

УДК 612.111.1:612.116.2

АНТИОКСИДАНТНАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПОСЛЕ КРОВОПОТЕРИ И В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

**Ксейко Д.А., Генинг Т.П., Бочкова Е.Г., Котельников С.В.,
Садретдинова Л.Н., Маракаева Т.Р.**

*ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет, Институт медицины,
экологии и физической культуры», Ульяновск, e-mail: ybrf4@rambler.ru*

Изучение состояния эритроцитов в постгеморрагический период представляет особый интерес, поскольку нарушение их функционального состояния играет важную роль в изменении реологических и коагуляционных свойств крови, возникновении и развитии расстройств гомеостаза. Кроме того, оценка антиокислительного статуса эритроцитов в настоящее время рассматривается как показатель неспецифической резистентности всего организма. С целью ослабления перекиссгенерирующих процессов в эритроцитах нами была использована аскорбиновая кислота. Она может выступать в качестве донора и акцептора ионов водорода благодаря наличию в структуре двух фенольных групп, ее антиоксидантные свойства характеризуются широким спектром инактивирующего действия на различные свободные радикалы. Однако в определенных условиях АК оказывает прооксидантный эффект. Работа выполнена на белых беспородных крысах. Состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали путем определения малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах. Для оценки состояния антиоксидантной системы (АОС) определяли активность каталазы и глутатионредуктазы (ГР) в эритроцитах белых крыс. Аскорбиновую кислоту (АК) вводили внутривенно в дозах 25 и 50 мг/кг однократно через 10 мин после кровопотери. Показано, что на фоне кровопотери активируются процессы ПОЛ в эритроцитах, о чем свидетельствует увеличение в них уровня МДА. Однократное введение АК внутривенно не приводило к нормализации содержания МДА в эритроцитах ни при одной из использованных доз, и на всех изученных сроках она оказывала прооксидантный эффект. Внутривенное введение АК только в дозе 25 мг/кг способствовало усилению активности каталазы. При этом уровень активности ГР в эритроцитах повышался только при использовании дозы 50 мг/кг через 6 ч после кровопотери, на более позднем сроке (24 ч) активность фермента вновь снижалась.

Ключевые слова: кровопотеря, гипоксия, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, аскорбиновая кислота, эритроциты

ANTIOXIDANT RESISNANCE OF ERYTHROCYTES AFTER BLOOD LOSS AND CONDITIONS OF CORRECTION OF ASCORBIC ACID

**Kseyko D.A., Gening T.P., Bochkova E.G., Kotelnikov S.V.,
Sadretdinova L.N., Marakaeva T.R.**

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: ybrf4@rambler.ru

A study of the state of erythrocytes in posthemorrhagic period is of particular interest because a violation of their functional state plays an important role in the change of the rheological and coagulation properties of blood, and the origin and development of disorders of homeostasis. Furthermore, assessment of the antioxidant status of the erythrocytes is currently regarded as a measure of nonspecific resistance of the whole organism. In order to reduce peroxide-generating processes in red blood cells we used ascorbic acid. It can act as a donor and an acceptor of hydrogen ions due to the structure of the two phenolic groups, its antioxidant properties have a broad spectrum of inactivating action on different free radicals. However, in certain circumstances, ascorbic acid has prooxidant effect. The work carried out on white not purebred rats. The state of lipid peroxidation was evaluated by determining the malonic dialdehyde (MDA) in erythrocyte. To assess the state of the antioxidant system determined the activity of catalase and glutathione reductase (GR) in erythrocytes of albino rats. Ascorbic acid was administered intravenously in doses of 25 and 50 mg/kg once after 10 minutes after blood loss. It has been shown that the blood loss process are activated of lipid peroxidation in erythrocytes, as evidenced by an increase in the level of MDA in them. A single administration of intravenous ascorbic acid does not lead to normalization of the level of MDA in erythrocytes nor in one of the doses used, and the timing of it all studied exerted prooxidant effect. Intravenous administration of ascorbic acid only at a dose of 25 mg/kg led strengthen of the activity of catalase. The level of activity of GR in erythrocytes was increased only when at a dose of 50 mg/kg in 6 hours after blood loss, at a later time (24 hours) the enzyme activity has been decreasing again.

Keywords: blood loss, hypoxia, lipid peroxidation, antioxidant system, ascorbic acid, erythrocytes

Значение свободно радикального окисления для мембранной патологии клетки в настоящее время не вызывает сомнений. Факторы, определяющие резистентность организма к окислительному повреждению, помимо липидной композиции включают ряд эндогенных антиоксидантов, непосредственно реагирующих с промежуточными продуктами реакции перекис-

ного окисления или активными формами кислорода [7].

Изучение состояния эритроцитов в постгеморрагический период представляет особый интерес, поскольку нарушение их функционального состояния играет важную роль в изменении реологических и коагуляционных свойств крови, возникновении и развитии расстройств гомеостаза. Кроме

того, оценка антиокислительного статуса эритроцитов в настоящее время расценивается как показатель неспецифической резистентности всего организма [5].

Установлено, что кровопотеря интенсифицирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах. Эти изменения отражают увеличение функциональной нагрузки на сохранившиеся эритроциты, а с другой стороны могут быть обусловлены метаболическими расстройствами вследствие кровопотери [4]. С целью ослабления перекисногенерирующих процессов в эритроцитах нами была использована аскорбиновая кислота (АК). Она может выступать в качестве донора и акцептора ионов водорода благодаря наличию в структуре двух фенольных групп, ее антиоксидантные свойства характеризуются широким спектром инактивирующего действия на различные свободные радикалы [2]. Однако в определенных условиях АК оказывает прооксидантный эффект. Так, было показано, что при его взаимодействии с железом усиливается перекисная окисление липидов, что приводит к повреждению клеточных мембран [2, 6].

Цель исследования – изучить процессы ПОЛ и состояние антиоксидантной системы (АОС) в эритроцитах крыс после кровопотери и оценить возможность коррекции обнаруженных биохимических нарушений с помощью внутривенного введения АК.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на белых беспородных крысах массой 240–280 г. Гипоксию вызывали кровопусканием через катетер [8]. Объем кровопотери составил 2% от массы животного. Животные были разделены на следующие группы: 1-ая группа – интактные животные, 2-я группа – крысы с кровопотерей (материал для исследования брали через 6 и 24 ч после кровопотери), 3-я группа – интактные животные, получавшие АК внутривенно (контрольная группа), 4-я группа – жи-

вотные с кровопотерей, получавшие АК внутривенно. В каждой группе по 12 животных. АК вводили внутривенно в дозах 25 и 50 мг/кг однократно через 10 мин после кровопотери. Состояние процессов ПОЛ оценивали путем определения малонового диальдегида (МДА) [1] в эритроцитах. Для оценки состояния АОС определяли активность каталазы [3] и глутатионредуктазы (ГР) [3] в эритроцитах белых крыс.

Поскольку распределение в выборках не отличалось от нормального, для оценки достоверности различий между группами использовали метод парных переменных (t-критерий Стьюдента) Excel (Windows 2010). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Экспериментальные исследования проводились с соблюдением биоэтических правил.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование влияния кровопотери на содержание в эритроцитах крыс продукта ПОЛ – МДА показало, что через 6 ч после кровопотери его концентрация достоверно возросла на 15,34% (с $573,25 \pm 42,92$ мкмоль/л до $661,17 \pm 39,77$ мкмоль/л) ($p < 0,05$). Через 24 ч после кровопотери мы наблюдали более существенное увеличение данного показателя: содержание МДА достоверно возросло на 21,58% относительно исходных значений ($p < 0,05$).

В ускорении процессов ПОЛ в эритроцитах при кровопотере, наряду с внутриклеточными механизмами, важная роль принадлежит дополнительным негативным воздействиям на эритроциты гуморальных факторов, содержащихся в плазме. Их природа и механизм действия остаются неясными. Известно, что при кровотечении происходит активация различных ферментных систем, а это приводит к накоплению в крови биогенных аминов и других физиологически активных веществ, обладающих прооксидантным действием [5, 7].

Таблица 1

Влияние внутривенного введения АК в дозировках 25 и 50 мг/кг на уровень МДА (мкмоль/л) в эритроцитах белых крыс ($M \pm m$, $n = 12$ в каждой группе)

№ п/п	Условия эксперимента	МДА (мкмоль/л)	
1	Интактные животные	$573,25 \pm 42,92$	
2	6 ч после кровопотери	$661,17 \pm 39,77^*$	
3	24 ч после кровопотери	$696,98 \pm 57,76^*$	
Использованные дозы аскорбиновой кислоты для коррекции кровопотери		25 мг/кг	50 мг/кг
4	Контроль	$665,67 \pm 49,93^*$	$688,44 \pm 45,17^*$
5	В/вн введение АК (6 ч)	$633,22 \pm 46,20$	$896,01 \pm 50,45^{*\wedge}$
6	В/вн введение АК (24 ч)	$689,56 \pm 43,06^*$	$874,18 \pm 54,81^{*\wedge}$

Примечание. * – достоверность различий по отношению к интактным животным, достоверны при $p < 0,05$; \wedge – достоверность различий по отношению к животным с кровопотерей, достоверны при $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние внутривенного введения АК в дозировках 25 и 50 мг/кг на активность каталазы (ммоль/л) и ГР (мкмоль/л) в эритроцитах белых крыс ($M \pm m$, $n = 12$ в каждой группе)

№ п/п	Условия эксперимента	Каталаза (ммоль/л)		ГР (мкмоль/л)	
1	Интактные животные	53,74 ± 4,62		42,51 ± 8,50	
2	6 ч после кровопотери	64,79 ± 1,45*		32,03 ± 5,82*	
3	24 ч после кровопотери	59,77 ± 7,46*		34,73 ± 7,99*	
Использованные дозы аскорбиновой кислоты для коррекции кровопотери		25 мг/кг		50 мг/кг	
		каталаза	ГР	Каталаза	ГР
4	Контроль	58,43 ± 1,80*	43,60 ± 3,64	59,94 ± 7,94*	41,14 ± 12,23
5	В/вн введение АК (6 ч)	63,90 ± 1,60*	30,45 ± 4,05*	56,16 ± 5,03^	48,26 ± 11,83^
6	В/вн введение АК (24 ч)	62,57 ± 1,76*	32,32 ± 5,61*	56,97 ± 2,89	30,78 ± 6,14*

Примечание. * – достоверность различий по отношению к интактным животным, достоверны при $p < 0,05$; ^ – достоверность различий по отношению к животным с кровопотерей, достоверны при $p < 0,05$.

Введение АК интактным животным (контрольная группа) в дозе 25 мг/кг внутривенно вызывает достоверное увеличение уровня МДА в эритроцитах крыс на 16,10% (с $573,25 \pm 42,92$ мкмоль/л до $665,67 \pm 49,93$ мкмоль/л). При внутривенном введении АК животным после кровопотери прослеживается тенденция к снижению концентрации МДА в эритроцитах по сравнению с крысами с кровопотерей. По сравнению с интактными животными через 6 ч после кровопотери наблюдается тенденция к повышению уровня содержания МДА в эритроцитах, а через 24 ч его содержание достоверно повышается на 20,27% (с $573,25 \pm 42,92$ мкмоль/л до $689,56 \pm 43,06$ мкмоль/л).

Внутривенное введение АК интактным животным в дозе 50 мг/кг вызывает достоверное увеличение содержания МДА в эритроцитах на 20,07% (с $573,25 \pm 42,92$ мкмоль/л до $688,44 \pm 45,17$ мкмоль/л). При однократном внутривенном введении АК животным после кровопотери содержание МДА через 6 ч достоверно увеличивается на 35,52% (с $661,17 \pm 39,77$ мкмоль/л до $896,01 \pm 110,45$ мкмоль/л), через 24 ч концентрация МДА повышается на 25,42% (с $696,98 \pm 176,25$ мкмоль/л до $874,18 \pm 50,45$ мкмоль/л) ($p < 0,05$) по сравнению с животными с кровопотерей. По сравнению с данными интактных животных содержание МДА через 6 ч повышается на 56,28%, а через 24 ч на 52,47%.

Введение АК в дозе 25 мг/кг внутривенно не вызывает достоверного изменения активности ГР по сравнению с ее уровнем в эритроцитах интактных животных. Анализируя данные табл. 2, можно отметить, что при внутривенном введении

АК прослеживается тенденция к снижению уровня ГР в эритроцитах на обоих изученных сроках. По сравнению с показателями интактных крыс уровень ГР при внутривенном введении АК через 6 ч снизился на 28,37% (с $42,51 \pm 8,50$ мкмоль/л до $30,45 \pm 4,05$ мкмоль/л) ($p < 0,05$), а через 24 ч – на 23,97% (с $42,51 \pm 8,50$ мкмоль/л до $32,32 \pm 5,61$ мкмоль/л) ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что однократное введение АК в дозе 25 мг/кг на обоих изученных сроках после кровопотери сохраняет пониженный уровень активности ГР в эритроцитах крыс.

Проведенное исследование показало, что введение АК интактным животным (контрольная группа) в дозе 50 мг/кг внутривенно не вызывает достоверного изменения активности ГР, но имеет тенденцию к снижению. При однократном внутривенном введении АК крысам после кровопотери активность ГР через 6 ч имеет тенденцию к повышению, а через 24 ч достоверно снижается на 27,59% (с $42,51 \pm 8,50$ мкмоль/л до $30,78 \pm 6,14$ мкмоль/л) по сравнению с уровнем активности ГР у интактных животных. Относительно показателей животных с кровопотерей активность ГР у этой экспериментальной группы через 6 ч достоверно повысилась на 50,67% (с $32,03 \pm 5,82$ мкмоль/л до $48,26 \pm 11,83$ мкмоль/л), а через 24 ч имела тенденцию к снижению.

Введение АК интактным животным в дозе 25 мг/кг парентерально вызывает достоверные изменения активности каталазы в эритроцитах крыс. Активность фермента возрастает с $57,74 \pm 4,65$ ммоль/л до $58,43 \pm 1,80$ ммоль/л, что составило 108,73% по сравнению с интактными крысами. При однократном внутривенном введении АК

животным после кровопотери активность каталазы через 6 ч имела тенденцию к снижению, а через 24 ч – к повышению по сравнению с животными с кровопотерей. По сравнению с интактными животными активность каталазы у экспериментальных животных превышала исходные показатели через 6 ч на 18,91% ($p < 0,05$), а через 24 ч – на 16,43% ($p < 0,05$). Изложенное свидетельствует о том, что уровень активности каталазы в эритроцитах на обоих изученных сроках после кровопотери при введении АК оставался достоверно выше уровня у интактных животных.

Введение АК интактным животным в дозе 50 мг/кг традиционно внутривенно вызывает достоверные изменения активности каталазы в эритроцитах крыс. Так, ее активность повысилась на 11,45% (с $53,74 \pm 4,62$ ммоль/л до $59,94 \pm 7,94$ ммоль/л) ($p < 0,05$). Как показывают полученные данные (табл. 2), при введении АК при использовании внутривенного способа введения на всех изученных сроках активность каталазы имеет тенденцию к повышению по сравнению с интактными животными.

В то же время при введении АК внутривенно активность каталазы через 6 ч достоверно снижается на 13,32% (с $64,79 \pm 1,45$ ммоль/л до $56,16 \pm 5,03$ ммоль/л), а через 24 ч отмечается тенденция к ее снижению по сравнению с показателями животных с кровопотерей.

Выводы

1. На фоне кровопотери активируются процессы перекисного окисления липидов в эритроцитах, о чем свидетельствует увеличение в них уровня малонового диальдегида.

2. Однократное введение АК внутривенно не приводит к нормализации содержания МДА в эритроцитах ни при одной из использованных доз.

3. На всех изученных сроках аскорбиновая кислота оказывает прооксидантный эффект.

4. При однократном внутривенном введении АК в дозе 25 мг/кг активность каталазы через 6 ч имела тенденцию к снижению, а через 24 ч, наоборот, к повышению по сравнению с животными с кровопотерей. При использовании АК в дозе 50 мг/кг активность каталазы через 6 ч достоверно снизилась, а через 24 ч отмечалась лишь тенденция к ее снижению по сравнению с показателями животных с кровопотерей.

5. Введение АК в дозе 25 мг/кг, на обоих изученных сроках после кровопотери сохраняет пониженный уровень активности ГР в эритроцитах крыс. При использовании дозы 50 мг/кг активность ГР через 6 ч достоверно повысилась на 50,67%, а через 24 ч имела тенденцию к снижению.

Список литературы

1. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // *Лабораторное дело*. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Басинский С.Н., Басинский А.С., Рогачев И.Н. Оценка антиоксидантных свойств лекарственных препаратов в эксперименте // *Ученые записки Орловского государственного университета*. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. – 2008. – № 2. – С. 65–68.
3. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии: справочник. СПб.: Интермедика, 1999. – Т. 2. – 656 с.
4. Моргунов С.С., Матвеев А.В. Коррекция гипоксии и процессов свободнорадикального окисления при гастроуденальных кровотечениях // *Общая реаниматология*. – 2007. – Т. III, № 1. – С. 22–27.
5. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степанова Е.А. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма; контуры проблемы // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2006. – № 2. – С. 62–70.
6. Трегубова И.А., Косолапов В.А., Спасов А.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы // *Успехи физиологических наук*. – 2012. – Т. 43, № 1. – С. 75–94.
7. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // *Успехи современного естествознания*. – 2006. – № 7. – С. 29–36.
8. Sapirstein R.A., Sapirstein E.H., Bredemeyer A. Effect of hemorrhage on the cardiac output and its distribution in the rat // *Circ. Res.* – 1960. – Vol. 8. – P. 135–147.

References

1. Andreeva L.I., Kozhemjakin L.A., Kishkun A.A. Modifikacija metoda opredelenija perekisej lipidov v teste s tiobarbiturovoj kislotoj // *Laboratornoe delo*. 1988. no. 11. pp. 41–43.
2. Basinskij S.N., Basinskij A.S., Rogachev I.N. Ocenka antioksidantnyh svojstv lekarstvennyh preparatov v jeksperimente // *Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta*. Serija: Estestvennye, tehnicheckie i medicinskie nauki. 2008. no. 2. pp. 65–68.
3. Karpishhenko A.I. Medicinskie laboratornye tehnologii: spravochnik. SPb.: Intermedika, 1999. T. 2. 656 p.
4. Morgunov S.S., Matveev A.V. Korrekcija gipoksii i processov svobodnoradikal'nogo okislenija pri gastroduodenal'nyh krovotечenijah // *Obshhaja reanimatologija*. 2007. T. III, no. 1. pp. 22–27.
5. Novickij V.V., Rjazanceva N.V., Stepanova E.A. Molekuljarnye narushenija membrany jeritroцитов pri patologii raznogo genеза javljajutsja tipovoj reakciej organizma; kontury problemy // *Bjulleten' sibirskoj mediciny*. 2006. no. 2. pp. 62–70.
6. Tregubova I.A., Kosolapov V.A., Spasov A.A. Antioksidanty: sovremennoe sostojanie i perspektivy // *Uspehi fiziologicheskikh nauk*. 2012. T. 43, no. 1. pp. 75–94.
7. Chesnokova N.P., Ponukalina E.V., Bizenkova M.N. Molekuljarno-kletochnye mehanizmy inaktivacii svobodnyh radikalov v biologicheskikh sistemah // *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*. 2006. no. 7. pp. 29–36.
8. Sapirstein R.A., Sapirstein E.H., Bredemeyer A. Effect of hemorrhage on the cardiac output and its distribution in the rat // *Circ. Res.* 1960. Vol. 8. pp. 135–147.

Рецензенты:

Катальмов Л.Л., д.б.н., профессор кафедры анатомии, физиологии и гигиены человека и животных ФГБОУ ВПО Ульяновского государственного педагогического университета им. И.Н. Ульянова, г. Ульяновск;

Любин Н.А., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой морфологии, физиологии и патологии животных ФГБОУ ВПО Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии имени П.А. Столыпина, г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 30.12.2014.