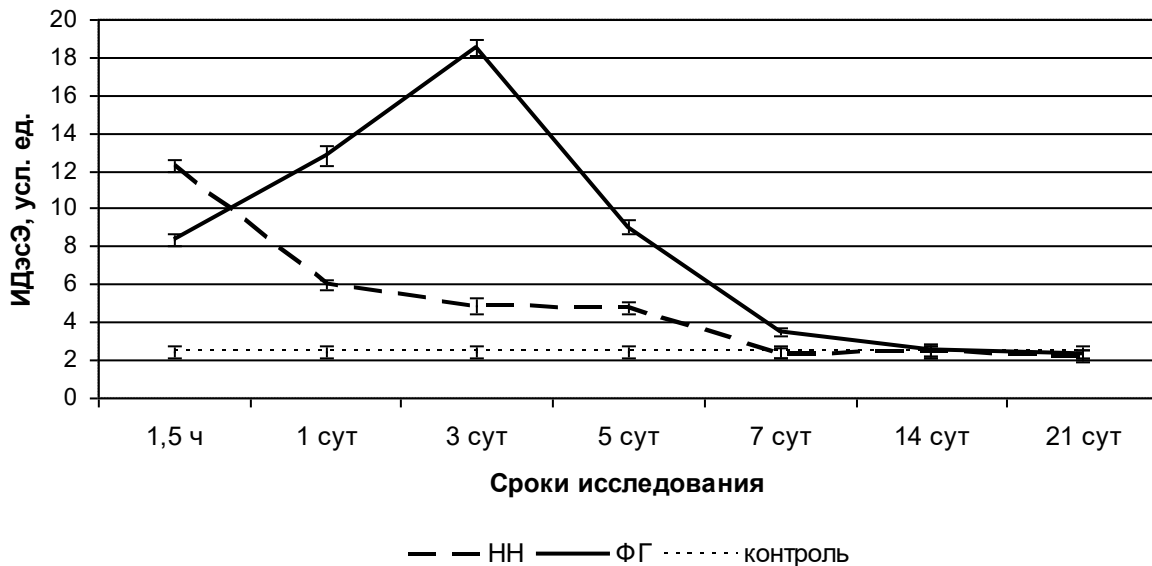


Рис. 2. Динамика индекса деструкции эритроцитов (ИДесЭ) у крыс после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (DL_{50})

Таким образом, анемия при токсическом действии метгемоглобинообразователей (наиболее выраженная и продолжительная после воздействия ФГ) носила гемолитический характер. Очевидно, что разрушение эритроцитов связано с нарушением структурно-метаболических и функциональных свойств красных клеток крови в ответ на поступление ксенобиотиков в организм.

1.4. Структурно-метаболический и функциональный статус эритроцитов при токсическом действии метгемоглобинообразователей

Структурно-функциональная целостность эритроцитов во многом определяется качественным составом, количественным содержанием и структурной организацией мембранных липидов и белков [Болдырев А.А., 1990; Фаллер Д.М. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В., 2004]. Исследование липидного состава эритроцитарной мембраны у крыс после однократного внутрибрюшинного введения метгемоглобинообразователей в среднетоксической дозе позволило выявить комплекс нарушений липидного матрикса мембраны в течение длительного времени. Так, на протяжении 7 сут после введения НН и 14 сут после введения ФГ в мембране эритроцитов у крыс было снижено абсолютное содержание общих липидов и фосфолипидов (минимальные значения показателей были зарегистрированы через 1,5 ч после введения НН, составив для общих липидов – $1,32 \pm 0,07$ мг/мг белка (при $1,89 \pm 0,05$ мг/мг белка в контроле, $p < 0,01$) и для общих фосфолипидов – $0,65 \pm 0,06$ мг/мг белка (при $0,98 \pm 0,06$ мг/мг белка в контроле, $p < 0,01$).

Максимально выраженные изменения структуры фракционного состава общих липидов эритроцитарной мембраны были зафиксированы на 3-и сут эксперимента, когда после введения НН и ФГ доля холестерина (ХС) составляла соответственно $43,83 \pm 0,86\%$ (при $38,30 \pm 0,96\%$ в контроле, $p < 0,05$) и $60,15 \pm 1,32\%$ ($p < 0,001$), эфиров ХС – $25,25 \pm 1,17\%$ (при $16,93 \pm 1,15\%$ в контроле, $p < 0,001$) и $12,52 \pm 0,68\%$ ($p < 0,05$), общих фосфолипидов – $29,91 \pm 1,03\%$ (при $44,52 \pm 1,01\%$ в контроле, $p < 0,001$) и $27,46 \pm 0,88\%$ ($p < 0,001$). Наряду с этим обращало на себя внимание увеличение относительного содержания ХС на фоне снижения доли фракции общих фосфолипидов (рис. 3).



Рис. 3. Соотношение холестерин/фосфолипиды в мембране эритроцитов у крыс после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (DL_{50})

После введения НН и ФГ в течение 7 и 14 сут, соответственно, в эритроцитарной мембране у крыс в обеих подопытных группах регистрировалось увеличение уровня лизофосфатидилхолина (ЛФХ), сфингомиелина (СМ) и фосфатидилсерина (ФС) при одновременном снижении доли фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) (табл. 4).

Считается, что в поддержании стабильности липидного бислоя биологических мембран ведущая роль принадлежит процессам свободно-радикального окисления (СРО) [Владимиров Ю.А. и соавт., 1972, 1980; Tabbara J.A., 1992; Choudhury T.D. et al., 1999]. В ходе метаболизма метгемоглобинообразователей, в том числе НН и ФГ, в эритроцитах образуются АФК [Tylor D., 1975; Карпус Н.А., 1987; Авакян А.Х., 1990; Шугалей И.В. и соавт., 1991, 1992], инициирующие перекисное окисление липидов (ПОЛ) и окислительную модификацию белков [Владимиров Ю.А., 1989, 1998; Дубинина Е.Е., 2001].

Исследования показали, что концентрация первичных и вторичных продуктов ПОЛ в эритроцитах у крыс после однократного введения НН и ФГ в среднелетальной дозе превышала исходные значения в острый период метгемоглобинемии, а также в течение первых 7 и 14 сут эксперимента, соответственно. При этом максимально выраженные признаки липопероксидации после воздействия НН регистрировались на пике метгемоглобинемии (через 1,5 ч после введения ксенобиотика): уровень ДК в мембране эритроцитов составлял в среднем $1,10 \pm 0,05$ усл. ед./мг белка (при $0,38 \pm 0,03$ усл. ед./мг белка в контроле, $p < 0,001$), МДА – $18,85 \pm 1,53$ нмоль/г Нб (при $10,24 \pm 0,91$ нмоль/г Нб в контроле, $p < 0,001$). Наибольшее увеличение концентрации продуктов ПОЛ в эритроцитах после воздействия ФГ отмечалось через 3 сут от начала введения вещества: уровень ДК составлял в среднем $1,89 \pm 0,15$ усл. ед./мг белка ($p < 0,001$), МДА – $28,45 \pm 1,15$ нмоль/г Нб ($p < 0,001$).

Активность каталазы в эритроцитах у крыс после введения НН существенно снижалась в период метгемоглобинемии (через 1,5 ч после начала эксперимента), составляя в среднем $10,34 \pm 0,57$ мкмоль H_2O_2 /мин·г Нб (при $15,37 \pm 0,50$ мкмоль H_2O_2 /мин·г Нб в контроле, $p < 0,001$). Восстановление ее активности происходило уже через 1 сут после воздействия НН, и в последующие сроки она не отличалась от нормы. ФГ-индуцированная метгемоглобинемия сопровождалась более выраженной и пролонгированной инактивацией каталазы, активность которой была стабильно сниженной в течение первых трех суток эксперимента (в пределах от 10,8 до 13,1 мкмоль H_2O_2 /мин·г Нб), а на 7-е сут наблюдения превышала показатели среднестатистической нормы ($19,43 \pm 0,85$ мкмоль H_2O_2 /мин·г Нб, $p < 0,01$). Инактивация каталазы может происходить как в результате влияния чрезмерно высокого количества АФК, образующегося в ходе окислительного стресса [Aguota O.J. et al., 1987; Дубинина Е.Е. и соавт., 1993; Зенков Н.К. и соавт., 2001], так и вследствие окисления железа, входящего в состав фермента [Мышкин В.А. и соавт., 1999]. Снижение активности фермента при нарастающих признаках липопероксидации свидетельствует об ослаблении антиоксидантной защиты эритроцитов при острой экзогенной интоксикации.

Оценка уровня SH-содержащих веществ и липопротеинов в эритроцитах у подопытных животных при токсических метгемоглобинемиях подтвердила наличие комплекса нарушений в красных клетках крови, развивающихся по механизму свободно-радикального повреждения. Так, после введения НН в общем пуле эритроцитов у крыс в течение первых суток и в период с 5-х по 7-е сут эксперимента было зафиксировано снижение средней концентрации тиол-содержащих веществ с минимальными значениями показателя через 1,5 ч после начала эксперимента ($0,263 \pm 0,005$ усл. ед. при $0,298 \pm 0,007$ усл. ед. в контроле, $p < 0,01$). В период с 1-х по 5-е сут после введения ФГ в эритроцитах у крыс также уменьшалась величина среднего уровня SH-групп с минимальными значениями на 3-и сут наблюдения ($0,192 \pm 0,005$ усл. ед., $p < 0,001$). Указанные изменения, служившие явным свидетельством ослабления тиоловой защиты красных клеток крови, формировались за счет появления в кровеносном русле эритроцитов с различной концентрацией SH-содержащих веществ, поэтому, несмотря на восстановление среднего уровня исследованного субстрата, в крови у животных сохранялось достоверно высокое количество клеток с низкой концентрацией SH-групп ($0,20$ - $0,29$ усл. ед.) вплоть до 14-х сут после воздействия НН и до 21-х сут после введения ФГ.

Наряду с изменением состояния антирадикальной защиты эритроцитов в крови у экспериментальных животных в течение 14 и 7 сут после воздействия НН и ФГ, соответственно, увеличивалось количество эритроцитов с низкой концентрацией ($0,30$ - $0,39$ усл. ед.) липопротеинов. Максимальное содержание эритроцитов данной популяции в крови у крыс регистрировалось через 1,5 ч после введения НН ($27,1 \pm 1,1$ % при $15,2 \pm 0,7$ % в контроле, $p < 0,001$) и на 3-и сут после воздействия ФГ ($48,4 \pm 2,2$ %, $p < 0,001$).

Изменения физико-химических свойств липидного бислоя клеточной мембраны сопровождаются нарушениями межмолекулярных взаимодействий, в том числе с компонентами эритроцитарной стромы [Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Один из таких примеров – фракция мембранно-связанного гемоглобина (МСГ), величина которой изменяется в различных физиологических и патологических ситуациях [Ушакова И.П. и соавт., 1982, 1985; Huang K.T. et al., 2001].

В эритроцитах у крыс в динамике метгемоглобинемий, индуцированных однократным внутрибрюшинным введением НН и ФГ в среднелетальной дозе, уровень МСГ значительно увеличивался в течение первых семи суток эксперимента. Причем максимальное его количество в обоих случаях было примерно одинаковым, хотя и различалось по срокам регистрации: на пике метгемоглобинемии после введения НН и через 1 сут – после введения ФГ (рис. 4).

Известно, что взаимодействие мембраны эритроцитов и Hb обусловлено комплексом факторов, в том числе структурным состоянием липидного компартмента мембраны, его микровязкостными свойствами, природой полярных групп липидов, а также структурно-функциональным состоянием молекулы гемоглобина. Включению Hb в мембраны способствует повышение в мембране содержания фосфолипидов, таких как ФС и СМ [Ушакова И.П. и соавт., 1980; Бондаренко С.В. и соавт., 1985]. В наших

исследованиях увеличение содержания фракций ФС и СМ в эритроцитарной мембране также сопровождалось значительным возрастанием уровня МСГ.

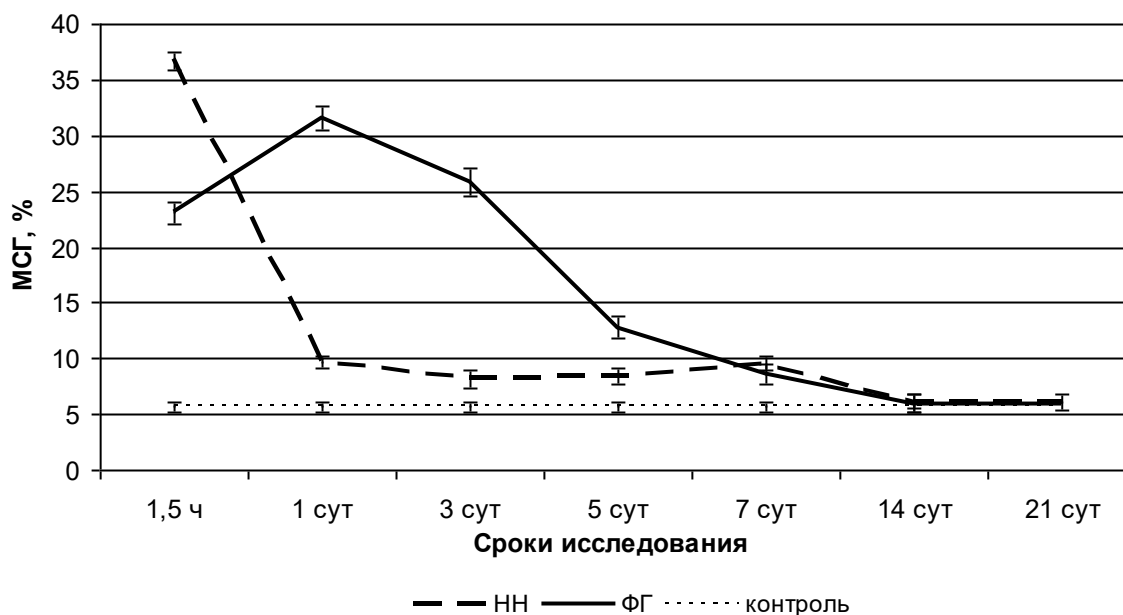


Рис. 4. Динамика содержания мембранно-связанного гемоглобина (МСГ) в крови у крыс после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (DL_{50})

В свою очередь активация ПОЛ, также выявленная в ходе наших исследований, приводит к повышению степени ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, способствуя тем самым погружению в бислой триптофановых остатков глобина [Ушакова И.П. и соавт., 1981]. Кроме того, MetHb рассматривается в качестве инициатора образования мембранно-гемоглобиновых конгломератов [Токтамысова З.С. и соавт., 1990].

Увеличение МСГ в эритроцитах отрицательно сказывается на целостности мембраны. В условиях интенсификации свободно-радикального окисления гемоглобин, ковалентно связываясь с мембранным скелетом, разрушает белковую структуру и способствует окислению фосфолипидов через Ca^{2+} -зависимую липооксигеназную активность [Kilfer C.R. et al., 2000]. Лимитирующей стадией для гемолиза может быть окисление гемином SH-группы мембранных белков. При этом Hb в денатурированном состоянии более легко реагирует с мембраной, вызывая агрегацию белка полосы 3 и разрушение эритроцита [Ямайкина И.В. и соавт., 1989; Chandra A.M. et al., 1995].

Примечательно, что при воздействии НН уровень МСГ в эритроцитах в острый период метгемоглобинемии был выше по сравнению с фенилгидразиновой моделью; в последующие сроки наблюдалась обратная закономерность. Вероятно, при нитритиндуцированном окислении связь Hb с плазмалеммой происходит по пути обратимого ионного взаимодействия, а при воздействии ФГ – более прочных ковалентных связей [Ушакова И.П. и соавт., 1981].

Таким образом, острое токсическое воздействие метгемоглобинообразователей вызывало у экспериментальных животных модификацию липидного и белкового компартментов эритроцитарной мембраны, являющуюся основой для изменения ее структуры и функции.

Подтверждением тому служили результаты флуоресцентного зондирования мембраны эритроцитов у крыс после введения НН и ФГ в DL_{50} , позволившие установить существенную деструктуризацию мембранных слоев в течение 14 и 21 сут эксперимента, соответственно. Наиболее выраженные изменения изученных параметров отмечались в острый период нитритной интоксикации (через 1,5 ч после введения НН), когда значения коэффициентов эксимеризации пирена I_{470}/I_{370} при $\lambda_B=285$ нм и при $\lambda_B=340$ нм были существенно снижены и составляли соответственно $0,237 \pm 0,015$ усл. ед. (при $0,402 \pm 0,011$ усл. ед. в контроле, $p < 0,001$) и $0,273 \pm 0,011$ усл. ед. (при $0,560 \pm 0,014$ усл. ед. в контроле, $p < 0,001$). Выявленные изменения указывали на повышение упорядоченности суммарной липидной фазы и прибелкового липидного окружения в мембране эритроцитов. В этот же период исследования величина коэффициента I_{370}/I_{390} при $\lambda_B=340$ нм превышала средние значения подобного параметра у животных контрольной группы, что свидетельствовало о повышении полярности липидного бислоя мембраны красных клеток крови ($1,224 \pm 0,016$ усл. ед. при $0,955 \pm 0,007$ в контроле, $p < 0,001$), а также уменьшалась величина миграции энергии с триптофановых остатков мембранных белков на пирен ($32,0 \pm 0,5$ % при $41,4 \pm 1,0$ % в контроле, $p < 0,001$).

Изменение микровязкостных свойств липидной фазы мембраны эритроцитов после воздействия ФГ имели однонаправленный, но более выраженный и продолжительный (до 21 сут наблюдения) характер. Максимальные нарушения структуры мембраны эритроцитов были зарегистрированы через трое суток после введения ФГ. При этом величина коэффициентов эксимеризации пирена I_{470}/I_{370} при $\lambda_B=285$ нм и при $\lambda_B=340$ нм по сравнению с исходными значениями достоверно ($p < 0,001$) снижалась до $0,274 \pm 0,012$ и $0,311 \pm 0,013$ усл. ед., соответственно, значения коэффициента I_{370}/I_{390} повышались до $1,421 \pm 0,010$ усл. ед. ($p < 0,001$), а величина переноса энергии с триптофана на пирен снижалась до уровня $28,4 \pm 0,4$ % ($p < 0,001$).

В целом, модификация структуры липидного компартмента эритроцитарной мембраны у крыс была более значимой и длительной после воздействия ФГ. В основе выявленных нарушений, очевидно, лежат интенсификация процессов свободно-радикального окисления, фосфолиполиза, протеолиза, а также изменение физико-химических свойств Нв.

В связи с нарушением физико-химических свойств эритроцитарной мембраны у подопытных крыс после воздействия метгемоглобинообразователей для нас представляла особый интерес оценка активности мембранно-ассоциированного фермента Na^+, K^+ -АТФазы, играющего важную роль в обеспечении ионного гомеостаза красных клеток крови. Исследования показали, что активность Na^+, K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов у крыс обеих подопытных групп была существенно снижена на протяжении всего эксперимента (21 сут) (рис. 5).



Рис. 5. Активность Na^+, K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов у крыс после однократного внутривенного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (DL_{50})

Известно, что функционирование Na^+, K^+ -АТФазы в значительной степени определяется липидным микроокружением [Орлов С.Н. и соавт., 1988]. Снижение мембранной текучести, обусловленное накоплением молекул ХС и потерей доли ненасыщенных жирных кислот, приводит к устранению кооперативных взаимодействий между АТФ-связывающими центрами и предотвращает «сшивание» больших субъединиц фермента, что вызывает отрицательную кооперативность по субстрату и в конечном счете снижение активности этой ионтранспортирующей АТФазы [Левшина И.П. и соавт., 1995; Rock E. et al., 1995; Sein K.K., 1998]. С другой стороны, Na^+, K^+ -АТФаза, являясь классическим SH-ферментом, чувствительным к тиоловым ядам, служит своеобразным «индикатором» оксидативного повреждения белковых молекул [Coetzee W. et al., 1994]. В связи с этим рассматривается возможность ингибирования активности Na^+, K^+ -АТФазы путем прямого воздействия на фермент свободно-радикальных соединений SH-групп Na^+, K^+ -АТФазы в условиях усиления липопероксидации [Болдырев А.А. и соавт., 1996].

Важная роль плазматической мембраны в поддержании клеточного гомеостаза обуславливает тесную взаимосвязь ее структурно-метаболических свойств и функциональной полноценности эритроцита [McGough A.M. et al., 1990; Gimsa J., 1998; Санников А.Г., 1999; Новицкий В.В. и соавт., 2004].

Оценка поверхностной архитектоники эритроцитов у крыс после острого воздействия метгемоглобинообразователей свидетельствовала о существенных и продолжительных (вплоть до 21 сут) изменениях морфологической картины красной крови. Так,

однократное введение НН в среднететальной дозе вызывало снижение содержания двояковогнутых дискоцитов на фоне повышения количества трансформированных форм эритроцитов: переходных, способных к обратимой трансформации, клеток (эллипсоидные эритроциты, эритроциты в виде плоского диска, дискоциты с одним выростом, дискоциты с гребнем, дискоциты с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды), необратимо измененных эритроцитов (куполообразные и сферические эритроциты, клетки в виде спущенного мяча), а также дегенеративных форм красных клеток крови. Изменение морфологической картины красной крови у экспериментальных животных были максимально выражены в острый период метгемоглобинемии (через 1,5 ч после введения ксенобиотика) и сохранялись вплоть до 14-х сут исследования (табл. 5; рис. 6).

Применение ФГ более существенно отразилось на характере рельефа клеточной поверхности эритроцитов, практически полностью затронув циркулирующую эритроцитарную популяцию. Уже в первые часы после введения ксенобиотика прослеживалась почти тотальная эхиноцитарная трансформация эритроцитов, а также появление значительного количества дегенеративно измененных форм клеток, максимальное количество которых было зарегистрировано на 3-и сут и также сохранялось повышенным вплоть до окончания периода наблюдения (21-е сут) (табл. 5; рис. 6).

Результаты исследования, проведенные с использованием трансмиссионной электронной микроскопии, позволили выявить факты модификации ультраструктуры эритроцитов у крыс при токсическом действии метгемоглобинообразователей. Так, в острый период ФГ-индуцированной метгемоглобинемии (через 1,5 ч после введения ксенобиотика) в красных клетках крови у крыс обнаруживались диффузное и локальное усиление электронной плотности клеточной стромы, признаки деструктуризации мембраны в виде наличия участков уплотнений, спаянных с клеточной стромой, и нарушения целостности плазмалеммы, а также чрезмерное содержание гемоглобиновых гранул. Для модели нитритной метгемоглобинемии также были характерны признаки повышения плотности мембраны и внутриклеточного содержимого, хотя и менее выраженные, а также обнаруживались неоднородность клеток по электронной плотности и признаки выраженной эндо- и экзозекуляции (рис. 6).

В последующие сроки исследования (на 7-е сут эксперимента) в эритроцитах у крыс, подвергнутых однократному воздействию НН, сохранялись признаки выраженной дезорганизации мембраны в виде разрыхления, наличия участков отслоения от клеточной стромы. В аналогичный период исследования после введения ФГ на ультратонких срезах эритроцитов выявлялись эндозекулы разнообразной формы на фоне умеренно-разреженной цитоплазмы с равномерно-распределенными гранулами гемоглобина.

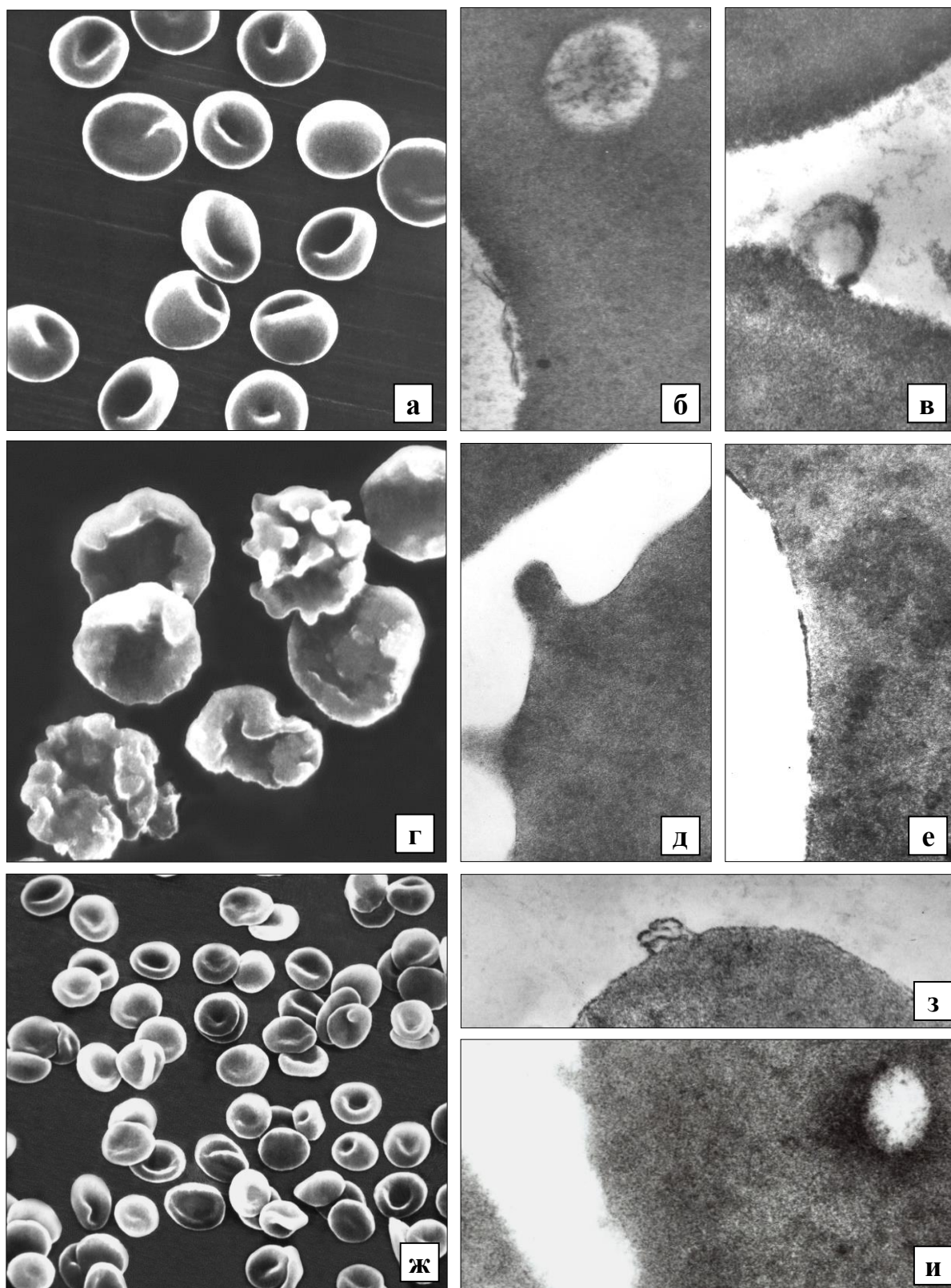


Рис. 6. Электронные микрофотографии эритроцитов периферической крови у крыс через 1,5 ч после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия (DL_{50}) (а-в), солянокислого фенолгидразина (DL_{50}) (г-е) и 1 сут после острого ингаляционного воздействия монооксида углерода (CL_{50}) (ж-и). По данным сканирующей (а, г, ж) и трансмиссионной электронной микроскопии (б, в, д, е, з, и).

а – выраженная диск-сфероцитарная трансформация эритроцитов ($\times 2500$); **б** – отслоение мембраны от цитарной стромы, эндовезикула ($\times 36000$); **в** – разупорядоченность мембранных слоев, экзовезикула ($\times 48000$); **г** – выраженная диск-эхиноцитарная трансформация эритроцитов: видны дискоциты с множественными выростами ($\times 4000$); **д** – усиленное гранулообразование гемоглобина в области выроста ($\times 29000$); **е** – видна деструктуризация мембраны в виде локальных уплотнений, чередующихся с участками разрыхления и разрывами плазмалеммы, усиленное гранулообразование гемоглобина в строме клетки ($\times 48000$); **ж** – полиморфизм эритроцитов ($\times 1500$); **з** – отслоение мембраны от стромы клетки, экзовезикула ($\times 36000$); **и** – эндовезикула ($\times 48000$)

Считается, что морфологическая альтерация эритроцитов связана с нарушениями физико-химических свойств мембраны, сопровождающимися локальными изменениями сил поверхностного натяжения, определяющегося межмолекулярными взаимодействиями во внешнем и внутреннем монослоях плазмалеммы. На ультраструктурном уровне этот феномен проявляется потерей мембранного материала во внешнюю среду в виде микро- и макроэкзовезикул. Важным моментом везикулообразования может явиться физическое разделение мембранного цитоскелета и плазмалеммы в условиях активации фосфолипаз [Сороковой В.И. и соавт., 1994]. Отделение мембранных пузырьков может приводить к удалению фосфолипидов, ХС и мембранных белков. Поэтому везикулообразование рассматривается как вариант процесса старения, ведущего к потере жизнеспособности клетки [Слободжанина В.И. и соавт., 1991]. Однако имеется альтернативная позиция: экзовезикуляция является реакцией эритроцита на стрессовое воздействие, направленное на предупреждение гибели клетки [Lida K. et al., 1991]. Наряду с этим ультраструктурная гетерогенность эритроцитарной мембраны в виде разрыхления, уплотнения и деструкции свидетельствует о модификации белково-липидных взаимодействий в мембране, обуславливающей изменение ее вязко-эластических свойств [Втюрин В.В. и соавт., 1987].

Весьма интересные результаты были получены при оценке микрореологических свойств эритроцитов. Острое воздействие НН и ФГ в среднететальной дозе вызывало длительное (на протяжении первых 5-14 сут эксперимента) нарушение деформируемости красных клеток крови (о чем свидетельствовало снижение величины индекса деформируемости эритроцитов), более существенное в ранние сроки эксперимента (3-5-е сут) при отравлении ФГ (рис. 7).

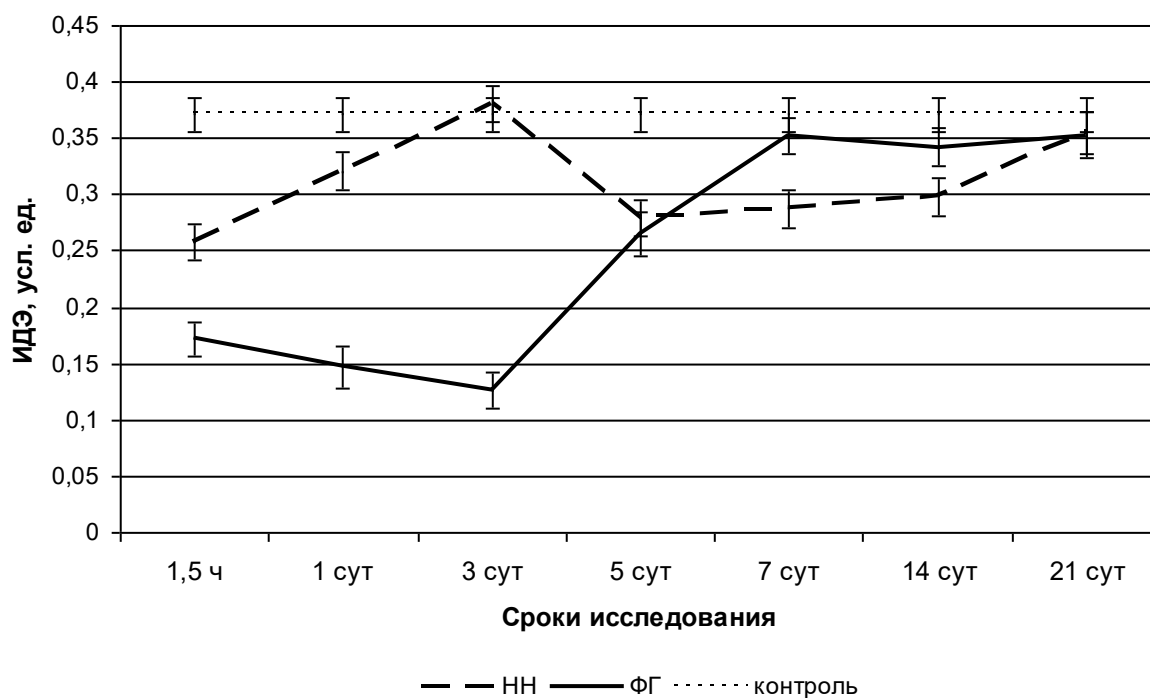


Рис. 7. Динамика индекса деформируемости эритроцитов (ИДЭ) при скорости сдвига вязкой среды 890 с^{-1} у крыс после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (DL_{50})

Вязкоупругие свойства эритроцитов тесно связаны с их агрегационной способностью [Левтов В.А. и соавт., 1982; Габриэлян Э.С. и соавт., 1985]. Это свойство эритроцитов позволяет обеспечивать компактную упаковку красных клеток крови в капиллярах для создания оптимального капиллярного гематокрита, что необходимо для транспорта кислорода в количестве, адекватном его потребности в тканях. Повышенное агрегатообразование способствует снижению текучести крови, замедлению кровотока в микроциркуляторном русле и развитию гипоксии тканей. В связи с этим обратимая агрегация эритроцитов является важнейшим показателем функциональной активности эритроцитов [Мchedlishvili P.T., 1989; Тухватулин P.T., 1996; Алиев О.И., 2004].

В ходе проведенного нами исследования были выявлены существенные нарушения агрегируемости красных клеток крови у крыс в течение 14 сут от момента введения ксенобиотиков. Примечательно, что острый период нитритной метгемоглобинемии сопровождался значительным снижением агрегируемости эритроцитов, сменяющимся стойким ее усилением в период нормализации уровня MetHb в крови. Напротив, для фенилгидразиновой экспериментальной модели было характерно стабильное снижение обратимой агрегации (до 14-х сут исследования включительно) (рис. 8).

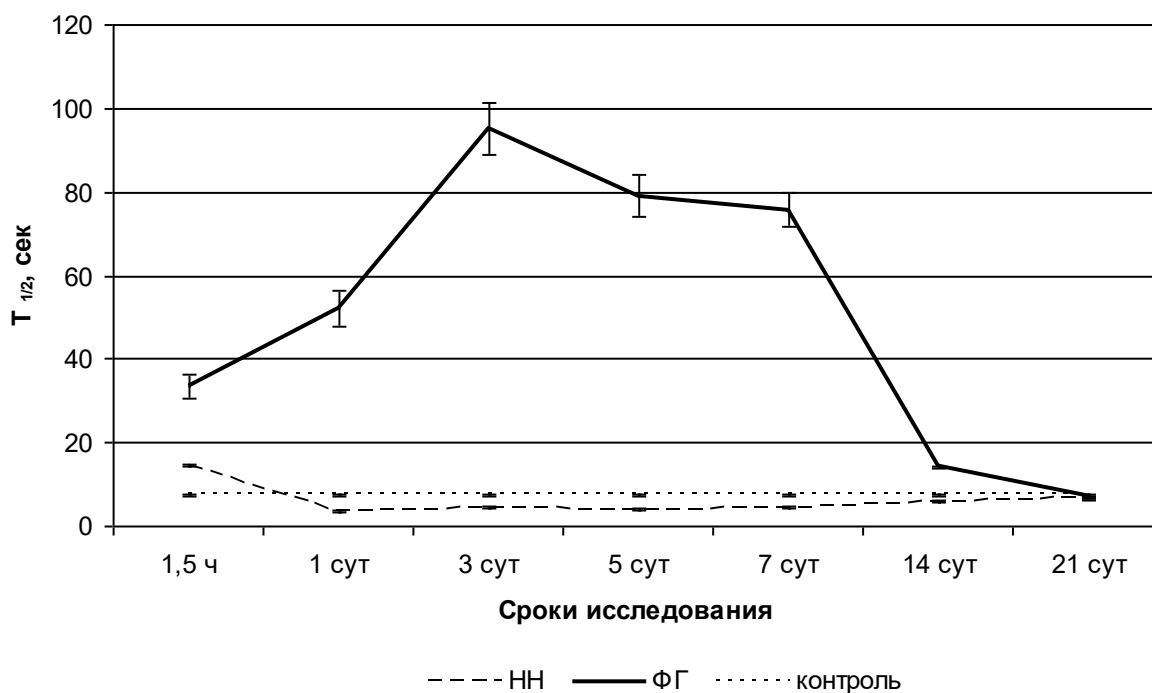


Рис.8. Динамика полупериода ($T_{1/2}$) агрегации эритроцитов у крыс после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия (НН) в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) в дозе 150 мг/кг (DL_{50})

Таким образом, однократное воздействие метгемоглобинообразователей в токсических дозах вызывает выраженные и продолжительные нарушения структуры и функции мембраны эритроцитов, влекущие за собой нарушение формы, деформируемости эритроцитов и их способности к обратимой агрегации. Эти нарушения сопряжены с

механизмами окислительного повреждения биомолекул красных клеток крови в результате чрезмерно высокого образования MetHb и развития окислительного стресса в условиях истощения метаболического и антиоксидантного потенциала эритроцитов (рис. 9). Структурно-функциональные нарушения эритроцитов формируются в период воздействия ксенобиотиков и сохраняются длительное время, что способствует нарушению микрореологических свойств крови, разрушению эритроцитов и усугублению гипоксических расстройств раннего и отдаленного периодов отравления.

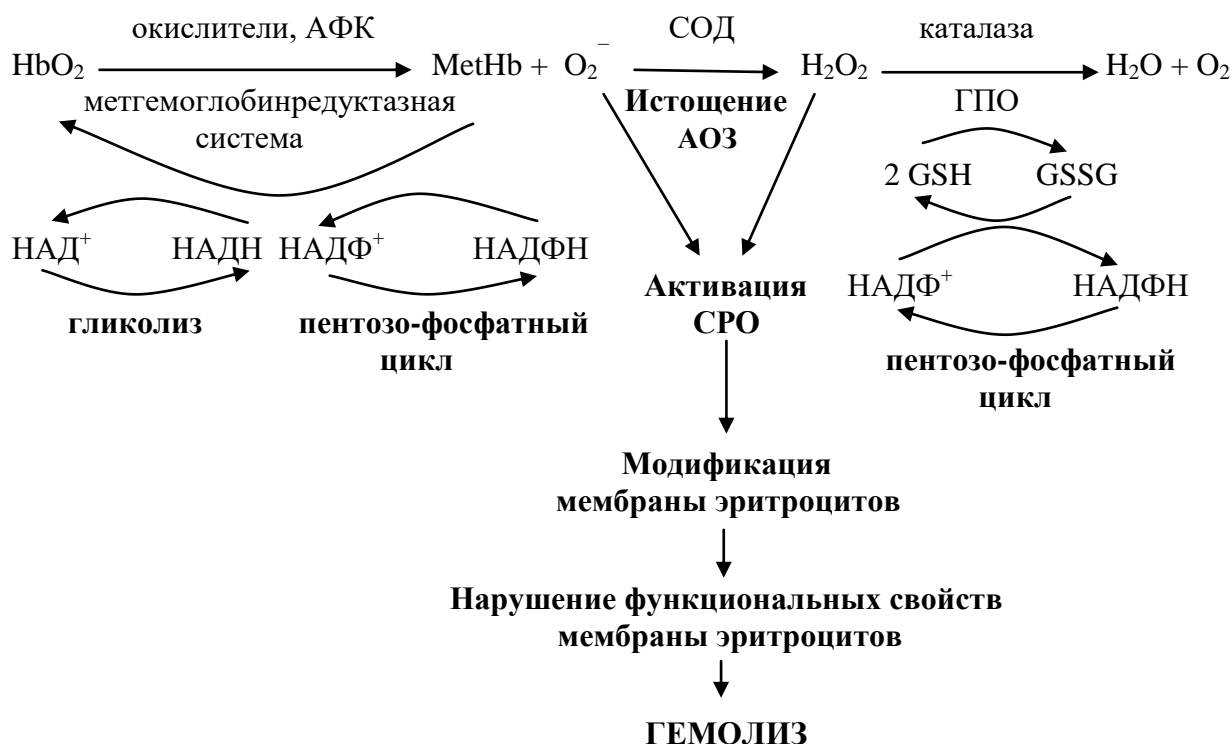


Рис. 9. Механизмы повреждения эритроцитов при воздействии метгемоглобинообразователей [по данным Е.С. Северина, 2003; Т.С. Федоровой, 2005]

(АОЗ – антиоксидантная защита; АФК – активные формы кислорода; СРО – свободно-радикальное окисление; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион)

2. МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА

2.1. Краткая токсико-патогенетическая характеристика монооксида углерода

Биологическое действие CO обусловлено высоким сродством его молекулы к Hb, которое в 250-300 раз сильнее относительно сродства Hb к O_2 . Взаимодействие CO и Hb приводит к образованию карбоксигемоглобина. При этом нарушается «гем-гем взаимодействие», в связи с чем облегчение оксигенации при взаимодействии O_2 с остальными гемами не происходит (эффект Холдена). Образование HbCO приводит к кон-

формационным изменениям молекулы Hb, увеличивающим сродство оставшегося гема к O₂ и затруднению отдачи кислорода тканям. Сдвиг кривой диссоциации остаточного HbO₂ при образовании HbCO выражен сильнее, чем при образовании MetHb [Аксельрод А.Ю., 1986; Голиков С.Н. и соавт., 1986]. HbCO не участвует в переносе O₂, поэтому при большой концентрации его в крови развивается гемическая гипоксия [Тиунов Л.А. и соавт., 1980; Оксегендлер Г.И., 1991; Тино Г. и соавт., 2001]. Эндогенный СО образуется в реакциях катаболизма Hb. Нормальное суточное содержание HbCO в крови у некурящих людей колеблется от 0,1 до 1 % [Бадюгин С.А. и соавт., 2006].

В присутствии O₂ происходит неферментативная диссоциация HbCO: $\text{HbCO} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{HbO}_2 + \text{CO}$. При тяжелых отравлениях с благоприятным исходом диссоциация HbCO в эритроцитах человека до нормального уровня происходит в среднем за 12 ч [Тиунов Л.А. и соавт., 1980; Ермаков Е.В. и соавт., 1986].

СО инактивирует гем-содержащие протеины, имеющие в своей структуре Fe²⁺ (миоглобин, цитохромы с, а₃, Р-450, b₅, пероксидаза) [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Wattel F. et al., 1996; Куценко С.А., 2004]. Блокада цитохромоксидазы приводит к прогрессированию тканевой гипоксии [Лукьянова Л.Д., 1997].

Острое отравление СО сопровождается нарушением функционирования различных систем организма. Повышается фибринолитическая активность плазмы крови и замедляется время ее свертывания [Jalukar U. et al., 1992; Penney D.G. et al., 1996]. Наиболее чувствительна к токсическому действию СО центральная нервная система: тяжелые отравления СО сопровождаются диффузным поражением и отеком головного мозга, демиелинизацией белого вещества нейронов [Cotoh M. et al., 1996; Anton M. et al., 2000; Dolinak D. et al., 2000]. Характерными изменениями сердечно-сосудистой системы при отравлениях СО являются снижение артериального давления и нарушение работы миокарда (аритмии, стенокардия, инфаркт) [Olszanski R. et al., 1994; Verran D. et al., 1996; Raub J.A. et al., 2000; Шепеленко А.Ф. и соавт., 2003]. Кроме того, для тяжелых отравлений СО характерно нарушение функции эндокринных органов, в том числе надпочечников и щитовидной железы [Макотченко В.М. и соавт., 1985; Падеров Ю.М. и соавт., 2003].

2.2. Динамика карбоксигемоглобинемии у крыс при однократном воздействии монооксида углерода в среднелетальной концентрации

Однократное ингаляционное воздействие монооксида углерода в концентрации 4000 мг/м³ в течение 75 мин (CL₅₀) вызывало у крыс развитие карбоксигемоглобинемии, регистрируемой в течение первых 10 ч исследования. При этом максимальный уровень HbCO в крови у подопытных животных отмечался к исходу затравки, составляя в среднем 53,7±2,6 % (при 0,6±0,1 % в крови у животных контрольной группы, p<0,001). В остальные сроки исследования (с 1-х по 21-е сут) содержание HbCO в крови у крыс опытной группы достоверно не отличалось от исходных значений (рис. 10).



Рис. 10. Динамика уровня карбоксигемоглобина (HbCO) в крови у крыс после острого воздействия монооксида углерода в концентрации 4000 мг/м³ в течение 75 мин (CL₅₀)

Карбоксигемоглобинемия у крыс сопровождалась проявлением внешних признаков быстро нарастающей гипоксии, которые были наиболее выражены в течение первых 2 ч эксперимента, соответствуя тяжелой степени гипоксии, и регрессировали в последующие 8-10 ч после окончания затравки.

2.3. Количественные показатели красной крови у крыс при однократном воздействии монооксида углерода

По мнению большинства авторов, отравления CO сопровождаются увеличением значений гематокрита, концентрации Hb и количества ретикулоцитов, обусловленных развитием гипоксии. Эритроцитоз при выраженной интоксикации CO может носить временный характер с последующим развитием анемии [Маркова И.В. и соавт., 1999; Mochinska O.V. et al., 2001].

В наших исследованиях карбоксигемоглобинемия у подопытных животных (через 1,5 ч после начала затравки) сопровождалась незначительным снижением в крови количества эритроцитов ($5,66 \pm 0,15$ Т/л при $6,31 \pm 0,19$ Т/л в контроле, $p < 0,05$), концентрации Hb ($146,2 \pm 2,8$ г/л при $162,3 \pm 2,9$ г/л в контроле, $p < 0,01$) и величины Ht ($39,1 \pm 0,6$ % при $42,1 \pm 0,6$ % в контроле, $p < 0,05$). Через 1 сут и вплоть до окончания периода наблюдения (21 сут) лабораторных признаков анемии у животных не обнаруживалось. Вместе с тем отмечалась компенсаторная реакция со стороны системы красной крови, проявлявшаяся активацией костномозгового кроветворения, наиболее выраженной на 3-и сут эксперимента, когда количество ретикулоцитов достигало в среднем $118,6 \pm 6,7\%$ (при $26,0 \pm 1,3$ % в контроле, $p < 0,001$).

Вероятной причиной изменения количественных параметров красной крови у экспериментальных животных могла быть компенсаторная гемодилуция, развившаяся в ответ на снижение артериального давления [Лисаченко Г.В., 1992; Джурко Б.И., 1994; Банных С.В., 1996]. Кроме того, в наших исследованиях в течение первых суток эксперимента в крови у крыс были зарегистрированы явления внутрисосудистого гемолиза (отмечалось увеличение значений ИДесЭ до $3,15 \pm 0,14$ усл. ед. при $2,46 \pm 0,15$ усл. ед. в контроле, $p < 0,05$), что в целом согласуется с мнением ряда авторов о развитии гемолиза при тяжелых отравлениях СО [Тиунов Л.А. и соавт., 1980].

Наличие признаков разрушения эритроцитов в острый период отравления, а также имеющиеся в литературе сведения о возможном развитии вторичных повреждений красных клеток крови в отдаленные сроки интоксикации [Тиунов Л.А. и соавт., 1980] обосновало проведение исследования структурно-метаболических и функциональных свойств эритроцитов периферической крови у крыс при остром токсическом воздействии СО.

2.4. Структурно-метаболический и функциональный статус эритроцитов у крыс при однократном воздействии монооксида углерода

Сведения о характере структурно-функциональной реакции эритроцитов при воздействии монооксида углерода практически отсутствуют. Вместе с тем нарушения периферического звена эритрона при токсическом действии СО могут иметь важное патогенетическое и прогностическое значение.

Проведенные нами исследования позволили выявить модификацию липидного матрикса мембраны красных клеток крови у подопытных животных, сохраняющуюся в течение 14 сут после однократного воздействия СО. При относительно стабильном содержании общих липидов в эритроцитарной мембране отчетливо прослеживался рост величины относительного содержания фракции ХС на фоне снижения уровня общих фосфолипидов. Наиболее выраженные изменения фракционного состава липидов отмечались на 7-е сут после начала затравки, когда доля ХС составляла в среднем $45,55 \pm 1,44\%$ (при $38,25 \pm 0,93\%$ в контроле, $p < 0,01$), общих фосфолипидов – $36,75 \pm 0,76\%$ (при $44,61 \pm 1,00\%$ в контроле, $p < 0,01$), а соотношение холестерин/фосфолипиды составляло $1,24 \pm 0,13$ усл. ед. (при $0,88 \pm 0,13$ усл. ед. в контроле, $p < 0,05$). Структура мембранных фосфолипидов также претерпевала изменения на протяжении первых семи суток эксперимента с максимальными отклонениями от показателей среднестатистической нормы через 1 сут после воздействия СО. В этот период исследования на фоне снижения в эритроцитарной мембране абсолютного содержания общих фосфолипидов до $0,78 \pm 0,04$ мг/мг белка (при $0,98 \pm 0,06$ мг/мг белка в контроле, $p < 0,01$) снижалась доля легкоокисляемой фракции ФЭ ($13,41 \pm 0,33\%$ при $19,80 \pm 0,91\%$ в контроле, $p < 0,001$) и ФХ ($34,17 \pm 0,43\%$ при $39,12 \pm 0,74\%$ в контроле, $p < 0,01$) при одновременном увеличении доли ЛФХ ($10,03 \pm 0,94\%$ при $4,05 \pm 0,53\%$ в контроле, $p < 0,001$) и СМ ($14,41 \pm 0,55\%$ при $11,40 \pm 0,89\%$ в контроле, $p < 0,01$).

Отсутствие прямых мембранотропных эффектов у СО позволяет предположить повреждение липидного бислоя мембраны эритроцитов по непрямому механизму, включающему активацию процессов СРО в условиях гипоксического стресса. Известно, что для отравлений СО характерно повышение интенсивности СРО в органах и тканях, сопровождающееся увеличением содержания свободно-радикальных метаболитов в плазме и эритроцитах [Маркова И.В. и соавт., 1999; Лужников Е.А. и соавт., 2000; Mochinska O.V. et al., 2001]. По результатам наших исследований, в течение 5 сут после воздействия СО в мембране эритроцитов регистрировалось увеличение уровня продуктов перекисного окисления липидов, наиболее выраженное к исходу 1-х сут эксперимента, когда содержание ДК в мембране составляло в среднем $1,27 \pm 0,15$ усл. ед./мг белка (при $0,39 \pm 0,02$ усл. ед./мг белка в контроле, $p < 0,001$), а концентрация МДА повышалась до $15,76 \pm 1,21$ нмоль/г Нв (при $10,24 \pm 0,91$ нмоль/г Нв в контроле, $p < 0,001$). На фоне интенсификации ПОЛ через 1 сут после воздействия СО в эритроцитах отмечалось повышение активности каталазы, что в целом согласуется с устоявшимся мнением об отсутствии у ксенобиотика свойства подавлять активность фермента [Тиунов Л.А. и соавт., 1980].

Модификация липидного компартмента мембраны эритроцитов у подопытных крыс сопровождалась повышением содержания МСГ в красных клетках крови через 1,5 ч после начала воздействия СО, доля которого в общем пуле эритроцитарного Нв составляла в среднем около 17 % (при 5 % у интактных крыс, $p < 0,001$). Изменения уровня МСГ носили нестойкий характер и в последующие сроки исследования (1-21-е сут) изученный показатель не отличался от исходных значений, что позволило предположить факт обратимости взаимодействия гемоглобина с мембраной клетки.

Модификация мембраны эритроцитов у подопытных животных в результате интоксикации СО существенно сказалась на ее физико-химических свойствах. В частности, результаты исследования параметров флуоресценции зонда пирена указывали на наличие разупорядоченности липидной фазы мембраны красных клеток крови как в зоне белок-липидных контактов, так и в липидном бислое на протяжении 14 сут после воздействия ксенобиотика. Наиболее значимые изменения микровязкости мембраны эритроцитов регистрировались в течение 1-х сут наблюдения. При этом значения коэффициента I_{470}/I_{370} при $\lambda_{\text{в}}=285$ нм и $\lambda_{\text{в}}=340$ нм были сниженными и составляли в среднем $0,282 \pm 0,011$ усл. ед. (при $0,409 \pm 0,013$ усл. ед. в контроле, $p < 0,001$) и $0,324 \pm 0,015$ усл. ед. (при $0,556 \pm 0,012$ усл. ед. в контроле, $p < 0,001$), соответственно. В этот же период исследования величина I_{370}/I_{390} при $\lambda_{\text{в}}=340$ нм, характеризующая полярность окружения зонда в липидном бислое мембраны, существенно повышалась ($1,211 \pm 0,027$ усл. ед. при $0,961 \pm 0,019$ усл. ед. в контроле, $p < 0,001$). Наряду с этим в мембране эритроцитов у крыс подопытной группы в течение всего периода эксперимента (21 сут) имело место снижение процента индуктивно-резонансного переноса энергии с триптофана на пирен (минимальные значения регистрировались через 1 сут после затравки СО – $34,2 \pm 0,4$ % при $41,7 \pm 0,7$ % в контроле, $p < 0,001$), свидетельствующее о нарушении белок-липидных взаимодействий в мембране.

Выявленная модификация липидного компартмента эритроцитарной мемbrane после воздействия CO сопровождалась существенным снижением активности Na^+, K^+ -АТФазы (рис. 11).

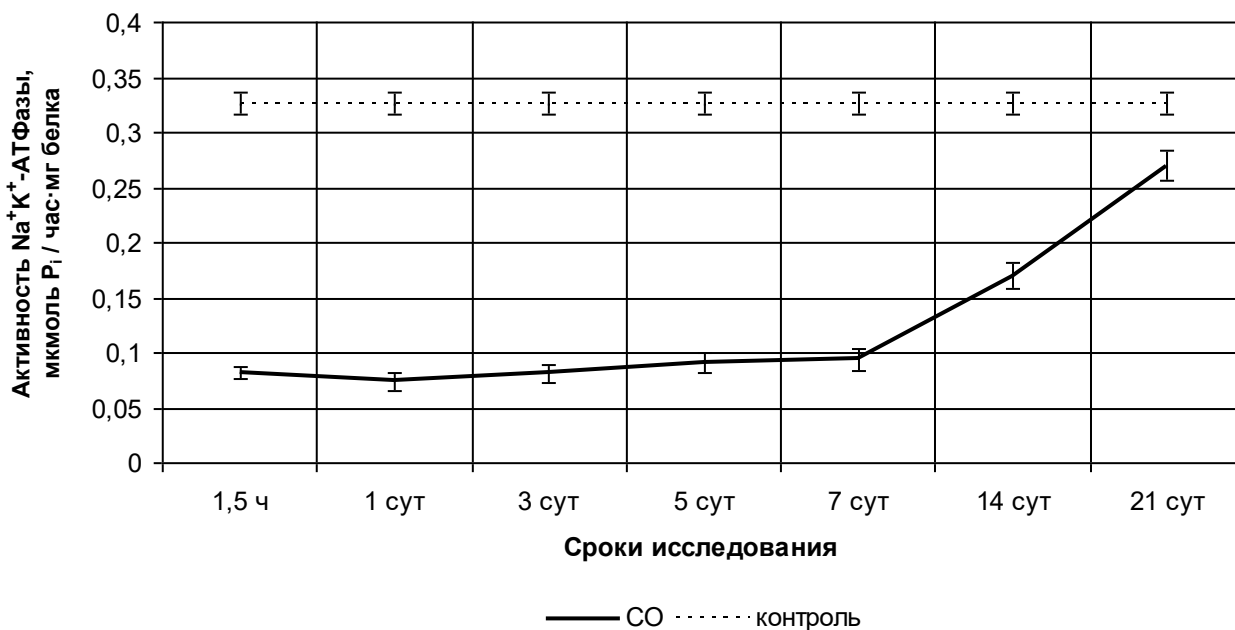


Рис. 11. Активность Na^+, K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов у крыс после острого воздействия монооксида углерода в концентрации 4000 мг/м^3 в течение 75 мин (CL_{50})

Столь существенное угнетение активности фермента, вероятнее всего, происходило в результате повреждения молекул микроокружения энзима, модификации состава и изменения микровязкости мембранного бислоя, а также действия свободно-радикальных соединений на фермент [Болдырев А.А. и соавт., 1996; Санников А.Г., 1999].

В целом, характер структурно-метаболических нарушений мембраны эритроцитов у подопытных животных подтвердил предположение о вовлечении эритроцитов в патологический процесс при отравлении CO, что, очевидно, должно было отразиться на функциональных свойствах красных клеток крови.

В ходе проведения сканирующей электронной микроскопии были установлены существенные изменения поверхностного рельефа эритроцитов периферической крови у крыс вплоть до 21-х сут после острого ингаляционного воздействия CO в среднелетальной концентрации (табл. 6).

В период карбоксигемоглобинемии (через 1,5 ч после начала затравки) в крови у экспериментальных животных существенно снижалось количество функционально полноценных двояковогнутых дискоцитов при одновременном увеличении доли видоизмененных клеток, находившихся на различных стадиях дегенерации: переходных, способных к обратимой трансформации форм эритроцитов (эллипсоидные эритроциты, клетки в виде плоского диска, дискоциты с гребнем и выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды), предгемолитических необратимо трансформированных клеток (сферические и куполообразные эритроциты, эритроциты в виде спущенного мяча) и деге-

неративных форм эритроцитов. При этом обращала на себя внимание отрицательная динамика морфологической картины к исходу 1-х сут эксперимента (табл. 6; рис. 6).

Таблица 6

Морфологический состав эритроцитов (%) у крыс после однократного воздействия монооксида углерода (4000 мг/м³ – 75 мин), $\bar{X} \pm m$

Группы животных		Морфологические формы эритроцитов, %			
		Двойковогнутые дискоциты	Переходные	Предгемолитические	Дегенеративные
Контрольная		86,58±0,41	10,74±0,25	1,79±0,05	0,57±0,03
Опытная		79,88±0,29	15,28±0,21	3,12±0,07	1,20±0,16
Сроки исследования	1,5 ч	+++	+++	+++	+++
	1 сут	75,58±0,53 +++	18,20±0,19 +++	4,26±0,09 +++	2,00±0,18 +++
	3 сут	79,44±0,49 +++	14,82±0,22 +++	3,71±0,08 +++	1,80±0,19 +++
	5 сут	80,21±0,33 +++	14,64±0,18 +++	3,53±0,09 +++	1,64±0,23 +++
	7 сут	81,84±0,34 +++	13,48±0,17 ++	3,07±0,07 +++	1,58±0,17 +++
	14 сут	82,88±0,37 ++	12,31±0,19 +	2,64±0,08 ++	1,44±0,25 +++
	21 сут	83,70±0,31 ++	12,29±0,20 +	2,24±0,07 ++	1,30±0,12 +++

Примечание: +/+/+++ – уровень статистической значимости различий по сравнению со значениями в контрольной группе – p<0,05/ p<0,01/ p<0,001 (U-критерий Манна-Уитни)

Изменения поверхностного рельефа эритроцитов у крыс в острый период интоксикации СО (через 1,5 ч от начала эксперимента) сопровождались локальными и обширными дефектами цитолеммы по типу разрыхления, истончения, уплотнения и утолщения, а также разрывов, фрагментации и отслоения от стромы. Разрушение мембраны происходило по пути образования микро- и макроэкзовезикул, часть которых утрачивала связь с клеткой. Через 1 сут от начала эксперимента была зарегистрирована очевидная тенденция к усилению эндо- и экзовезикулообразования с нарастанием признаков деструктуризации мембранных слоев и отслоением отдельных участков мембраны от клеточной стромы (рис. 6). В отдаленные сроки наблюдения (на 7-е сут эксперимента) на электроннограммах ультратонких срезов эритроцитов определялась положительная динамика в виде восстановления структурности мембраны, уменьшения количества клеток с признаками экзо- и эндозекуляции.

Морфологическая трансформация эритроцитов ухудшает условия микроциркуляции вследствие утраты способности красных кровяных клеток к деформации [Меку N., 1994; Колосова М.В., 1999; Ройтман Е.В., 2001]. Однако, вопреки нашим предположениям исследование деформационных свойств эритроцитов методом лазерной ди-

фрактометрии у крыс после однократного ингаляционного воздействия CO в CL₅₀ не выявило существенного нарушения деформируемости клеток. При этом в течение всего периода наблюдения значения ИДЭ при большой скорости сдвига (890 с⁻¹) практически не отличались от таковых у крыс контрольной группы (исключение составили 1-е сут после воздействия CO, когда значения ИДЭ были снижены на 16,2 % (0,311±0,012 усл. ед. при 0,377±0,019 усл. ед. в контроле, p<0,05). Вполне вероятно, что отсутствие гемоглобин-деструктивных свойств у CO позволяет эритроцитам сохранять деформируемость за счет относительной стабильности физико-химических свойств внутриклеточного содержимого.

Несмотря на отсутствие нарушений деформационных свойств эритроцитов у крыс, подвергшихся однократному воздействию CO в CL₅₀, существенно изменялись агрегационные свойства красных клеток крови, на что указывало значительное уменьшение значений T_{1/2} агрегации эритроцитов как в острый период отравления (через 1,5 ч после начала воздействия CO), так и в последующие сроки наблюдения (1-14-е сут) (рис. 12).

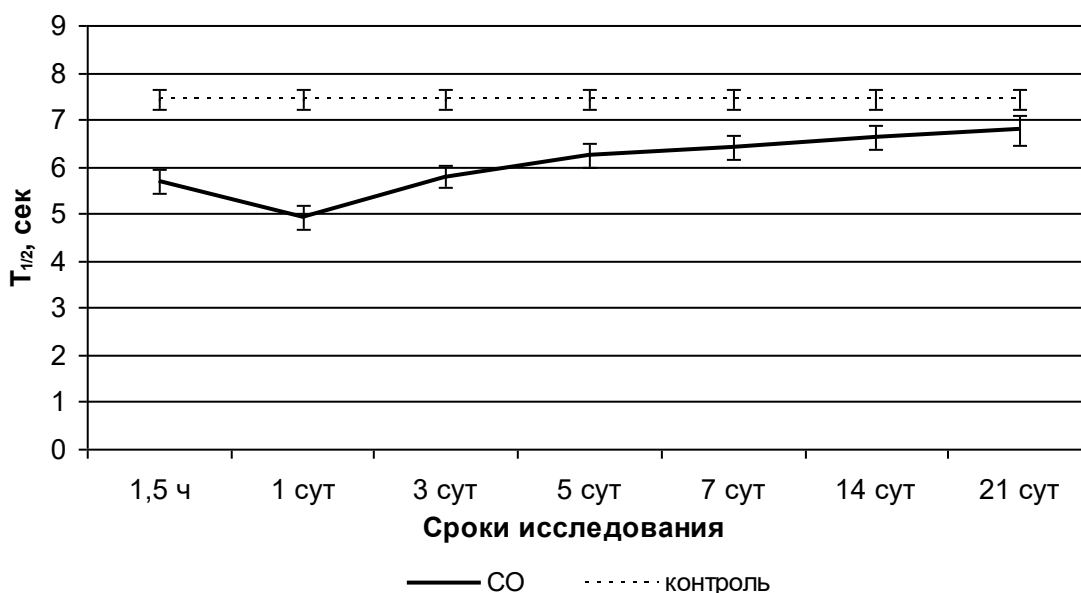


Рис. 12. Динамика полупериода (T_{1/2}) агрегации эритроцитов у крыс после однократного ингаляционного воздействия монооксида углерода в концентрации 4000 мг/м³ в течение 75 мин (CL₅₀)

Таким образом, острое отравление монооксидом углерода, протекающее с развитием гипоксического синдрома, сопровождалось у экспериментальных животных существенной и продолжительной дезорганизацией мембраны эритроцитов, что приводило к изменению ее физико-химических свойств и ускоренному старению красных клеток крови. Нарушения структурно-функциональных свойств эритроцитов в постгипоксический период позволяют предположить, что повреждение эритроцитов связано с неспецифическими механизмами, развивающихся в условиях острого дефицита кислорода тканей организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный фактический материал является убедительным доказательством развития нарушений структурных и функциональных свойств мембраны красных клеток крови при токсических воздействиях метгемоглобинообразователей и монооксида углерода. У экспериментальных животных регистрировались однонаправленные изменения липидного спектра мембраны эритроцитов, увеличение микровязкости липидного бислоя, нарушение межмолекулярных липид-липидных и липид-белковых взаимодействий, функционирования Na^+, K^+ -АТФазы. Выявленные нарушения структурно-функционального статуса мембраны эритроцитов периферической крови, достигая своего максимального проявления в острый период отравления, носили стойкий характер, сохраняясь в течение трех недель после воздействия ксенобиотиков. Важно отметить, что выраженность изменений функциональных характеристик мембраны эритроцитов определялась химической природой токсиканта и была наиболее значима при воздействии солянокислого фенилгидразина.

Воздействие гематотропных ксенобиотиков приводило к развитию анемии, имеющей достаточно сложный генез. Очевидно, что характер количественных изменений красной крови зависел от особенностей взаимодействия токсиканта с гемоглобином, механизма восстановления функциональной активности гемоглобина, прооксидантных свойств ксенобиотиков, а также продолжительности и выраженности гипоксии.

Результаты проведенного исследования позволяют с уверенностью говорить о большой значимости структурно-функциональной перестройки эритроцитов в формировании гемореологических нарушений при отравлении гематотропными ксенобиотиками. Эти нарушения сопряжены с изменением физико-химических характеристик эритроцитарной мембраны, лежащих в основе нарушения ее вязко-эластических свойств и функционирования мембранно-ассоциированных биохимических систем, что весьма существенно отражается на морфологической картине красной крови, деформируемости и агрегационной способности эритроцитов. Это подтверждено результатами проведенного нами корреляционного анализа, позволившего выявить у крыс после острого токсического воздействия нитрита натрия статистически значимые положительные корреляционные связи между уровнем метгемоглобина в крови и концентрацией диеновых конъюгатов в мембране эритроцитов ($r=0,64$; $p<0,01$), величиной индекса деструкции эритроцитов ($r=0,59$; $p<0,01$), уровнем мембранно-связанного гемоглобина ($r=0,71$; $p<0,01$), продолжительностью полупериода обратимой агрегации эритроцитов ($r=0,38$; $p<0,05$); концентрацией малонового диальдегида в эритроцитах и содержанием дегенеративно-измененных ($r=0,44$; $p<0,05$) и предгемолитических форм красных клеток крови ($r=0,47$; $p<0,05$); активностью Na^+, K^+ -АТФазы и величиной коэффициентов эксимеризации пирена I_{470}/I_{370} при $\lambda_{\text{в}}=285$ нм ($r=0,66$; $p<0,01$), I_{470}/I_{370} при $\lambda_{\text{в}}=340$ нм ($r=0,60$; $p<0,01$). Наряду с этим определялись отрицательные корреляционные связи, такие как уровень метгемоглобина в крови – концентрация эритроцитов в крови ($r=-0,42$; $p<0,05$), активность каталазы ($r=-0,47$; $p<0,05$), значения индекса деформируемости эритроцитов при скорости сдвига 890 с^{-1} ($r=-0,52$; $p<0,05$), количество двояковогнутых дискоцитов ($r=-0,50$; $p<0,05$); концентрация лизофосфатидилсерина в мембране эритроцитов – активность Na^+, K^+ -АТФазы ($r=-0,67$; $p<0,01$). Для фенилгид-

разининдуцированной метгемоглобинемии были выявлены аналогичные, но более тесные взаимосвязи между функциональными и структурными параметрами эритроцитов.

При выявлении взаимно-обусловленных изменений свойств эритроцитов у крыс после острого воздействия монооксида углерода была установлена положительная корреляция в ряду следующих признаков: концентрация карбоксигемоглобина в крови – уровень мембранно-связанного гемоглобина ($r=0,37$; $p<0,05$); концентрация лизофосфатидилхолина в мембране красных клеток крови – количество клеток в виде тутовой ягоды ($r=0,63$; $p<0,01$); содержание диеновых конъюгатов в мембране эритроцитов – активность каталазы ($r=0,54$; $p<0,05$). Также были установлены статистически достоверные отрицательные корреляционные связи между количеством двояковогнутых дискоцитов и длительностью полупериода агрегации эритроцитов ($r=-0,44$; $p<0,05$); активностью Na^+, K^+ -АТФазы и содержанием лизофосфатидилхолина в мембране эритроцитов ($r=-0,47$; $p<0,05$).

Существенно, что нарушения микрореологических свойств эритроцитов при остром воздействии гематотропных ксенобиотиков имеют пролонгированный характер и, очевидно, способствуют усугублению гипоксии не только в острый период отравления, но и в отдаленные сроки независимо от выраженности гемолитического процесса.

Столь значимые и пролонгированные во времени изменения эритроцитарного гомеостаза в результате токсического воздействия метгемоглобинообразователей и монооксида углерода обусловлены чрезвычайно сложным многофакторным поражением эритрона в условиях запуска каскада патологических реакций (рис. 14). При этом важно помнить, что разные токсиканты обладают специфической химической активностью. Анализ данных литературы позволил выявить неравнозначность эффектов НН, ФГ и СО в отношении биохимических процессов, протекающих в красных клетках крови (табл. 7).

Таблица 7

Сравнительная характеристика молекулярных механизмов повреждающего действия на эритроцит нитрита натрия, фенилгидразина и монооксида углерода [по данным Л.А. Тунова и соавт., 1980; А.Ю. Аксельрод и соавт., 1986; Б.М. Штабского, 1996; В.А. Башарина, 2001; R.W. Allison et al., 2000]

Механизм действия	Нитрит натрия	Фенилгидразин	Монооксид углерода
Окисление Нб ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)	+	+	–
Скорость восстановления Нб	Высокая	Низкая	Средняя
Участие субстрат-зависимых ферментных систем в восстановлении функциональной активности Нб	+	+	–
Угнетение активности Г-6-ФДГ	+	++	–
Активация Г-6-ФДГ	–	–	+
Прямые прооксидантные свойства	+	++	–
Снижение активности АОЗ	++	++	±
Увеличение содержания GSSG	++	++	–
Увеличение содержания GSH	–	–	+
Окислительная деструкция Нб (тельца Гейнца)	–	++	–

Примечание: «±» – слабо выраженная; «+» – умеренно выраженная; «++» – выраженная степень проявления признака; Нб – гемоглобин; Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; АОЗ – антиоксидантная защита; GSSG – окисленный глутатион; GSH – восстановленный глутатион





Говоря о гемолитическом действии гематотропных ксенобиотиков, закономерно встает вопрос о механизмах компенсации гемолиза. Проведенные нами исследования подтвердили факт компенсаторной реакции костномозгового кроветворения в ответ на воздействие гипоксических токсикантов. Выраженность ретикулоцитоза напрямую зависела от выраженности анемических признаков. Вместе с тем в условиях гипоксии и специфического действия ксенобиотиков возможно повреждение эритроцитов еще на начальной стадии их формирования в костном мозге, что в сочетании с продолжительной и чрезмерной стимуляцией эритропоэза способствует выходу в кровоток функционально неполноценных эритроцитов [Зюзьков Г.Н. и соавт., 2004]. Это было отчасти подтверждено нашими исследованиями, выявившими длительно сохранявшиеся (до 21 сут) структурно-функциональные нарушения эритроцитов после однократного воздействия метгемоглобинообразователей и СО. Существенную роль в этом играет нарушение условий функционирования костномозгового компартмента эритрона, связанное как со специфическим влиянием ксенобиотиков, так и с неспецифическими эффектами гипоксии. В связи с этим развитие нарушений в эритроцитоне при воздействии гематотропных ксенобиотиков, инициирующих гипоксию, следует рассматривать в общей системе повреждения организма при химической травме.

ВЫВОДЫ

1. Однократное внутрибрюшинное введение крысам линии Вистар нитрита натрия в дозе 90 мг/кг (DL_{50}) и солянокислого фенилгидразина в дозе 150 мг/кг (DL_{50}) вызывает развитие стойкой гемолитической анемии, сохраняющейся в течение одних и семи суток соответственно; однократное ингаляционное воздействие монооксида углерода в концентрации 4000 мг/м³ в течение 75 мин (CL_{50}) индуцирует кратковременный гемолиз (в течение первых суток), не приводящий к развитию анемии.
2. Степень повреждения эритроцитов у крыс при действии нитрита натрия, солянокислого фенилгидразина в среднелетальной дозе и монооксида углерода в среднелетальной концентрации определяется характером изменения биохимических свойств гемоглобина: окисление гемоглобина в мет-форму сопровождается более выраженными нарушениями периферического звена эритрона, чем образование карбоксиформы гемоглобина.
3. Нарушения функциональных свойств эритроцитов у крыс при действии гематотропных ксенобиотиков нитрита натрия (DL_{50}), солянокислого фенилгидразина (DL_{50}) и монооксида углерода (CL_{50}) носят неспецифический характер и связаны с изменением структуры и метаболизма мембраны эритроцитов.
4. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов у крыс при однократном действии нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина в среднелетальной дозе и монооксида углерода в среднелетальной концентрации характеризуются снижением

абсолютного и относительного содержания общих фосфолипидов, накоплением холестерина и его эфиров, дезорганизацией липидного спектра (увеличение доли лизофосфатидилхолина, сфингомиелина и фосфатидилсерина при одновременном снижении уровня фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина), увеличением доли мембранно-связанной фракции гемоглобина, возрастанием микровязкости липидной фазы, угнетением активности Na^+, K^+ -АТФазы.

5. Механизмы модификации мембраны эритроцитов у крыс при однократном воздействии нитрита натрия (DL_{50}), солянокислого фенилгидразина (DL_{50}) и монооксида углерода (CL_{50}) связаны с активацией процессов свободно-радикального окисления.
6. Признаки структурной модификации эритроцитарной мембраны у крыс при однократном воздействии нитрита натрия, солянокислого фенилгидразина и монооксида углерода в среднелетальной дозе и концентрации, максимально выраженные в остром периоде интоксикации, сохраняются в течение 14-21 сут после введения ксенобиотиков в период нормализации уровня дериватов гемоглобина в крови и восстановления количественных параметров периферического звена эритрона.
7. Изменения структурных свойств липидного бислоя, нарушения белок-липидных взаимодействий и снижение активности ионтранспортирующего энзима Na^+, K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов у крыс после однократного воздействия нитрита натрия, солянокислого фенилгидразина и монооксида углерода в среднелетальной дозе и концентрации приводят к изменению поверхностной архитектоники и ультраструктуры эритроцитов. Морфологическая картина красной крови после острого воздействия экзогенных токсикантов характеризуется нарастанием числа трансформированных форм эритроцитов (дискоциты с гребнем, выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды, куполообразные и сферические эритроциты, клетки в виде спущенного мяча, дегенеративные формы клеток), что сопровождается уплотнением, истончением и отслоением мембраны от клеточной стромы, экзо- и эндovesикуляцией эритроцитов.
8. Однократное токсическое воздействие нитрита натрия, солянокислого фенилгидразина и монооксида углерода в DL_{50} и CL_{50} вызывает у крыс стойкое изменение микрореологических свойств эритроцитов: деформируемость эритроцитов снижается при действии всех указанных ксенобиотиков; метгемоглобинемия сопровождается снижением обратимой агрегации эритроцитов, экзогенная интоксикация монооксидом углерода – ее повышением.
9. Выраженность нарушений структурно-функциональных свойств эритроцитов при однократном воздействии нитрита натрия, солянокислого фенилгидразина и монооксида углерода в среднелетальной дозе и концентрации обусловлена химическими свойствами гематотропных ксенобиотиков: наиболее значимы при интоксикации солянокислым фенилгидразином, наименее – при отравлении монооксидом углерода.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Зеневич М.В. и др. Деформируемость и морфологические изменения эритроцитов при экспериментальной острой метгемоглобинемии у крыс // Тезисы докладов 11-й научно-практической конференции врачей «Актуальные вопросы современной медицины», г. Новосибирск, 17-19 апреля 2001 г. – Новосибирск, 2001. – С. 429-430.
2. Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Зеневич М.В. и др. Динамика гемолитического процесса при острой экспериментальной метгемоглобинемии у крыс // Там же. – С. 430-432.
3. Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Зеневич М.В. и др. Изменение функциональных свойств эритроцитов при острой экспериментальной метгемоглобинемии // Сборник докладов юбилейной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Б.М. Шершевского, г. Томск, 10 октября 2001 г. – Томск, 2001. – С. 181-183.
4. Жаткин О.А., Шперлинг И.А. Агрегационные свойства эритроцитов при экспериментальных метгемоглобинемиях // Сборник научных трудов «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии», г. Томск, 17 мая 2002 г. – Томск, 2002. – Вып. 2. – С. 270.
5. Шперлинг И.А., Жаткин О.А. Морфология эритроцитов при фенилгидразиновой метгемоглобинемии // Там же. – С. 270-271.
6. Шперлинг И.А., Новицкий В.В. К вопросу о компенсаторной роли ретикулоцитоза при экспериментальной гемолитической анемии // Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицинского обеспечения войск, подготовки и усовершенствования военно-медицинских кадров», г. Томск, 31 января-1 февраля 2003 г. – Томск, 2003. – Вып. VIII. – С.147-148.
7. Шперлинг И.А., Новицкий В.В. Роль нарушения функционального статуса эритроцитов в формировании гипоксического состояния в организме при экспериментальной нитритной метгемоглобинемии // Там же. – С. 148.
8. Шперлинг И.А., Ткач А.Ф., Куприна Н.П. Роль химической структуры веществ в развитии гемолитической анемии при воздействии экотоксикантов // Сборник научных трудов «Актуальные проблемы экологии». – Томск, 2003. – Вып. 4. – С. 26.
9. Шперлинг И.А., Ткач А.Ф., Гарбуз Л.А. и др. К вопросу о диагностике гемолиза при токсических метгемоглобинемиях // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 200-летию Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. – СПб., 2003. – С. 113-114.
10. Шперлинг И.А., Ткач А.Ф., Китаев Ю.В. К патогенезу гипоксического синдрома при токсических метгемоглобинемиях // Там же. – С. 114-115.

11. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Бас В.В. и др. Роль мембранно-связанного гемоглобина в патогенезе отравлений оксидом углерода // Сборник работ по материалам межгородской научно-практической конференции «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 15-16 апреля 2004 г. – СПб., 2004. – С. 161.
12. Новицкий В.В., Шперлинг И.А., Жаткин О.А. и др. Изменения морфофункционального статуса эритроцитов при экспериментальных метгемоглобинемиях // Токсикологический вестник. – 2004. – № 1. – С. 16-20.
13. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Бас В.В. и др. Роль мембранно-связанного гемоглобина в патогенезе отравлений метгемоглобинообразователями // Сборник научных работ по материалам научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины», г. Астрахань, 6-10 мая 2004 г. – Астрахань, 2004. – С. 109-111.
14. Филиппова О.Н., Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В. и др. Активность Na^+, K^+ -АТФазы в эритроцитах при гемолитической анемии // Материалы заочной электронной конференции «Фундаментальные исследования» 10-15 апреля 2005 г. – Фундаментальные исследования. – № 5. – С. 116-117.
15. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Филиппова О.Н. и др. Структурная дезорганизация липидного компартмента мембраны эритроцитов при токсической метгемоглобинемии // Материалы научно-практических конференций профессорско-преподавательского состава Томского военно-медицинского института 2004-2005 гг. «Актуальные вопросы медицинского обеспечения войск, подготовки и усовершенствования военно-медицинских кадров». – Томск, 2005. – Вып. IX. – С. 50-51.
16. Шперлинг И.А., Филиппова О.Н., Рязанцева Н.В. и др. Липидный состав мембраны эритроцитов при острой нитритной метгемоглобинемии // Там же. – С. 51-52.
17. Шперлинг И.А., Филиппова О.Н., Рязанцева Н.В. и др. Изменения поверхностной архитектоники эритроцитов при экспериментальном отравлении оксидом углерода // Там же. – С. 111-112.
18. Шперлинг И.А., Филиппова О.Н., Новицкий В.В. и др. Изучение структурных свойств мембраны эритроцитов методом флуоресцентного зондирования в динамике нитритной метгемоглобинемии // Материалы заочной электронной конференции «Фундаментальные исследования», 20-25 февраля 2005 г. – Фундаментальные исследования. – 2005. – № 4. – С. 90-91.
19. Шперлинг И.А., Филиппова О.Н., Новицкий В.В. и др. Исследование активности Na^+, K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов в динамике нитритной метгемоглобинемии // Там же. – С. 91-92.
20. Шперлинг И.А., Филиппова О.Н., Новицкий В.В. и др. К вопросу о модификации белкового состава мембран эритроцитов при воздействии гематотропных ксенобиотиков // Там же. – С. 92-94.
21. Акимова В.В., Филиппова О.Н., Шперлинг И.А. Мембранные факторы разрушения эритроцитов при гемолитической анемии // Сборник статей по материалам VI

- Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», г. Томск, 19-20 мая 2005 г. – Томск, 2005. – С. 69.
22. Рогов О.А., Филиппова О.Н., Шперлинг И.А. Функциональные свойства мембран эритроцитов при экспериментальной гемолитической анемии // Там же. – С. 83-84.
 23. Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. и др. Механизмы нарушения функциональных свойств эритроцитов при экспериментальной фенилгидразининдуцированной метгемоглобинемии // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – № 3. – С. 37-44.
 24. Филиппова О.Н., Шперлинг И.А., Акимова В.В. и др. Отдаленные эффекты в мембранах эритроцитов при воздействии метгемоглобинообразователей // Сборник статей по материалам межгородской научно-практической конференции «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 14-15 апреля 2005 г. – СПб., 2005. – С. 55-57.
 25. Рогов О.А., Шперлинг И.А., Сырова И.А. и др. Липидный состав мембраны эритроцитов белых крыс после острой интоксикации монооксидом углерода // Сборник статей по материалам VII Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», г. Томск, 18-19 мая 2006 г. – Томск, 2006. – С. 120-121.
 26. Сырова И.А., Рогов О.А., Шперлинг И.А. и др. Изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы и морфологическая картина красной крови у крыс при остром воздействии монооксида углерода // Там же. – С. 123-124.
 27. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Шперлинг И.А. и др. Молекулярные нарушения мембран эритроцитов при токсическом действии метгемоглобинообразователей // Токсикологический вестник. – 2006. – № 4. – С. 27-31.
 28. Рогов О.А., Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. Поверхностная архитектура и липидный состав мембраны эритроцитов при отравлении монооксидом углерода в эксперименте // Материалы заочной электронной конференции «Фундаментальные исследования», 15-20 февраля 2006 г. – Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 6. – С. 92-93.
 29. Рогов О.А., Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. Перекисное окисление липидов в эритроцитах при экспериментальном отравлении монооксидом углерода // Там же. – С. 93-95.
 30. Рогов О.А., Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. Количественные изменения красной крови у белых крыс после острого воздействия монооксида углерода // Там же. – С. 95-96.
 31. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Шперлинг И.А. и др. Механизмы развития гемолитической анемии при экспериментальных метгемоглобинемиях // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Том 142, № 11. – С. 509-513.
 32. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др. Новый подход к определению интенсивности внутрисосудистого гемолиза // Сибирский медицинский журнал. – Том 21, № 1. – 2006. – С. 28-30.

33. Филиппова О.Н., Шперлинг И.А., Рогов О.А. и др. Механизмы повреждения эритроцитов при токсическом действии метгемоглобинообразователей // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 1. – С. 32-37.
34. Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. и др. Закономерности изменения морфологических свойств эритроцитов при остром воздействии оксида углерода // Токсикологический вестник. – 2006. – № 6. – С. 2-6.
35. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жаткин О.А. Патология эритроцита при экзогенной интоксикации. – Томск: Изд-во Томского университета, 2006. – 130 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	–	активные формы кислорода
ВЭГ	–	внеэритроцитарный гемоглобин
Г-6-ФДГ	–	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ДК	–	диеновые конъюгаты
ИДесЭ	–	индекс деструкции эритроцитов
ИДЭ	–	индекс деформируемости эритроцитов
ЛФХ	–	лизофосфатидилхолин
МДА	–	малоновый диальдегид
МСГ	–	мембранно-связанный гемоглобин
НН	–	нитрит натрия
ПОЛ	–	перекисное окисление липидов
СМ	–	сфингомиелин
СРО	–	свободно-радикальное окисление
ФГ	–	солянокислый фенилгидразин
ФС	–	фосфатидилсерин
ФХ	–	фосфатидилхолин
ФЭ	–	фосфатидилэтаноламин
ХС	–	холестерин
CL ₅₀	–	среднелетальная концентрация
DL ₅₀	–	среднелетальная доза
GSH	–	восстановленный глутатион
GSSG	–	окисленный глутатион
Hb	–	гемоглобин
HbCO	–	карбоксигемоглобин
MetHb	–	метгемоглобин

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (зав. – профессор Байков А.Н.), заведующему лабораторией фармакологии кровообращения НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН (директор – академик РАМН Е.Д. Гольдберг) д-ру биол. наук М.Б. Плотникову, старшему научному сотруднику этой же лаборатории д-ру мед. наук О.А. Алиеву, канд. мед. наук В.Н. Сиваченко, канд. физ.-мат. наук А.А. Миллеру, сотрудникам кафедры токсикологии и медицинской защиты Томского военно-медицинского института за оказанную помощь при подготовке

и проведении ряда исследований, профессору кафедры биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета Т.С. Федоровой за консультативную и методическую помощь.

Содержание общих фосфолипидов и их фракционный состав в мембране эритроцитов у крыс после однократного введения нитрита натрия (НН) (90 мг/кг, DL₅₀) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) (150 мг/кг, DL₅₀), $\bar{X} \pm m$

Группы животных		Общие фосфолипиды, мг/мг белка	Фракции фосфолипидов, %						
			Лизофосфатидилхолин	Фосфатидил-инозитолы	Сфингомиелин	Фосфатидил-холин	Фосфатидил-серин	Фосфатидил-этаноламин	
Контрольная		0,98±0,06	4,05±0,53	7,80±0,63	11,40±0,89	39,12±0,74	17,40±0,52	19,80±0,91	
Опытная		0,65±0,06**	12,84±0,98***	7,20±0,75	16,34±0,44**	32,76±0,84**	19,28±0,77*	11,98±0,85***	
Сроки исследования	1,5 ч	НН	—	—	—	—	—	—	
		ФГ ¹	—	—	—	—	—	—	
	1 сут	НН	0,71±0,06*	10,98±0,73***	7,15±0,68	16,22±0,89**	34,40±0,92**	18,56±0,63	12,35±0,77***
		ФГ	0,57±0,09***	12,52±0,84***	6,72±0,61	17,52±0,51**	31,24±0,58*** ooo	22,34±0,48* oo	10,42±0,59*** o
	3 сут	НН	0,77±0,08*	8,90±0,86***	6,99±0,51	15,77±1,12*	35,18±0,74*	17,95±0,51	14,94±0,59***
		ФГ	0,61±0,06**	11,73±0,91*** o	7,05±0,48	16,54±0,66**	32,01±0,43** o	19,13±0,65* o	11,23±0,41*** oo
	5 сут	НН	0,72±0,07*	7,00±0,37**	7,11±0,38	14,95±0,67*	36,84±0,94*	19,86±0,48*	13,99±0,36***
		ФГ	0,69±0,06*	9,34±0,72*** ooo	7,21±0,54	15,23±0,35*	34,62±0,35**	19,45±0,43*	13,86±0,66***
	7 сут	НН	0,78±0,06*	6,12±0,66*	7,16±0,55	15,98±0,74**	35,52±0,78**	20,11±0,25**	15,02±0,63**
		ФГ	0,75±0,07*	7,28±0,69***	7,45±0,63	14,56±0,46*	35,88±0,67**	19,67±0,74*	15,53±0,58**
	14 сут	НН	0,86±0,04	4,63±0,48	7,52±0,33	13,99±0,60*	37,61±0,82	19,28±0,47*	16,98±0,54*
		ФГ	0,84±0,04	6,37±0,59** ooo	7,63±0,74	12,65±0,52	37,15±0,63	18,79±0,81	17,38±0,47*
	21 сут	НН	0,92±0,08	4,25±0,39	7,66±0,48	13,42±0,98	38,23±0,93	18,41±0,56	18,82±0,73
		ФГ	0,91±0,05	5,18±0,42	7,54±0,82	11,25±0,47	38,89±0,81	18,11±0,72	18,93±0,63

Примечание. Здесь и в табл. 5: */**/** — уровень статистической значимости различий по сравнению со значениями в контрольной группе ($p < 0,05$ / $p < 0,01$ / $p < 0,001$, U-критерий Манна-Уитни); ^o/_{oo}/_{ooo} — уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными значениями у крыс после введения нитрита натрия ($p < 0,05$ / $p < 0,01$ / $p < 0,001$, U-критерий Манна-Уитни).

¹ — мембраны эритроцитов, полученных от животных через 1,5 ч после введения ФГ, выделить не удалось по причине образования из биоматериала мембран-гемоглобиновой смеси, не поддающейся разделению на фракции

Морфологический состав эритроцитов (%) у крыс после однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия (НН) (90 мг/кг, DL₅₀) и солянокислого фенилгидразина (ФГ) (150 мг/кг, DL₅₀), $\bar{X} \pm m$

Морфологические формы эритроцитов	Группы животных		Сроки исследования						
	Контрольная	Опытная	1,5 ч	1 сут	3 сут	5 сут	7 сут	14 сут	21 сут
Двойковогнутые дискоциты	86,58±0,41	НН	77,25±0,37 ***	81,34±0,48 ***	84,35±0,45	82,49±0,34 ***	83,62±0,32 **	85,15±0,41	86,21±0,29
		ФГ	—	3,40±0,02 *** ooo	30,17±0,05 *** ooo	55,21±0,20 *** ooo	76,85±0,43 *** ooo	81,44±0,27 ** ooo	82,10±0,36 ** ooo
Переходные	10,74±0,25	НН	13,85±0,22 ***	12,80±0,26 **	11,17±0,25	12,32±0,21 *	12,20±0,18 *	11,40±0,23	10,85±0,19
		ФГ	84,53±2,27 *** ooo	64,15±1,49 *** ooo	28,92±1,25 *** ooo	28,78±0,98 *** ooo	17,58±0,84 *** ooo	14,54±0,57 *** ooo	12,98±0,38 o
Предгемолитические	1,79±0,05	НН	5,92±0,14 ***	4,29±0,20 ***	3,15±0,13 ***	3,42±0,16 ***	3,07±0,14 ***	2,39±0,18 **	1,91±0,15
		ФГ	—	—	6,25±0,24 *** ooo	2,92±0,15 ***	3,51±0,11 ***	3,18±0,10 *** o	2,51±0,08 o
Дегенеративные	0,57±0,03	НН	2,84±0,05 ***	1,66±0,05 ***	1,34±0,07 ***	1,70±0,05 ***	1,46±0,03 ***	1,28±0,05 ***	1,04±0,07 ***
		ФГ	15,54±0,57 *** ooo	32,95±4,21 *** ooo	35,08±3,77 *** ooo	12,21±0,39 *** ooo	2,14±0,34 *** ooo	1,53±0,29 *** o	1,49±0,20 *** o