

УДК 591.111-06:591.127:546.21

Ж. А. РУТКОВСКАЯ, И. Л. КОТОВИЧ, А. Д. ТАГАНОВИЧ

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

Белорусский государственный медицинский университет, Минск

(Поступила в редакцию 16.05.2011)

**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 установлено 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) [4]. Последние обладают высокой цитотоксичностью для клеток и клеточных структур, так как способны индуцировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, повреждать мембраносвязанные белки, ферменты и нуклеиновые кислоты.

В процессе эволюции для защиты от АФК в клетках выработались специализированные системы антиоксидантной защиты (АОС), позволяющие поддерживать концентрацию АФК на безопасном для клетки уровне. Дисбаланс в системе окислители–антиоксиданты ведет к развитию окислительного стресса. Система антиоксидантной защиты развивается у плода в третьем триместре беременности, поэтому ее активность у недоношенных новорожденных является недостаточной [5], что и 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 БЛД 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.) [6]. В качестве связующего звена здесь очевидна роль



эритроцитов, которые, с одной стороны, сами подвержены действию АФК [7], с другой – осуществляют газообмен между легкими и остальными органами и тканями.

Цель настоящего исследования – 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 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 составляли 20–25 °С и 50–80% соответственно. Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 7 и 14 сут. 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, которую 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%-ным раствором хлорида натрия.

Эритроциты отделяли путем центрифугирования и дважды отмывали 0,9%-ным изотоническим раствором. В полученных эритроцитах определяли содержание продуктов, которые реагировали с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты) и восстановленного глутатиона (G-SH), а также активность антиоксидантных ферментов: глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Гл-6-ф-ДГ).

Содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ, представленных преимущественно малоновым диальдегидом (МДА), определяли по методу M. Oikawa [8]. Метод основан на взаимодействии продуктов ПОЛ с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием триметинового комплекса розового цвета, интенсивность окраски которого измеряли спектрофотометрически при 532 нм. Содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах выражали в мкмоль/г гемоглобина.

Уровень G-SH в эритроцитах определяли по методу J. Sedlak [9]. В основе метода лежит реакция взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5-дитиобис-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 [10]. Метод основан на измерении изменения экстинкции НАДФН<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 [11]. Скорость глутатионпероксидазной реакции оценивали по количеству непрореагировавшего G-SH, который определяли реакцией с 5,5-дитиобис-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» (Беларусь) и 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 [12]. Измерение содержания НАДФН<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-й–75-й процентиль). Отличия считали достоверными при  $P < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В эритроцитах новорожденных морских свинок, которые находились в условиях гипероксии в течение 7 сут, активность СОД увеличилась в 2,1 раза по сравнению с аналогичным показателем у интактных животных (табл. 1).



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

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

\* Различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0,05$ .

СОД участвует в обезвреживании супероксидного радикала, источником которого в эритроцитах является спонтанное окисление гемоглобина в метгемоглобин [13]. В обычных условиях окислению подвергается только 0,5% двухвалентного железа в составе гемоглобина, но в условиях гипероксии этот процесс может протекать более интенсивно [14], что приводит к увеличению продукции супероксидного радикала. Обезвреживание последнего 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 табл. 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 сут, активность этого фермента не изменилась, а активность ГР даже снизилась в 1,4 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Последний фермент катализирует реакцию восстановления окисленного глутатиона. Однако содержание G-SH в эритроцитах новорожденных морских свинок, находившихся в условиях гипероксии, достоверно не изменялось. Как известно из литературы, это может быть обусловлено увеличением при гиперок-

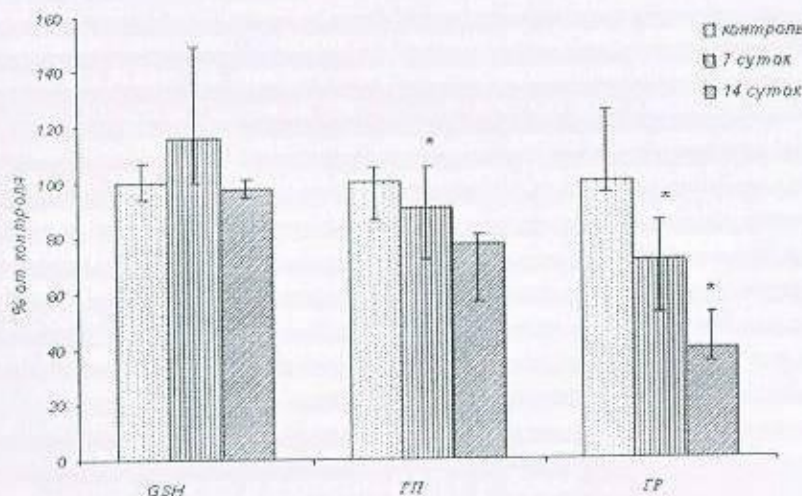


Рис. 1. Содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) в эритроцитах новорожденных морских свинок в условиях гипероксии в динамике (в % от контрольных значений). \* - различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0,05$ .



сии поступления в клетки SH-содержащих аминокислот, в частности цистеина, который используется для синтеза глутатиона [15].

Таким образом, увеличение концентрации пероксида водорода в эритроцитах новорожденных морских свинок, которые содержались в течение 7 сут в условиях гипероксии, вызвано в том числе и неадекватной активностью ферментов, принимающих участие в его катаболизме. Как и известно, избыток пероксида водорода, особенно в присутствии супероксидного радикала, запускает процесс свободнорадикального окисления и ведет к лавинообразному нарастанию АФК, которые повреждают клеточные структуры и, в частности, мембранные липиды, активируя процессы перекисного окисления [16]. 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 их содержанием у интактных животных (рис. 2).

При увеличении сроков содержания животных в среде с высокой концентрацией кислорода до 14 сут в эритроцитах резко падала активность антиоксидантных ферментов: активность каталазы снижалась в 2,5 раза (табл. 1), активность ГП – в 1,3 раза, а активность ГР – в 2,5 раза по сравнению с контролем (см. рис. 1). Одной из причин этого 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 [17]. ГР активно работает только при наличии в клетке достаточного количества восстановленного НАДФН<sup>+</sup>. В образовании этого кофермента принимает участие Гл-6-ф-ДГ, активность которой в эритроцитах экспериментальных животных снижалась с 20,61 (19,31–22,41) мкмоль/мин/г гемоглобина до 11,90 (8,32–15,02) мкмоль/мин/г гемоглобина ( $P < 0,05$ ) (см. табл. 1). Таким образом, сниженной активности ГР в эритроцитах сопутствует низкая активность одного из ключевых ферментов, участвующих в образовании 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 [18].

Дисбаланс в функционировании антиоксидантных систем эритроцитов, накопление активных форм кислорода способны изменять свойства мембран эритроцитов новорожденных животных. Бели 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 сут 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 ( $P < 0,05$ ) (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о снижении осмотической резистентности эритроцитов.

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

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

\* Различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0,05$ .

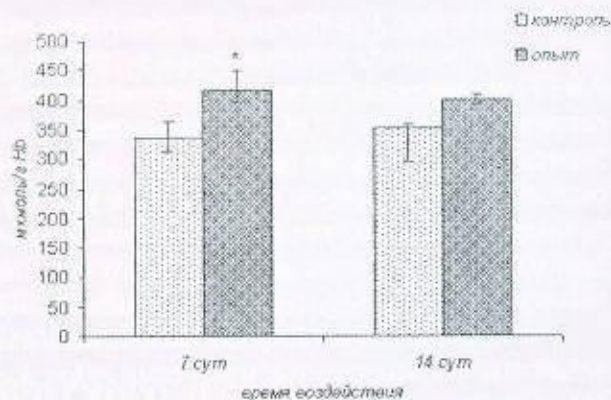


Рис. 2. Содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах новорожденных морских свинок в условиях гипероксии в динамике. \* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0,05$ .



**Заключение.** Проведенное исследование позволило установить, что в эритроцитах новорожденных животных, находившихся в среде с повышенным содержанием кислорода в течение 7 и 14 сут, наблюдалось изменение показателей антиоксидантной защиты. Через 7 сут резко возросла активность СОД, увеличивалась концентрация ТБК-активных продуктов. При более длительной гипероксии (в течение 14 сут) в эритроцитах снижалась активность и других антиоксидантных ферментов, в том числе и участвующих в метаболизме глутатиона (ГП и ГР). Эти данные наряду с 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 искать средства по предотвращению выявленных изменений.

### Литература

1. Шабалов Н. П. Неонатология, М., 2004, Т. 1.
2. Vento M., Alesci M. et al. // *Semin. Perinatol.* 2002, Vol. 26, N 6, P. 406–410.
3. Кузнецова С. В. и др. // *Мед. альманах*, 2010, № 2, С. 96–97.
4. Натман 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. // *Рос. мед. журн.* 2000, № 5, С. 30–33.
7. Катакова В. В., Ёлкина Н. М. // *Укр. біохім. журн.* 2007, Т. 79, № 4, С. 34–38.
8. Oikawa M., Ojusa 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. Wendell P. Z. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1967, Vol. 136, N 2, P. 402–404.
11. Мюин В. М. // *Лаб. дело*, 1987, № 12, С. 724–727.
12. Путилина Ф. Е., Зондзе С. Д. // *Методы биохимических исследований*, 1982, С. 168–172.
13. Дубинина Е. Е. // *Успехи соврем. биол.* 2001, Т. 108, № 1, С. 3–17.
14. Дудкин С. И. Металлосодержащие белки плазмы крови при гипероксии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ростов н/Д., 1983.
15. Deneke S. M., Fanburg B. L. // *Am. J. Physiol.* 1989, Vol. 257, P. L163–L173.
16. Болдырев А. А. // *Сорос. образов. журн.* 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. дис. ... канд. мед. наук. Чита, 2004.
18. Дубинина Е. Е., Шугалай И. В. // *Успехи соврем. биол.* 1993, Т. 113, Вып. 1, С. 71–81.

*Zh. A. RUTKOVSKAYA, I. I. KOTOVICH, A. D. TAGANOVICH*

### EFFECT OF HYPEROXIA ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN ERYTHROCYTES OF NEWBORN GUINEA PIGS

*Belarusian State Medical University, Minsk*

### Summary

The article 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 dramatically increased as well as the concentration of lipid peroxidation products. More prolonged hyperoxia (for 14 days) resulted in decreasing 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.