УДК 612.014.462:612.015.32:612.116.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ В ПЕЧЕНЬ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ЦЕЛЬЮ ОПТИМИЗАЦИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕПАТОЦИТОВ ПОСЛЕ КРОВОПОТЕРИ

Ксейко Д.А., Генинг Т.П., Бурнашев Р.Р., Шарафутдинов А.И., Садретдинова Л.Н.

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

Цель исследования – изучение влияния направленного транспорта аскорбиновой кислоты в печень на ее антиоксидантную активность после кровопотери. Многочисленными исследованиями установлено, что кровопотеря сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов в печени. Направленность и интенсивность этих процессов зависят от состояния и степени мобилизации антиоксидантной защиты. Антиоксидантный потенциал печени не ограничивается только гепатоцитами. Печень синтезирует белки плазмы крови. Эта антиоксидантная белковая буферная система оказывает защиту в первую очередь на уровне эритроцитов, предотвращая их гемолиз. Перспективным направлением в коррекции нарушений функционального состояния печени является использование направленного транспорта препаратов в орган. Одними из наиболее удобных носителей лекарств в силу безопасности, простоты получения и эффективности применения в клинической практике являются эритроциты. Стенка печеночных синусоидов не содержит перицитов и представлена на большом протяжении лишь эндотелием, который обладает способностью к фагоцитированию эритроцитов. В качестве вещества, оптимизирующего антиоксидантную активность печени, нами была выбрана аскорбиновая кислота, которая является донором электронов и обладает способностью инактивировать различные свободные радикалы. Получение эритроцитарных контейнеров (ЭК) с аскорбиновой кислотой (АК) производилось методом гипотонического лизиса. ЭК с АК вводили внутривенно в дозах 25мг/кг, 50мг/кг и 100мг/кг однократно через 10 мин после кровопотери. Антиоксидантный потенциал печени оценивали по активности каталазы в гепатоцитах, содержанию альбуминов в сыворотке крови. Показано, что использование аутологичных клеток крови для адресной доставки в печень аскорбиновой кислоты повышает пул эндогенной антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: печень, кровопотеря, гипоксия, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, аскорбиновая кислота, направленный транспорт, эритроциты

THE USE OF AUTOLOGOUS ERYTHROCYTES FOR TARGETED DELIVERY OF ASCORBIC ACID TO THE LIVER IN ORDER TO OPTIMIZE THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HEPATOCYTES AFTER HEMORRHAGE

Kseyko D.A., Gening T.P., Burnashev R.R., Sharafutdinov A.I., Sadretdinova L.N.

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

The aim of the research is to study the influence directed transport of ascorbic acid in the liver to its antioxidant activity after blood loss. Numerous studies have found that blood loss is accompanied by activation of lipid peroxidation in the liver. The direction and intensity of these processes depend on the state and degree of mobilization of antioxidant protection. The antioxidant capacity of the liver is not limited to hepatocytes. The liver synthesizes proteins of blood plasma. This antioxidant protein buffer system provides protection primarily at the level of red blood cells, preventing them from hemolysis. A promising direction in the correction of the functional status of the liver is to use direct transport of drugs in the organ. One of the most suitable carriers of medicines by virtue of security, ease of preparation and efficacy in the clinical practice are erythrocytes. Wall of hepatic sinusoids does not contains pericytes and presented at a large distance for only endothelium which has the ability to phagocytosis of erythrocytes. As a matter of optimizing the antioxidant activity of the liver we was chosen ascorbic acid, which is an donor of electrons and has the ability to inactivate various free radicals. The erythrocytic containers with ascorbic acid were produced according to the method of hypotonic lysis. Erythrocyte containers with ascorbic acid were administered intravenously in doses of 25, 50 and 100 mg/kg once after 10 minutes after blood loss. The antioxidant capacity was evaluated by the liver catalase activity in hepatocytes, albumin content in serum. It has been shown that the use of autologous blood cells for targeted delivery of ascorbic acid to the liver increases the pool of endogenous antioxidant protection.

Keywords: liver, blood loss, hypoxia, lipid peroxidation, antioxidants, ascorbic acid, directed transport, erythrocytes

Многочисленными исследованиями установлено, что кровопотеря сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов в печени. Направленность и интенсивность этих процессов зависят от состояния и степени мобилизации антиоксидантной защиты [3]. Усиление окислительных процессов при недостаточности системы антиоксидантной защиты (АОЗ) ведет к развитию «окислительного стресса», являющегося одним из основных механизмов повреждения биологических мембран [10, 5].

Антиоксидантный потенциал печени не ограничивается только гепатоцитами. Печень синтезирует белки плазмы крови, которые могут инактивировать активные формы кислорода, а также связывать ионы переменной валентности, инициирующие образование активных форм кислорода

[9]. Таким образом, нарушения антиоксидантной активности печени могут вызвать серьезные нарушения, в том числе на организменном уровне.

Перспективным направлением в коррекции нарушений функционального состояния печени является использование направленного транспорта препаратов в орган [8, 12]. Стенка печеночных синусоидов не содержит перицитов и представлена на большом протяжении лишь эндотелием, который обладает способностью к фагоцитированию эритроцитов [7].

В качестве вещества, оптимизирующего антиоксидантную активность печени, нами была выбрана аскорбиновая кислота, которая является донором электронов и обладает способностью инактивировать различные свободные радикалы [11].

Цель исследования – оценить влияние направленного транспорта аскорбиновой кислоты в печень на ее антиоксидантную активность после кровопотери.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на белых беспородных крысах массой 240−280 г. Гипоксию вызывали кровопусканием через катетер [13]. 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 эритроцитарные контейнеры с аскорбиновой кислотой (контрольная группа), 4-я группа – животные с кровопотерей, получавшие АК путем направленного транспорта. В каждой группе по 12 животных. Получение эритроцитарных контейнеров (ЭК) с АК производилось методом гипотонического лизиса в модификации Т.П. Генинг [1]. ЭК с АК вводили внутривенно в дозах 25, 50 и 100 мг/кг однократно через 10 мин после кровопотери.

Исследовали активность каталазы в печени крыс [4]. Процентное содержание альбумина в сыворотке крови определяли методом электрофореза на геле агарозы на аппарате Paragon фирмы Bechmen (США). Оценку электрофореграмм проводили с помощью денситометра. Статистическая обработка полученных данных производилась по t-критерию Стьюдента. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$. Экспериментальные исследования проводились с соблюдением биоэтических правил.

Результаты исследования и их обсуждение

Активность каталазы в печени, как показывают полученные данные (табл. 1), достоверно возросла через 6 ч на 59,38 %, через 24 ч – на 87,5 %.

Таблица 1

Влияние адресной доставки АК в печень в дозировках 25, 50, 100 мг/кг на активность каталазы в печени белых крыс (M ± m, n = 12)

№ п/п	Условия эксперимента	Активность каталазы в печени белых крыс (ммоль/с/г ткани)		
1.	Интактные животные	3,2 ± 1,07		
2.	6 ч после кровопотери	5,1 ± 0,66*		
3.	24 ч после кровопотери	6,0 ± 0,45*		
Использованные дозы аскорбиновой кислоты для коррекции кровопотери		25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг
4.	Контроль	6,1 ± 0,3*	6,2 ± 0,2*	6,1 ± 0,1*
5.	Направленный транспорт (6 ч)	6,2 ± 0,1*^	6,1 ± 0,1*^	5,9 ± 0,1*^
6.	Направленный транспорт (24 ч)	5,3 ± 0,2*^	5,1 ± 0,2*^	5,8 ± 0,2*

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

Во внеклеточной среде активность антиоксидантных защитных ферментов мала, но тем не менее плазма обладает мощным антиоксидантным потенциалом, который проявляют альбумин, иммуноглобулины, церулоплазмин, фракции α_2- и β-глобулинов и, в меньшей степени, трансферрин, гаптоглобин и сывороточная супероксиддисмутаза [6]. Ключевое место среди белков плазмы принадлежит альбумину, который несет основную антиоксидантную функцию в плазме крови [2].

Содержание альбуминов в сыворотке крови на обоих сроках исследования после кровопотери оставалось в пределах нормы (табл. 2).

Нами установлено, что при однократном введении АК в эритроцитарных носителях животным после кровопотери в дозе 25 мг/кг через 6 ч происходит достоверное повышение активности каталазы по сравнению с животными с кровопотерей на 21,57 %, а по сравнению с интактными животными на 90,63 %. Через 24 ч после кровопотери

активность каталазы в печени крыс достоверно снизилась по сравнению с ее активностью у животных с кровопотерей на 11,67%, а по сравнению с активностью у интактных крыс осталась повышенной на 65,63%.

При введении АК после кровопотери в эритроцитарных носителях в дозе 50 мг/кг активность каталазы через 6 ч достоверно повышается на 19,61%, а через 24 ч, наоборот, достоверно снижается на 15% по сравнению с уровнем активности каталазы у животных с кровопотерей. Относительно показателей интактных животных активность каталазы остается повышенной через 6 ч в 1,91 раза, а через 24 ч в 1,59 раз.

При введении АК в эритроцитарных контейнерах животным в дозе 100 мг/кг после кровопотери уровень активности каталазы через 6 ч достоверно повышается на 15,89%, а через 24 ч остается таким же, как у животных с кровопотерей. По сравнению с ее активностью у интактных животных у экспериментальных животных ее активность достоверно повышается через 6 ч на 84,38%, а через 24 ч на 81,25%.

Таким образом, однократное введение АК интактным животным в дозе 100 мг/кг и через 6 ч, и через 24 ч после кровопотери сохраняет повышенный уровень активности каталазы.

Таблица 2

Влияние адресной доставки АК в печень в дозировках 25, 50, 100 мг/кг на процентное содержание альбуминов (%) в сыворотке крови белых крыс ($M \pm m$, $n = 12$)

№ п/п	Условия эксперимента	Содержание альбуминов в сыворотке крови белых крыс (%)		
1.	Интактные животные	47,53 ± 4,50		
2.	6 ч после кровопотери	52,24 ± 6,71		
3.	24 ч после кровопотери	49,96 ± 6,82		
Использованные дозы аскорбиновой кислоты для коррекции кровопотери		25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг
4.	Контроль	49,29 ± 2,02	47,79 ± 5,84	56,24 ± 1,95*
5.	Направленный транспорт (6 ч)	49,30 ± 1,51	46,53 ± 3,24	59,83 ± 3,43*^
6.	Направленный транспорт (24 ч)	49,34 ± 3,57	46,93 ± 1,04	56,81 ± 2,56*^

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

Исследование показало (табл. 2), что введение АК интактным животным в дозе 25 мг/кг после включения в ЭК (контроль) не вызывает достоверного изменения процентного содержания альбуминов по сравнению с их уровнем в сыворотке интактных крыс.

Процентное содержание альбуминов через 6 и 24 ч после кровопотери при введении АК не отличалось от их содержания у интактных животных. По сравнению с данными животных с кровопотерей содержание альбуминов и через 6 ч, и через 24 ч осталось на том же уровне.

Таким образом, однократное введение АК в дозе 25 мг/кг после кровопотери сохраняет процентное содержание альбуминов на уровне показателей интактных животных.

При введении АК интактным животным в дозе 50 мг/кг после предварительного включения ее в ЭК процентное содержание альбуминов не изменяется по сравнению с их содержанием у интактных животных.

Введение АК в дозе 50 мг/кг ни через 6 ч, ни через 24 ч не вызывает достоверного изменения содержания альбуминов как по сравнению с интактными животными, так и по сравнению с данными животных с кровопотерей.

Введение АК интактным животным в дозе 100 мг/кг путем направленного транспорта в печень вызывает достоверное изменение содержания альбуминов в сыворотке крови крыс в сторону повышения с 47,53 ± 4,4 до 56,24 ± 1,95%, что составляет 118,33% по сравнению с группой интактных животных.

При введении АК животным после кровопотери содержание альбуминов через 6 ч достоверно повысилось на 14,53% (с 52,24 ± 6,71 до 59,83 ± 3,43%), а через 24 ч на 13,71% (с 49,96 ± 6,82 до 56,81 ± 2,56%) по сравнению с животными с кровопотерей. По сравнению с интактными животными содержание альбуминов тоже достоверно повысилось на 25,88%, а через 24 ч на 19,52%.

Выводы

1. Однократное введение АК в эритроцитарных носителях в диапазоне всех изученных доз и на всех изученных сроках сохраняет повышенный уровень активности каталазы в печени, установившийся при кровопотере.

2. Введение АК в эритроцитарных носителях в дозах 25 и 50 мг/кг нормализует содержание альбуминов в сыворотке крови, а в высоких дозах (100 мг/кг) их содержание значимо повышается, как по сравнению с группой интактных животных, так и по сравнению с группами животных с кровопотерей.

3. Таким образом, использование аутологичных эритроцитов для адресной доставки в печень аскорбиновой кислоты повышает пул эндогенной антиоксидантной защиты.

Список литературы

1. Генинг Т.П. Эритроциты млекопитающих в направленном транспорте биологически активных веществ. – Ульяновск: УлГУ, 1996.

2. Грызунов, Ю.А. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. – М.: ГОЭТАР, 2005. – С. 5–38.

3. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И. Антиоксидантная активность сыворотки крови // Вестник РАМН. – 1999. – № 2. – С. 15–21.

4. Медицинские лабораторные технологии: справочник / под ред. А.И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1999. – Т.2. – 656 с. с ил.

5. Осипова Н.А., Эделева Н.В., Якубовская Р.И. Окислительный стресс при критических состояниях и его коррекция // Общая реаниматология. – 2008. – Т. IV. № 2. – С. 98–102.

6. Пахомова Ю.В., Ефремов А.В., Мичурина С.В. Антиоксидантная активность плазмы крови в остром периоде после общей управляемой гипертермии// Паллиативная медицина и реабилитация. – 2006. – № 2. – С. 28.

7. Поленов С.А. Основы микроциркуляции // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2008. – Т.7, № 1. – С. 5–19.

8. Провоторов В.М., Иванова Г.А. Роль эритроцитов в системе направленного транспорта различных фармакологических средств// Клиническая медицина. – 2009. – № 9. – С. 4–8.

9. Тугушева Ф.А., Зубина И.М., Митрофанова О.В. Оксидативный стресс и хроническая болезнь почек // Нефрология. – 2007. – Т. 11. № 3. – С. 29–47.

10. Шанин Ю.Н., Шанин В.Ю., Зиновьев Е.В. Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведения). – СПб: ЭЛБИ, 2003. – 128 с.

11. Шатилов А.В., Богданова О.Г., Коробов А.В. Роль антиоксидантов в организме в норме и при патологии // Ветеринарная патология. – 2007. – № 2. – С. 207–211.

12. Hamidi M., Tajerzadeh H. Carrier erythrocytes: an overview // J. Drug Delivery. – 2003. – Vol. 10(1). – P. 9–20.

13. 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. Gening T.P. Eritrotsity mlekopitayushchikh v napravlennom transporte biologicheski aktivnykh veshchestv [Mammalian erythrocytes in directed transport of biologically active substances]. Ul'yanovsk, UlGU, 1996. 224 p.

2. Gryzunov, Yu. A. Al'bumin syvorotki krovi v klinicheskoy meditsine [Serum albumin in clinical medicine]. M.: GOETAR, 2005, pp. 5–38.

3. Klebanov G.I., Teselkin Yu.O., Babenkova I. *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 1999, no. 2, pp. 15–21.

4. Karpischenko A.I. Meditsinskie laboratornye tekhnologii: (spravochnik) [Medical laboratory technologies: reference book]. St. Petersburg, Intermedika Publ., 1999. 656p.

5. Osipova N.A., Edeleva N.V., Yakubovskaya R.I. *Obshchaya reanimatologiya-General Intensive Care*, 2008, no. 2 (IV), pp. 98–102.

6. Pakhomova Yu.V., Efremov A.V., Michurina S.V. *Palliativnaya meditsina i reabilitatsiya – Palliative medicine and rehabilitation*, 2006, no. 2, pp. 28.

7. Polenov S.A. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya – Regional blood flow and microcirculation*, 2008, no.1 (7), pp. 5–19.

8. Provotorov V.M., Ivanova G.A. *Klinicheskaya meditsina- Clinical medicine*, 2009, no. 9, pp. 4–8.

9. Tugusheva F.A., Zubina I.M., Mitrofanova O.V. *Nefrologiya-Nephrology*, 2007, no. 3, pp. 29–47.

10. Shanin Yu.N., Shanin V.Yu., Zinov'ev E.V. Antioksidantnaya terapiya v klinicheskoy praktike (teoreticheskoe obosnovanie i strategiya provedeniya) [Antioxidant therapy in clinical practice (the theoretical basis and the strategy)] St. Petersburg: ELBI Publ., 2003. 128 p.

11. Shatilov A.V., Bogdanova O.G., Korobov A.V. *Veterinarnaya patologiya* // *Veterinary Pathology*. – 2007. – № 2. – P. 207–211.

12. Hamidi M., Tajerzadeh H. Carrier erythrocytes: an overview // J. Drug Delivery. 2003. Vol. 10(1). pp. 9–20.

13. 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:

Каталымов Л.Л., д.б.н., профессор кафедры анатомии, физиологии и гигиены человека и животных, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск;

Любин Н.А., д.б.н., профессор, зав. кафедрой морфологии, физиологии и патологии животных, ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 18.03.2014.