

ГІПЕРОКСІЯ ТА ХІМІЧНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ЕРИТРОЦИТАРНИХ МЕМБРАН

В. В. Мацинін

Відділ гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Вивчення стану біологічних мембран у зв'язку з дією кисню під високим тиском (ПТК) є одним з важливих шляхів для з'ясування механізму токсичної дії кисню. Факт ушкодження еритроцитів внаслідок дії гіпероксії неодноразово підтверджувався у дослідях *in vivo* та *in vitro*. Не виключено, що більш чутливими до дії ПТК могли виявитись інші біологічні мембрани. Проте еритроцити залишались найбільш зручним об'єктом досліджень. І це цілком виправдано, оскільки момент і ступінь зруйнування еритроцитарних мембран можна відносно легко і достатньо об'єктивно зареєструвати за змінами інтенсивності зафарблення середовища, що їх оточує, відповідно до концентрації звільненого з клітин гемоглобіну.

В літературі описано гемоліз у препаратах крові щурів за умов Є-гіповітамінозу після двогодинної інкубації еритроцитів у апараті Варбурга [21], що на думку авторів пов'язане з недостатнім гальмуванням утворення перекисів. Передбачався [13] розвиток гемолізу у людей, які дихали киснем під тиском 0,5 ат протягом 48 год. У спостереженнях за водолазами [11], які зазнавали дії кисню під тиском 1,8 ат, відзначено підвищення осмотичної проникності еритроцитів. Автори особливо увагу звертають на протиокислювальну систему у клітинах, вільний відновлений глутатіон, SH-групи мембрани клітини, вітамін Є. Ноел [20] спостерігав зниження аеробного гліколізу в еритроцитах крові кроликів внаслідок 40-хвилинної дії кисню під тиском 7 ат. Мічел та ін. [19] відзначали зниження життєвої ємкості легень у 2 з 6 піддослідних, що дихали киснем під тиском 418 мм рт. ст. протягом 168 год. У роботі [16] робиться висновок, що відповідальними за гіпероксичний гемоліз є перекислення ліпідів мембран або строми клітин. Подібні результати одержані і в інших дослідженнях [17, 18], де був відзначений гемоліз еритроцитів у людей і тварин після дії гіпероксії. Капална [12] спостерігав максимальний гемолітичний ефект від перекису водню, менший—від гідроперекисів ліпідів. Провідним фактором у механізмі ушкоджуючого впливу перекисів і гідроперекисів, на думку автора, є оксидоредукція SH-груп, що призводить до зростання проникності мембран і врешті—до гемолізу. В дослідях [14], де білих щурів утримували в атосфері кисню під тиском 600 торр, спостерігались два піки підвищення аеробного гліколізу. Один з них пов'язують з відносним омолодженням (внаслідок зруйнування старих клітин) червоної крові. Описане також підвищення проникності гісто-гематичних бар'єрів за токсичних режимів ПТК [5]. Джоані та ін. [15] визначали вміст малонового альдегіду у тканинах щурів, яких утримували протягом 3 год при 4,3 ат і висловлюють припущення, що токсичність кисню під тиском для мозку пов'язана з утворенням перекисів ліпідів. Сиротинін [6] наводить дані, що свідчать про вплив ПТК на фізико-хімічні властивості еритроцитів.

Отже, підсумовуючи літературні відомості щодо впливу гіпероксії, можна відзначити, що більшість з них свідчать про виникнення певних змін у структурі та функції біомембран. При цьому головним наслідком дії ПТК є утворення перекисних сполук, окиснення SH-груп та зростання проникності мембран.

Методика досліджень

Досліди проведені на білих щурах лінії Вістар, вагою 180—220 г. Тварин піддавали дії кисню під тиском 5 ат протягом 60—90 хв у камері об'ємом понад 50 л. Зазначений режим, виходячи з наших попередніх досліджень, призводить до розвитку кисневого отруєння.

Зразу ж після декомпресії тварин декапітували, кров збирали в посуд, з охолодженням до 2—4° С фізіологічним розчином, готуючи суміш у співвідношенні 1 : 1000 по аналогії з рекомендаціями [3, 7]. Згадану суміш протягом дослідів зберігали у холодильнику, беручи звідти порції на кожен окремий дослід.

Гемоліз еритроцитів контролювали методом колориметрії на фотоелектроколориметрі, визначаючи величини екстинкції через кожні 30 сек до моменту настання повного гемолізу. З цих величин розраховували ступінь гемолізу еритроцитів у процентному відношенні і швидкість зростання гемолізу, зображаючи їх графічно у вигляді еритрограм [3, 7].

У наших дослідженнях були використані два гемолітики: соляна кислота і сапонін у концентраціях, що відрізнялися від рекомендованих [7, 9]. Так, соляну кислоту застосовували у концентраціях 0,002 і 0,001 М, а сапонін — 0,5 і 0,2 мг%.

Слід підкреслити доцільність зберігання суміші еритроцитів протягом дослідів на холоді з метою забезпечення максимальної збереженості мембрани клітин, але не в термостаті при 24° С, як це рекомендують [3, 7], оскільки, як відомо, інтенсивність ферментативних реакцій зростає з підвищенням температури. Отже, зберігання еритроцитів протягом дослідів при температурі 24° С може призвести до змін ступеня енергізованості біомембран, їх електrolітного складу і проникності.

Результати досліджень та їх обговорення

У відповідності з застосованими концентраціями гемолітиків, всього було проведено чотири серії дослідів: перша і друга — з соляною кислотою, третя і четверта — з сапоніном.

Кислотний гемоліз. На рис. 1, а зображені статистично оброблені еритрограми, одержані з використанням 0,002 н. НСІ. Досить чітко вимальовуються два піки, розділені інтервалом часу в 1 хв (друга і третя хвилини). Причому, площа еритрограми, обмежена пунктирною лінією (дослід), зміщена ліворуч, що свідчить про меншу резистентність еритроцитів від тварин групи «дослід» до дії зазначеного гемолітика.

Використання половинних концентрацій кислотного гемолітика призвело до зміщення піка максимуму екстинкції, пов'язаної з гемолізом еритроцитів, праворуч (рис. 1, б). При цьому еритрограми контрольних і дослідних тварин виявляються практично конгруентними і статистично не відрізняються одна від іншої.

Кінетика гемолізу еритроцитів у цих серіях зображена на рис. 2, а, з якого видно, що зростання у часі значень процента гемолізу еритроцитів у дослідних із застосуванням 0,001 н. НСІ не виявляє різниці між контролем і дослідом.

Аналізуючи графіки кінетики гемолізу першої серії (0,002 н. НСІ), ми порівняли швидкості приросту гемолізу по окремих відрізках кривої груп «контроль» і «дослід» і одержали такі результати. Відношення швидкості зростання гемолізу в контролі до спостережуваної у досліді $\left(\frac{V_k}{V_d}\right)$ у проміжок часу між 0,5 і 1 хв інкубації становило 0,33; у наступні 30-секундні відрізки — 0,65, 0,80, 1,25, 1,48, 1,32 і на 4 хв 1,00. Графічно ці відношення зображені на рис. 2, а. Отже, розвиток гемолізу еритроци-

тів тварин групи «дослід» виникає раніше, ніж у контролі. Це дозволяє зробити висновок про те, що під впливом гіпероксії стійкість еритроцитарних мембран до 0,002 н. соляної кислоти знижується.

Сапоніновий гемоліз. Застосування сапоніну як гемолітика у концентраціях 0,5 та 0,2 мг%, призвело до аналогічних результатів.

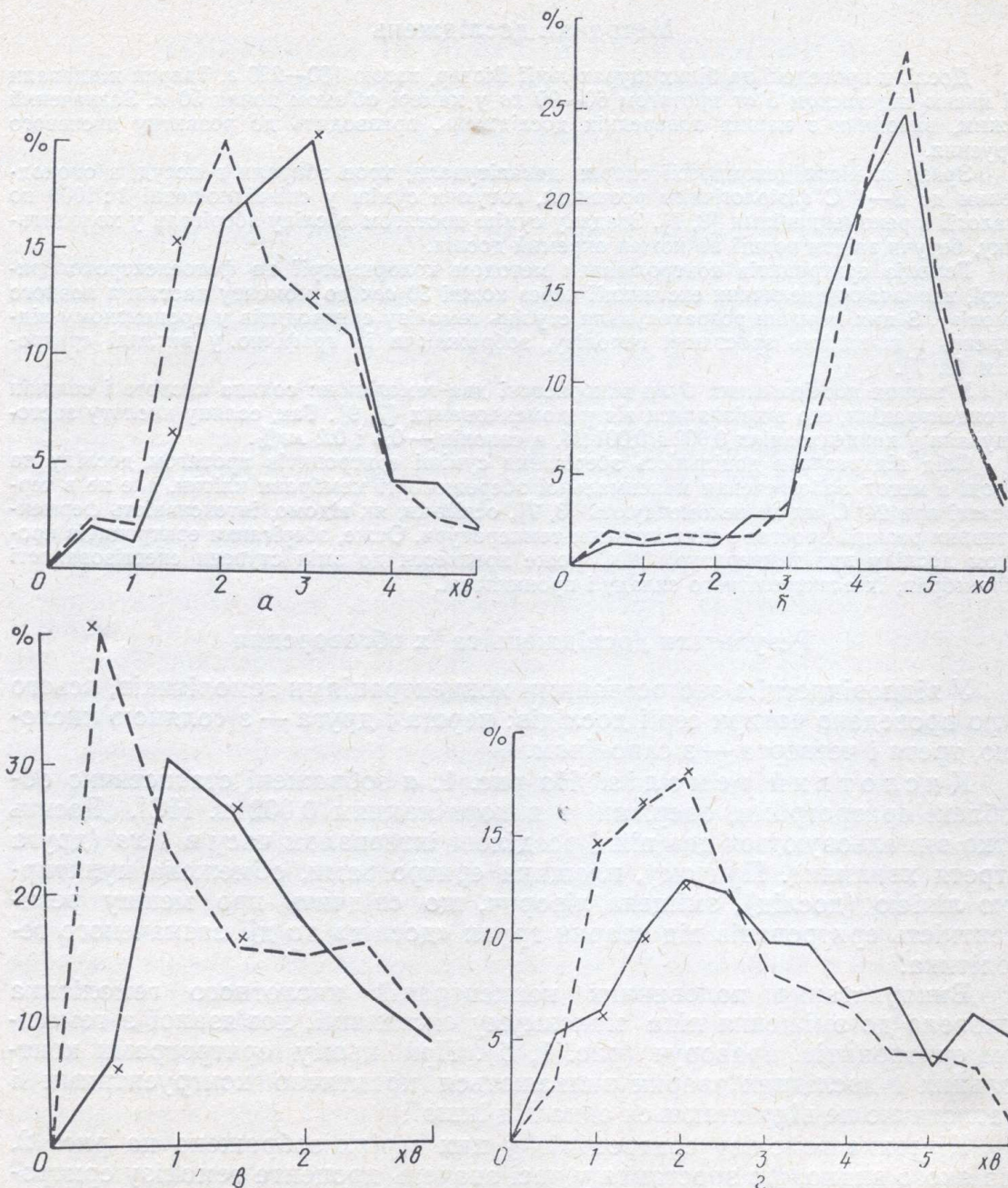


Рис. 1. Еритрограми білих щурів у дослідях з 0,002 н. НСІ (а), 0,001 н. НСІ (б), 0,5 мг%-ним розчином сапоніну (в) та 0,2 мг%-ним розчином сапоніну (г).

Суцільні лінії — контроль, пунктирні — дослід. По горизонталі — час у хв, по вертикалі — процент гемолізу. × — статистично достовірна різниця.

Зруйнування цитоплазматичних мембран еритроцитів тварин, які зазнавали дії гіпероксії, відбувалося раніше, ніж у контролі. Це стосується головним чином дослідів з 0,5 мг%-ним сапоніном. У цій серії також головні відмінності у розвитку гемолізу спостерігались на початку інкубації, протягом 1—2 хв (рис. 1, в).

У дослідях з 0,2 мг%-ним розчином сапоніну еритрограми мають вигляд більш пологий (рис. 1, з) зі зміщенням площини еритрограми тварин, що перенесли дію ПТК, ліворуч. Тобто, гемоліз еритроцитів цих тварин також починається раніше. Залежність цього процесу від концентрації детергента показана на рис. 2, б, де стовпчиками зображені коефіцієнти зростання гемолізу ($\frac{V_K}{V_d}$). Спочатку величини цих коефіцієнтів досить низькі і становлять для дослідів з 0,5 мг%-ним сапоніном

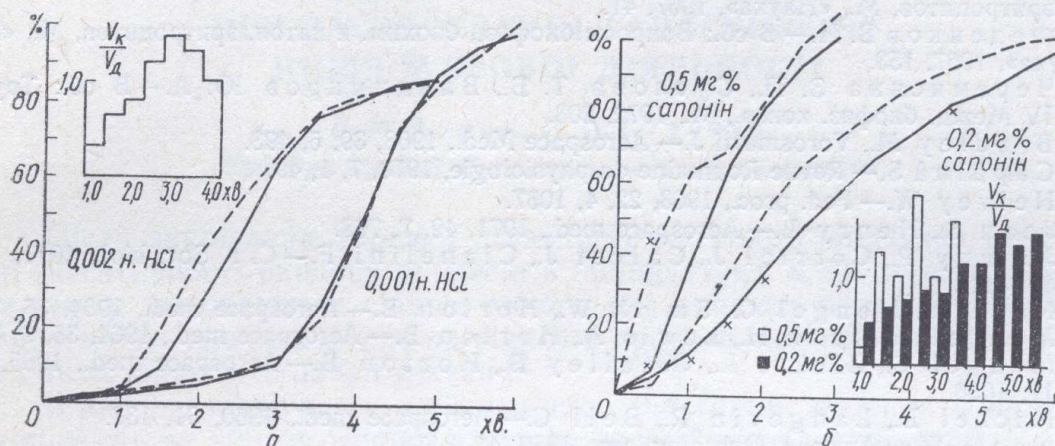


Рис. 2. Кінетика гемолізу еритроцитів під впливом HCl (а) та сапоніну (б).

Стовпчиками позначено приріст гемолізу ($\frac{V_K}{V_d}$) у відповідності з етапами спостережень (хв).

0,19, а з 0,2 мг%-ним — 0,45. Згодом, в міру втягнення в процес гемолізу все більшої кількості інтактних клітин, зазначений коефіцієнт зростає. Причому в останній серії зміни співвідношення процесу зростання гемолізу відбуваються повільніше і рівномірніше.

Механізм дії детергентів на біологічні мембрани залишається не цілком з'ясованим. І тому досить важко виділити провідний фактор у змінах резистентності еритроцитарних мембран, що зазнали дії ПТК, до застосованих гемолітиків. Але, враховуючи наведені раніше літературні відомості і наші власні дані щодо зниження резистентності біомембран, можна відзначити, що попередня дія кисню під високим тиском призводить до прискорення руйнування клітинних мембран різними за природою і механізмом дії хімічними агентами.

Звичайно вважають, що метод хімічних (кислотних) еритрограм придатний для виявлення зрушень у співвідношеннях різних вікових груп еритроцитів і стосується відносно повільних процесів. Але наші спостереження дозволяють застосування його і для вивчення міри ушкодження клітин, що відбулося за короткий час. У цьому зв'язку цікаво навести думку Владимірова [2] щодо ролі процесів перекисного окислення у саморозборці біомембран і висловлювання Гітельсона і Терскова [3, 4, 7] щодо зниження хімічної резистентності старих клітин та зіставити з наслідками досліджень у галузі гіпероксії. Виходить, що гіпероксія відіграє роль «старіючого» фактора, що призводить до розпускання і руйнування біомембран.

Література

1. Антонов В. Ф., Владиміров Ю. А. и др.—Труды IV Межд. биофиз. конгр., М., 1972, 3, 155.
2. Владиміров Ю. А.—Известия АН СССР, сер. биол., 1972, 4, 489.

3. Гительзон И. И., Терсков И. А.—Эритрограммы, как метод клинич. исслед. крови. Красноярск, 1959.
4. Гительзон И. И., Терсков И. А.—В сб.: Вопросы биофиз., биохим. и патол. эритроцитов, М., «Наука», 1967, 48.
5. Кобулия Н. С., Гедымин Л. Е., Черняховский Ф. Р., Архипова О. П.—Экспер. хирургия и анестезиол., 1972, 2, 31.
6. Сиротинин Н. Н.—В сб.: Патол. физиол. экстремальных сост., М., «Медицина», 1973, 36.
7. Терсков И. А., Гительзон И. И.—Биофизика, 1957, 11, 2, 259.
8. Терсков И. А., Гительзон И. И.—В сб.: Вопросы биофиз., биохим. и патол. эритроцитов, М., «Наука», 1967, 41.
9. Феденков В. И.—В сб.: Вопросы биофиз., биохим. и патол. эритроцитов, М., «Наука», 1967, 153.
10. Черемисина З. П., Сулова Т. Б., Владимиров Ю. А.—В сб.: Труды IV Межд. биофиз. конгр., М., 1972, 203.
11. Bradley M., Vorosmarti J.—Aerospace Med., 1968, 39, 5, 493.
12. Căpâlnă S.—Revue Roumaine de physiologie, 1970, 7, 1, 49.
13. Helvey W.—Fed. proc., 1963, 22, 4, 1057.
14. Jean S., Henry L.—Aerospace med., 1971, 42, 7, 768.
15. Joanny P., Corriol J., Calcet J., Cianellini F.—C. r. Soc. biol., 1971, 165, 6, 1341.
16. Kann H., Mengel C., Smith W., Horton B.—Aerospace med., 1964, 35, 840.
17. Mengel C., Kann H., Lewis A., Horton B.—Aerospace med., 1964, 35, 9, 857.
18. Mengel C., Zirkle L., O'Malley B., Horton B.—Aerospace med., 1965, 36, 11, 1036.
19. Michel E., Langevin R., Bell C.—Aerospace med., 1960, 31, 138.
20. Noell W.—Amer. J. Ophthalmology, 1959, 48, 347.
21. Taylor D., Wisemen R.—Nature, 1962, 196, 4859, 1102.

Надійшла до редакції
30.X 1973 р.

HYPEROXIA AND CHEMICAL RESISTANCE OF ERYTHROCYTIC MEMBRANES

V. V. Matsynin

*Department of Hypoxic States, the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev*

Summary

Albino rats were subjected to the effect of oxygen at a pressure of 5 at. for 60—90 min. They were also decapitated and the gathered blood was studied by the method of chemical erythrograms, muriatic acid and saponin being used as hemolytic agents. A decrease was found in acidic and saponin resistance of erythrocytes in the animals which suffered from hyperoxia. The results obtained are compared with the phenomenon of the biomembranes self-stripping under peroxide oxidation and a decrease in the chemical resistance of erythrocytes with aging. An assumption is advanced on the «aging» effect of hyperoxia.