

## **ВЛИЯНИЕ ГИПЕРОКСИИ НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЭРИТРОЦИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ МОРСКИХ СВИНОК**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Введение.** Выхаживание недоношенных новорожденных – одна из актуальных проблем современной неонатологии. С этой целью им нередко применяется длительная искусственная вентиляция легких (ИВЛ) с высоким содержанием кислорода во вдыхаемой смеси.

Необходимость проведения ИВЛ с высокой концентрацией кислорода у недоношенных детей с экстремально низкой массой тела обусловлена несформированностью альвеолярного отдела легких и, как следствие, нарушением газообмена, что ведет к снижению парциального давления кислорода крови и выраженной гипоксии. Проведение ИВЛ способствует формированию терминальных бронхиол, из которых развиваются ацинусы, представляющие собой газообменные структуры легких у таких новорожденных.

Морфологическая и функциональная незрелость органов дыхания на фоне этой процедуры способствует развитию патологических процессов в легких, среди которых первое место по частоте и клинической значимости занимает бронхолегочная дисплазия (БЛД) [1]. При этом выделяют несколько причин, которые могут приводить к повреждению легких и развитию БЛД: механическое повреждение легких при ИВЛ (баротравма, волюмотравма), токсическое действие высоких концентраций кислорода, недостаточность антиоксидантных систем и незрелость легочной ткани у недоношенных. В литературе можно встретить результаты исследований особенностей метаболизма в эритроцитах новорожденных в условиях ИВЛ [2,3], однако отсутствуют данные об исследовании эритроцитов новорожденных при воздействии высоких доз кислорода, поэтому нет возможности оценить вклад гипероксии в развитие патологических процессов, которые развиваются в организме недоношенных новорожденных при ИВЛ.

Токсическое действие высокой концентрации кислорода обусловлено его окислительными свойствами и способностью образовывать свободные радикалы – активные формы кислорода (АФК) [2]. АФК обладают высокой цитотоксичностью для клеток и клеточных структур, так как способны индуцировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, повреждать мембрансвязанные белки, ферменты и нуклеиновые кислоты.

В процессе эволюции в клетках для защиты от АФК выработались специализированные системы антиоксидантной защиты (АОС), позволяющие поддерживать концентрацию АФК на безопасном для клетки уровне. Дисбаланс в системе «оксиданты – антиоксиданты» ведет к развитию окислительного стресса. Система антиоксидантной защиты развивается у плода в третьем триместре беременности, поэтому ее активность у недоношенных новорожденных является недостаточной [3]. Это предрасполагает к накоплению в легочной ткани АФК.

Таким образом, использование высоких доз кислорода при выхаживании недоношенных новорожденных создает предпосылки для «окислительного стресса», который служит одним из факторов повреждения тканей легкого и развития бронхолегочной дисплазии у ребенка.

Вероятно, патологическое влияние гипероксии не ограничивается только бронхолегочной системой, поскольку у недоношенных детей часто развиваются и другие осложнения (ретинопатия, внутримозговые кровоизлияния и др.) [4]. В качестве связующего звена здесь очевидна роль эритроцитов, которые, с одной стороны, сами подвержены действию АФК [5], с другой – осуществляют газообмен между легкими и остальными органами и тканями. Чтобы выяснить возможность повреждения эритроцитов в данных условиях, **целью** настоящего исследования было определение влияния высокой концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе на осмотическую резистентность эритроцитов, активность ферментов антиоксидантной защиты, уровень восстановленного глутатиона и продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитах из крови новорожденного потомства морских свинок.

**Материалы и методы исследования.** Эксперимент проводили с использованием новорожденных морских свинок (опытная и контрольная группы). Сразу после рождения животных опытной группы ( $n = 4-9$ ) помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода 70-80%. Температура и относительная влажность поддерживались на уровне 20-25°C и 50-80% соответственно. Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 7 и 14 суток. Животные контрольной группы ( $n=5-10$ ) в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) и получали кровь для исследования.

Кровь использовали для определения осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ). ОРЭ оценивали по степени гемолиза в гипотонических растворах хлорида натрия, приняв за 100% гемолиз в пробирке с 0,1% раствором хлорида натрия.

Эритроциты отделяли путем центрифугирования и дважды отмывали 0,9% изотоническим раствором.

В отмытых эритроцитах определяли содержание ТБК-активных продуктов и восстановленного глутатиона (G-SH), а также активность антиоксидантных ферментов: глутатион пероксидазы (ГП), глутатион редуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Гл-6-ф-ДГ).

Содержание ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов, представленных преимущественно малоновым диальдегидом (МДА), определяли по методу M.Oikawa [6]. Метод основан на взаимодействии продуктов ПОЛ с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием триметинового комплекса розового цвета, интенсивность окраски которого измерялась спектрофотометрически при 532 нм. Содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах выражали в мкмоль/г гемоглобина.

Содержание восстановленного глутатиона (G-SH) в эритроцитах изучалось по методу J.Sedlak [7]. В основе метода лежит реакция взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5-дителиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) с образованием 2-нитро-5-меркаптобензойной кислоты, способной поглощать свет с длиной волны 412 нм. Содержание G-SH в эритроцитах выражали в мкмоль/г гемоглобина.

Активность ГР определяли по методу P.L.Wendell [8]. Метод основан на измерении изменения экстинкции НАДФН·Н<sup>+</sup> в течение 5 мин при длине волны 340 нм. Активность ГР в эритроцитах выражали в мкмоль/мин/г гемоглобина.

Активность ГП в эритроцитах определяли по методу В.М. Моина [9]. Скорость глутатионпероксидазной реакции оценивали по количеству непрореагировавшего G-SH, который определяли реакцией с 5,5-дителиобис-2-нитробензойной кислотой. Количество образующегося при этом окрашенного продукта измеряли спектрофотометрически при 412 нм. Активность ГП выражали в мкмоль/мин/г гемоглобина.

Активность СОД и каталазы определяли кинетически с использованием наборов фирмы «Анализ-Х». Активность СОД и каталазы выражали в U/г гемоглобина.

Активность Гл-6-ф-ДГ в эритроцитах определяли кинетически по измерению скорости восстановления НАДФ<sup>+</sup> в инкубационной среде, содержащей избыток субстратов и кофакторов [10]. Измерение содержания НАДФН·Н<sup>+</sup> регистрировали на спектрофотометре при длине волны 340 нм. Активность Гл-6-ф-ДГ выражали в мкмоль/мин/г гемоглобина.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0. Для оценки достоверности различий между группами использовали

непараметрический тест Манна-Уитни для независимых выборок. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (медиана: 25 процентиль – 75 процентиль). Отличия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В эритроцитах новорожденных морских свинок, которые находились в условиях гипероксии в течение 7 суток, активность СОД увеличилась в 2,1 раза по сравнению с интактными животными (табл.1). СОД участвует в обезвреживании супероксидного радикала, источником которого в эритроцитах является процесс спонтанного окисления гемоглобина в метгемоглобин [11]. В обычных условиях окислению подвергается только 0,5% двухвалентного железа в составе гемоглобина, но в условиях гипероксии этот процесс может протекать более интенсивно [12], что приведет к увеличению продукции супероксидного радикала.

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

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

Примечание: \* - различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

Обезвреживание супероксидного радикала в реакции дисмутации, которую катализирует СОД, ведет к образованию менее токсичного пероксида водорода. Поэтому увеличение активности СОД может привести к увеличению продукции пероксида водорода в эритроцитах. Непосредственной опасности для клетки пероксид водорода не представляет, поскольку быстро разрушается каталазой. Однако, как видно из таблицы 1, активность каталазы в эритроцитах крови новорожденных животных хотя и имела тенденцию к увеличению, но достоверно не изменялась.

Кроме каталазы в обезвреживании перекисей, в том числе пероксида водорода, активно участвует система глутатиона и глутатионзависимых ферментов (ГП и ГР). ГП непосредственно катализирует расщепление пероксида водорода, используя для этого GSH. В эритроцитах животных, находившихся в условиях гипероксии 7 суток, активность этого фермента не изменилась, а активность ГР даже снизилась в 1,4 раза по сравнению с контролем (рис.2). Последний фермент катализирует реакцию восстановления окисленного глутатиона. Однако содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах новорожденных морских свинок, находившихся в условиях гипероксии, достоверно не изменялось. Быть может, этому обстоятельству способствовало известное из литературы увеличение при гипероксии поступления в клетки SH-содержащих аминокислот, в частности, цистеина, который используется для синтеза глутатиона [13].

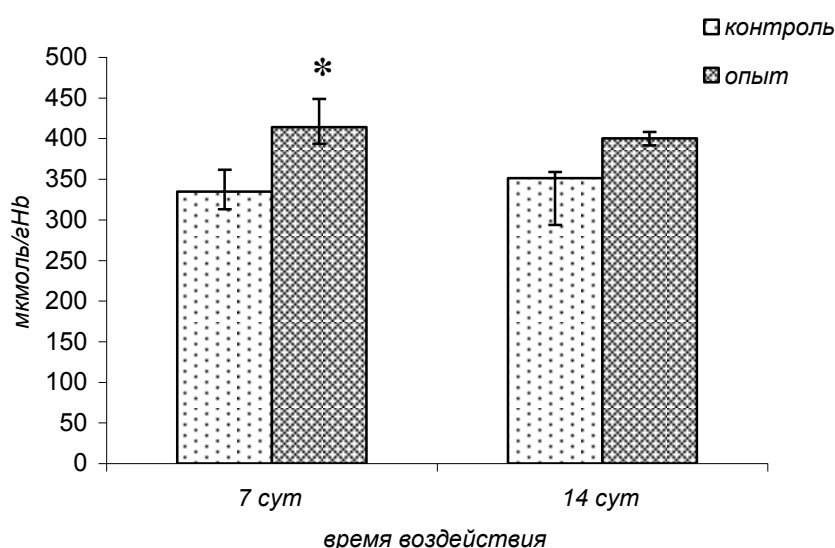


Рисунок 1. Содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах новорожденных морских свинок в условиях гипероксии в динамике

Примечание: \* - различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

Таким образом, в эритроцитах новорожденных морских свинок, которые содержались в течение 7 суток в условиях гипероксии, увеличена концентрация пероксида водорода, вызванная, в том числе, неадекватной активностью ферментов, принимающих участие в его катаболизме. Как известно, избыток пероксида водорода, особенно в присутствии супероксидного радикала, запускает процесс свободнорадикального окисления и ведет к лавинообразному нарастанию активных форм кислорода, которые повреждают клеточные структуры и, в том числе, мембранные липиды, активируя процессы перекисного окисления [14]. Об интенсификации процессов ПОЛ свидетельствует достоверное

увеличение содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах животных после недельной инкубации в условиях гипероксии в 1,2 раза по сравнению с интактными животными (рис.1).

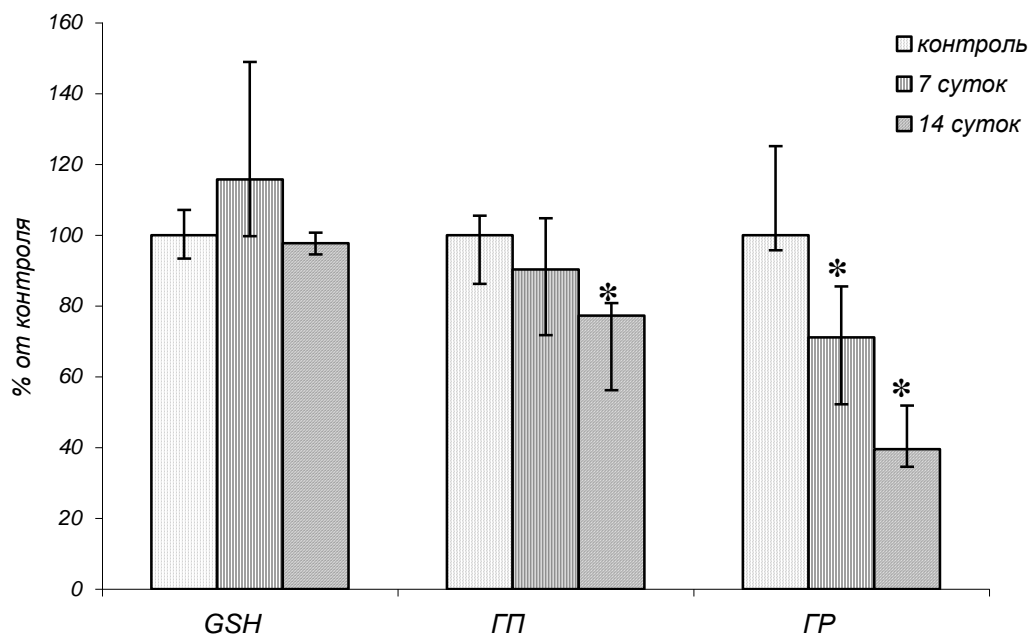


Рисунок 2. Содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) в эритроцитах новорожденных морских свинок в условиях гипероксии в динамике (в % от контрольных значений)  
Примечание: \* - различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

При увеличении сроков содержания животных в среде с высокой концентрацией кислорода до 14 суток в эритроцитах резко падает активность антиоксидантных ферментов: активность каталазы снижается в 2,5 раза по сравнению с интактным контролем (табл.1), активность глутатионпероксидазы падает в 1,3 раза, а активность глутатионредуктазы - в 2,5 раза по сравнению с контролем (рис.2). Одной из причин может быть недостаток коферментов, необходимых для их работы. ГП является селензависимым ферментом, а запасы селена, как свидетельствуют литературные данные, в условиях интенсификации процессов свободнорадикального окисления в организме, быстро истощаются [15]. ГР активно работает только при наличии в клетке достаточного количества восстановленного НАДФН<sup>+</sup>. В образовании этого кофермента принимает участие глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, активность которой в эритроцитах экспериментальных животных

снижалась с 20,61 (19,31 – 22,41) мкмоль/мин/гНв до 11,90 (8,32 – 15,02) мкмоль/мин/гНв ( $p < 0,05$ ) (табл.1). Таким образом, сниженной активности ГР в эритроцитах сопутствует низкая активность одного из ключевых ферментов, участвующих в образования кофермента этого фермента - восстановленного НАДФ<sup>+</sup>. Это дает основание предполагать наличие причинно-следственной связи между обнаруженным изменением этих двух показателей.

Нельзя исключить и другие возможные механизмы снижения активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах при гипероксии. В частности, из литературы хорошо известно повреждение ферментов продуктами свободнорадикального окисления. Причем, в первую очередь, повреждаются те из них, которые имеют в своем составе свободные SH-группы [16].

Дисбаланс в функционировании антиоксидантных систем эритроцитов, накопление активных форм кислорода способны изменять свойства мембран эритроцитов новорожденных животных. Если у контрольных новорожденных морских свинок в растворе NaCl с концентрацией 0,45% гемолизу подвергались 23,14% (22,47 – 25,63) эритроцитов, то после содержания таких животных в течение 7 и 14 суток в условиях гипероксии при той же концентрации NaCl гемолизировалось соответственно 65,02% (64,76 – 68,43) и 86,39% (84,56 – 90,43) всего эритроцитарного пула ( $p < 0,05$ ). Эти данные свидетельствует о снижении осмотической резистентности эритроцитов.

**Таблица 2. Изменение осмотической резистентности эритроцитов у новорожденных морских свинок после содержания в условиях гипероксии**

Показатель	Контроль	7 суток	14 суток
% гемолиза (в 0,45% р-ре NaCl)	23,14 22,47 – 25,63	65,02 * 64,76 – 68,43	86,39 * 84,56 – 90,43

Примечание: \* - различия достоверны при  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

Проведенное исследование позволило установить, что в эритроцитах новорожденных животных, находившихся в среде с повышенным содержанием кислорода в течение 7 и 14 суток, наблюдается изменение показателей антиоксидантной защиты. Через 7 суток резко возрастает активность СОД, увеличивается концентрация продуктов перекисного окисления липидов. При более длительной гипероксии (в течение 14 суток) в эритроцитах снижается активность и других антиоксидантных ферментов, в том числе, участвующих в

метаболизме глутатиона (ГП и ГР). Эти данные наряду обнаруженным снижением осмотической резистентности эритроцитов новорожденных при гипероксии демонстрируют известную из литературы взаимосвязь развития окислительного стресса с нарушением функциональной способности этих клеток.

Учитывая важнейшую роль эритроцитов для газообмена всех органов и тканей, можно предположить, что выявленные изменения лежат в основе системного повреждения вследствие вдыхания смеси с высоким содержанием кислорода. Как известно, осложнениями ИВЛ у недоношенных является не только развитие бронхолегочной дисплазии, но также ретинопатия и мозговые кровоизлияния [1]. Предстоящие исследования, как ожидается, позволят получить дополнительные данные, которые смогут подтвердить или опровергнуть сделанное предположение, равно как и изыскать средства по предотвращению выявленных изменений.

### Литература

1. Шабалов Н.П. Неонатология М. 2004. т. 1.
2. Vento M., Asensi M. et al // Semin. Perinatol. 2002. Т. 26. № 6. С. 406 – 410.
3. Кузнецова С.В. и др. // Медицинский альманах. 2010. № 2. С.96 – 97.
4. Harman D. // EXS. 1992. N 62. P.1—10.
5. Frank, L. // Clin Perinatol. 1992, N 19. P.541—562.
6. Сидоренко Е.И., Аксенова И.И. и др. // Российский медицинский журнал. 2000. №5. С. 30—33.
7. Казакова В.В., Ёлкина Н.М. // Укр. біохім. журн. 2007. Т. 79. № 4. С. 34—38.
8. Olikawa M., Olusa N. // Anal. Biochem. 1979. Vol.95. N 2. P. 351—358.
9. Sedlak J., Lindsay R.H. // Anal. Biochem. 1968. Vol.25. N 1. P. 192—205.
10. Wendlell P.Z. // Biochem. Biophys. Acta. 1967. Vol.136. N 2. P. 402 — 404.
11. Моин В.М. // Лаб. дело. 1987. N 12. С.724 —727.
12. Путилина Ф.Е., Зойдзе С.Д. // Методы биохимических исследований. 1982. С. 168—172.
13. Дубинина Е.Е. // Успехи современной биологии. 2001. Т.108. №.1. С. 3—17.
14. Дудкин С. И. Металлосодержащие белки плазмы крови при гипероксии: автореф. дисс.... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону. 1983.
15. Deneke S.M. Fanburg B.L. // Am. J. Physiol. 1989. 257. L163—L173.
16. Болдырев А.А. // Соросовский образоват. журнал. 2001. Т. 7. №4. С. 21—28.



17. Баранова Т.И. Патогенетическая роль дефицита селена и структурно-функциональных нарушений мембран эритроцитов при железодефицитной анемии у детей раннего возраста: автореф. дисс.... канд. мед. наук. Чита. 2004.
18. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113, вып.1. С. 71—81.

*ZH. A. RUTKOVSKAYA, I. L. KOTOVICH, A. D. TAGANOVICH*

**EFFECT OF HYPEROXIA ON ANTIOXIDANT SYSTEM IN ERYTHROCYTES  
OF NEWBORN GUINEA PIGS**

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

*Summary*

The paper contains the data on the influence of hyperoxia on the osmotic resistance, antioxidant enzyme activity, the level of reduced glutathione and lipid peroxidation products in erythrocytes of newborn guinea pigs. The parameters of antioxidant defense were found to be altered in erythrocytes of newborn animals that were in an environment with high oxygen content: following 7 day exposure the activity of SOD was dramatically increased as well as the concentration of lipid peroxidation products. More prolonged hyperoxia (for 14 days) resulted in decrease of other antioxidant enzymes activity in red blood cells, including those involved in the metabolism of glutathione (glutathione peroxidase and glutathione reductase). Osmotic resistance of red blood cells progressively decreased in hyperoxia.