

УДК 612.273.1/2:612.111.11

В. П. Дударев, Н. Ф. Стародуб

О ВЛИЯНИИ ГИПО- И ГИПЕРОКСИИ НА ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ ГЕМОГЛОБИНА У КРЫС

В осуществлении адекватной доставки кислорода тканями принимают участие многие физиологические системы организма, хотя их частный вклад в транспорт газов далеко не одинаков. Одной из наиболее важных и сложных таких систем является система крови, дыхательная функция которой регулируется не только на клеточном (эритроциты), но и на молекулярном (гемоглобин) уровнях.

Важное значение эритрона в сохранении и поддержании должного уровня P_{O_2} в тканях хорошо проявляется при действии экстремальных факторов, в условиях изменений газовой среды и функционального состояния организма. В процессе эволюционного развития гемоглобин дифференцировался в специфический гетерогенный дыхательный белок с определенными физико-химическими механизмами связывания, транспорта и отдачи кислорода. В условиях измененной газовой среды активность этих механизмов может меняться. Известно, например, что при воздействии гипоксии или гипероксии меняются функциональные свойства гемоглобина, что проявляется, в частности, изменением его сродства к кислороду и рассматривается как адаптационная реакция организма.

Мы изучали возможные качественные изменения фракционного состава гемоглобина и формирование гетерогенной системы гемоглобина крыс, возникающие при изменении парциального давления кислорода в окружающей среде. Учитывая, что красные кровяные клетки проходят сложный путь своего онтогенического развития, в процессе которого меняется фракционный состав гемоглобина, исследования проводились дифференцированно — с гемоглобином эритроцитов периферической крови, костного мозга и селезенки.

Методика исследований

Опыты проведены на белых лабораторных крысах, весом 140—160 г. Первая серия — контроль. Во второй серии животных подвергали воздействию гипоксической гипоксии в барокамере, куда их помещали на 4 ч ежедневно: а) в течение пяти дней на «высоту» от 2000 до 5000 м; б) в течение десяти дней на «высоту» от 2000 до 7000 м; в) в течение пяти дней по 5 ч в герметизированной камере при нормальном атмосферном давлении, где крысы дышали гипоксической смесью, содержащей 10% кислорода и 90% азота, что соответствует высоте 6000 м, но исключается фактор гипобарии. В третьей серии животных подвергали различным режимам гипербарической оксигенации: а) в течение 19 дней, по 1 ч воздействие повышенного давления кислорода в 2 ата и б) 4 ата; в) в течение десяти дней, по 5 ч вдыхание проточной газовой смеси, содержащей 60% кислорода и 40% азота.

Гемоглобин циркулирующих эритроцитов, костного мозга и селезенки получали как описано ранее [7] и фракционировали методом электрофореза в пленке полиакриламидного геля. Количественную обработку электрофореграмм осуществляли на денситометре типа МК-2 «Джойс», статистическую обработку — по [2].

Результаты исследований и их обсуждение

В условиях постановки наших опытов гемоглобин крыс фракционировался на шесть отдельных фракций, количественное содержание которых представлено в табл. 1, из которой видно, что основным компонентом в гетерогенном составе гемоглобина периферической крови и селезенки является третья фракция, в то время как в гемоглобине костного мозга — вторая фракция.

Таблица 1

Изменение соотношения фракций гемоглобина крыс, адаптированных к гипоксии и гипероксии

№ фракции	Контроль	Гипоксия		Гипероксия		
		5000 м	7000 м	2 ата	60 % O ₂ +40 % N ₂	через 14 дней после 2 ата
Периферическая кровь						
1	7,1±0,65	11,8±0,77	13,7±0,66	11,3±0,73	8,9±0,55*	10,9±0,56
2	19,2±0,99	27,3±0,75	27,6±0,96	27,8±1,19	19,4±1,16*	22,9±0,87
3	46,1±1,17	40,3±0,79	37,3±0,43	37,1±1,51	45,9±1,27*	41,7±1,11
4	15,5±0,52	12,5±0,38	13,2±0,72	13,5±0,44*	15,9±0,32*	14,4±0,75*
5	8,2±0,32	6,1±0,42	5,9±0,26	7,9±0,55*	7,9±0,55*	6,9±0,25
6	2,9±0,13	2,0±0,11	2,2±0,13	2,3±0,19*	2,0±0,25	3,2±0,17*
Костный мозг						
1	13,7±0,62	14,5±0,91*	17,1±1,03	14,5±0,13*	12,5±0,86*	13,7±0,81*
2	36,2±1,19	47,2±0,78	44,8±1,17	38,9±1,2*	41,6±0,91	38,7±1,26*
3	22,5±0,70	23,3±1,24*	23,0±0,69*	22,7±2,74*	32,8±1,18	25,8±1,10
4	12,1±0,45	8,5±0,16	8,3±0,39	10,4±0,76*	7,1±0,40	12,1±0,30*
5	8,1±0,31	4,2±0,62	4,7±0,23	6,7±0,55	4,2±0,22	5,1±0,29
6	7,1±0,34	2,3±0,32	2,1±0,09	5,7±0,51	1,8±0,26	4,6±0,30
Селезенка						
1	11,0±0,43	12,6±0,52	14,4±0,69	13,2±0,86*	9,8±0,49*	13,9±0,65
2	30,4±0,70	42,8±1,19	39,6±1,46	37,2±1,28	30,3±0,73*	25,9±1,41
3	36,2±0,50	28,9±0,57	30,9±1,48	30,5±0,94	39,3±0,59	38,9±0,88
4	13,7±0,51	10,5±0,58	9,8±0,44	10,6±0,57	12,0±0,51*	12,5±0,68*
5	5,9±0,33	3,7±0,15	4,1±0,28	6,8±0,41*	6,5±0,24*	6,5±0,50*
6	2,4±0,22	1,5±0,08	1,2±0,10	1,7±0,29*	2,0±0,13*	2,2±0,25*

Примечание. *—статистически недостоверные различия.

В процессе адаптации крыс к гипоксической гипоксии, которая сопровождается, как известно, усилением эритро- и гемопоэза, что в конечном итоге ведет к «омоложению» крови, общей закономерностью в изменении гетерогенной системы гемоглобина периферической крови, костного мозга и селезенки является повышение относительного содержания первой и второй фракций при одновременном снижении содержания четвертой, пятой и шестой фракций (табл. 1). Исследование гемоглобина периферической крови и селезенки показало достоверное уменьшение содержания третьей фракции. Степень выявленных нарушений фракционного состава гемоглобина коррелирует со степенью и продолжительностью действия гипоксии. Так, наибольший сдвиг в количественном соотношении фракций наблюдается у крыс,

адаптирующихся к гипоксии, понижено до 69 мм рт.ст.

При изучении гемоглобина, подвергнутого воздействию гипоксии, также обнаружено изменение соотношения между фракциями гемоглобина. В периферической крови в кислородной среде достоверные изменения в соотношении фракций гемоглобина и селезенки. Изменение соотношения фракций гемоглобина в костном мозге и третьей фракции уменьшается. В гемоглобине костного мозга. Следует отметить, что в процессе адаптации к гипоксии изменяются эритроциты.

Соотношение фракций гемоглобина, из периферической крови

№ фракции	Контроль
1	8,4±
2	19,0±
3	42,8±
4	15,9±
5	10,2±
6	3,7±

Примечание. *—

Повышение давления крови с увеличением количества эритроцитов. Нарушение фракционного состава гемоглобина крови и гемоглобина селезенки в процессе адаптации к гипоксии.

Через 14 дней адаптации (4 ата) количество эритроцитов восстанавливалось, х

Таким образом, в условиях измененной гипоксии гемоглобина не только по [1], но и кроветворности. Количественное содержание фракций гемоглобина в крови и селезенке под воздействием гипоксии от источника выделен

Исходя из этого влияния на гетерогенность гемоглобина факторов, фракционного состава гемоглобина исследовали в условиях более мягких условий

адаптирующихся к гипоксии, когда парциальное давление кислорода понижено до 69 мм рт. ст.

При изучении гетерогенности гемоглобина у животных, подвергающихся воздействию повышенного парциального давления кислорода, также обнаружено нарушение количественного содержания исследуемого белка между отдельными фракциями, зависящее от степени гипербарической оксигенации (табл. 1). У крыс, которых выдерживали в кислородной среде, где P_{O_2} составляло около 1500 мм рт. ст. (2 ата), достоверные изменения выявлены нами в гемоглобине костного мозга и селезенки. Изменения эти состоят в том, что содержание второй и третьей фракций увеличивается, а четвертой, пятой и шестой — уменьшается. В гемоглобине селезенки снижается содержание третьей фракции. Следует отметить, что в периферической крови при этом не обнаруживаются изменения в содержании общего гемоглобина и количества эритроцитов.

Таблица 2

Соотношение фракций гемоглобина, выделенного без применения сульфата аммония, из периферической крови крыс, адаптированных к гипоксии и гипероксии

№ фракции	Контроль	Гипоксия	Гипероксия	
		10 % O_2 +90 % N_2	4 ата	60 % O_2 +40 % N_2
1	8,4±0,36	10,5±0,24	9,2±0,39*	8,5±0,27*
2	19,0±0,59	19,1±0,47*	20,5±0,64*	19,0±0,61*
3	42,8±0,71	34,0±0,67	46,5±0,77	41,6±0,73*
4	15,9±0,45	18,0±0,36	14,0±0,36	17,0±0,43*
5	10,2±0,57	12,8±0,29	7,2±0,40	10,1±0,47*
6	3,7±0,28	4,9±0,19	2,6±0,18	3,6±0,21*

Примечание. *—статистически недостоверные различия.

Повышение давления кислорода до 4 ата сопровождается уменьшением количества эритроцитов и гемоглобина в периферической крови. Нарушение фракционного состава гемоглобина периферической крови и гемоглобинсинтезирующих органов аналогично отмеченному в процессе адаптации животных к гипоксии.

Через 14 дней после последнего сеанса гипербарической оксигенации (4 ата) количественное соотношение фракций гемоглобина восстанавливалось, хотя и не всегда достигало исходного уровня.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что в условиях измененной газовой среды меняется фракционный состав гемоглобина не только периферической крови, что было показано и ранее [1], но и кроветворных органов, т. е. в процессе его биосинтеза. Количественное содержание четвертой — шестой фракций после повторных воздействий гипербарической оксигенации снижается независимо от источника выделения гемоглобина.

Исходя из этого, и с учетом наших предыдущих данных [3] о влиянии на гетерогенную систему гемоглобина различных физико-химических факторов, мы провели ряд исследований, когда для фракционирования использовали гемолизаты, получение и очистку которых проводили без применения сульфата аммония, чем обеспечиваются более мягкие условия выделения гемоглобина [3]. Ввиду ограниченной

возможности данного подхода к получению гемоглобина, эксперименты были проведены только с препаратами периферической крови. Принадлежность фракций гемоглобину контролировали по реакции их с ортотолидином и последующим окрашиванием амидочерным или кумаси.

Результаты представленные в табл. 2 показывают, что при адаптации крыс к нормобарической гипоксии (вариант «в»), достоверно повышается содержание первой и второй, четвертой, пятой и шестой фракций, это несколько отличается от ранее приведенных данных, полученных с применением сульфата аммония. Одновременно с этим содержание третьей фракции снижено. В экспериментах с гипербарической оксигенацией привлекают внимание данные, полученные на гемоглобине крыс, подвергавшихся воздействию повышенного давления кислорода по варианту «б» (4 ата), что наиболее четко проявляется в повышении уровня третьей фракции. Вместе с тем, количество гемоглобина в четвертой, пятой и шестой фракциях ниже, чем у интактных животных. У крыс, которые подвергались менее жесткому режиму гипербарической оксигенации, не было обнаружено статистически достоверных изменений в гетерогенной системе гемоглобина.

Изложенные результаты исследований свидетельствуют о том, что содержание кислорода, вернее, его парциальное давление в среде обитания оказывает существенное влияние на фракционный состав гемоглобина не только в периферической крови, но и в органах гемопоэза. Количество третьей, основной фракции гемоглобина периферической крови увеличивается под влиянием гипероксии и уменьшается при адаптации их к гипоксии. Для четвертой, пятой и шестой фракции в данном случае присуща обратная зависимость.

Ранее сообщалось [3, 4], что количественное соотношение между отдельными фракциями гемоглобина может зависеть от стадии развития используемой популяции красных кровяных клеток и условий выделения гемоглобина. В пользу такого заключения свидетельствуют и результаты, приведенные в данной работе. Содержание четвертой — шестой фракций в гемоглобине, полученном из эритроцитов разными методами, оказалось неодинаковым. Причем, оно снижено, когда для выделения гемоглобина применяли сульфат аммония. По-видимому, этим можно объяснить меньшее возрастание количественного содержания гемоглобина четвертой, пятой и шестой фракций в некоторых наших опытах с адаптацией к гипоксии.

Наблюдаемая перестройка фракционного состава гемоглобина в каждом конкретном случае отражает, по меньшей мере, два основных процесса, затрагивающих состав популяций эритроцитов и интенсивность биосинтеза той или иной разновидности изучаемого дыхательного белка. Первой реакцией является сдвиг динамического равновесия клеточных популяций эритроцитов, что приводит к изменению количественных характеристик гетерогенной системы гемоглобина ввиду того, что интенсивность синтеза его отдельных фракций различна по ходу формирования эритроцита [4, 7]. Развитие гипоксического состояния формирования эритроцитов приводит в конечном итоге к ускоренному созреванию эритробластов. Появление в циркулирующей крови незрелых форм эритроцитов и обуславливает повышенное содержание в крови последних трех фракций гемоглобина [3].

В условиях гипероксии, когда не исключена возможность токсического действия кислорода, поступление эритроцитов в периферическую кровь наоборот, задерживается, в связи с чем в кроветворных органах

увеличивается количество глобине превалирует присущ активно функцией четко выраженное измому, более усиленный лее полно в функционизма.

Следует иметь в между отдельными фрсутствие в клетке ря (глутатион, углеводы, сложные комплексы и данным, значительно. Важно отметить, что е го сказывается на кол подвижных фракций, этим его функциональни последних, медлен

Возможно, кроме ромолекулы гемоглоб отношение фракций и виях гипо- и гипероксии

В заключение нес кономерность в изме под влиянием гипоксии [5] и фенилгидразиро патологии в области при многих патологич родного режима орга реакций организма с

1. В пленке поли ется на шесть фракц рых различно в гемо ской крови.

2. В процессе ад первой — второй фря снижается.

3. После повторн изменения в гетерог избыточного давлени на. Более выраженн мозга. Общая тенден ции и понижении со

1. Дударев В. П. Роль ге учные труды Киргосме.
2. Плохинский Н. А. Биол
3. Стародуб Н. Ф. Изуч 39, № 4, с. 757—761.
4. Стародуб Н. Ф. Онтог бина.— Усп. современ.

увеличивается количество зрелых клеток. В выделенном из них гемоглобине превалирует третья фракция, наибольший уровень которой присущ активно функционирующим эритроцитам [4]. Длительное и четко выраженное изменение газовой среды должно повлечь, по-видимому, более усиленный синтез тех форм гемоглобина, которые наиболее полно в функциональном отношении отвечают состоянию организма.

Следует иметь в виду, что на перераспределение гемоглобина между отдельными фракциями оказывает существенное влияние присутствие в клетке ряда низкомолекулярных органических веществ (глутатион, углеводы, фосфаты), с которыми гемоглобин образует сложные комплексы и содержание которых, согласно литературным данным, значительно изменяется в условиях гипоксии и гипероксии. Важно отметить, что если комплексообразование гемоглобина больше всего сказывается на количественном содержании первых двух, наиболее подвижных фракций, то стадия зрелости эритроцита и связанная с этим его функциональная активность больше сказывается на содержании последних, медленно мигрирующих фракций.

Возможно, кроме этого, что конформационные превращения макромолекулы гемоглобина оказывают влияние на количественное соотношение фракций и их электрофоретическую подвижность в условиях гипо- и гипероксии.

В заключение необходимо отметить, что обнаруженная нами закономерность в изменении фракционного состава гемоглобина крыс под влиянием гипоксии аналогична наблюдаемой при лучевой болезни [5] и фенилгидразированной анемии [3, 5, 6], а также других видах патологии в области гематологии. Это свидетельствует о том, что при многих патологических процессах, связанных с нарушением кислородного режима организма, реализуется единый комплекс ответных реакций организма со стороны гетерогенной системы гемоглобина.

Выводы

1. В пленке полиакриламидного геля гемоглобин крыс разделяется на шесть фракций, количественное содержание каждой из которых различно в гемоглобине костного мозга, селезенки и периферической крови.

2. В процессе адаптации к гипероксии относительное содержание первой — второй фракций повышается, а четвертой, пятой и шестой — снижается.

3. После повторных воздействий повышенного давления кислорода изменения в гетерогенной системе гемоглобина зависят от величины избыточного давления кислорода и источника выделения гемоглобина. Более выраженные изменения отмечены в гемоглобине костного мозга. Общая тенденция состоит в возрастании уровня второй фракции и понижении содержания медленно мигрирующих фракций.

Литература

1. Дударев В. П. Роль гемоглобина в адаптации к гипоксии и гипероксии. — В кн.: Научные труды Киргосмедин-та. Фрунзе, 1971, 68, с. 36—45.
2. Плохинский Н. А. Биометрия. — М., 1970. — 210 с.
3. Стародуб Н. Ф. Изучение свойств фракций гемоглобина крыс. — Биохимия, 1974, 39, № 4, с. 757—761.
4. Стародуб Н. Ф. Онтогенез красной кровяной клетки и гетерогенная система гемоглобина. — Усп. современ. биол., 1976, 81, № 2, с. 244—256.

5. Стародуб Н. Ф., Рекун Н. М., Шурьян И. М. Радиационное повреждение гемоглобина.— Киев: Наук. думка, 1976.—127 с.
6. Шурьян И. М., Стародуб Н. Ф., Грицак А. Н. Гетерогенность гемоглобина анемичных крыс.— Бюл. эксперим. биол. мед., 1976, 82, № 11, с. 1328—1330.
7. Stein S., Cherian M. G., Mazur A. Preparation and properties of six rat hemoglobins.— J. Biol. Chem., 1971, 246, N 17, p. 5287—5293.

Отдел гипоксических состояний
Института физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
14.V 1978 г.

УДК 612.67.13

В. С. П.

V. P. Dudarev, N. F. Starodub

EFFECT OF HYPO- AND HYPEROXIA ON FRACTION COMPOSITION OF HEMOGLOBIN IN RATS

Summary

Rat hemoglobin isolated from erythrocytes of marrow, spleen and peripheral blood during electrophoresis was divided into 6 fractions in the polyacrylamide gel film. In the process of adaptation to hyperoxia a relative content of 1-2 fractions increased, and that of 4-6 fractions decreased. After the repeated actions of the elevated oxygen pressure the hemoglobin fractional composition changed depending on the value of the excess oxygen pressure and on the source of hemoglobin isolation. The most pronounced changes with a tendency to decrease the content of slowly migrating fractions are found in marrow hemoglobin.

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

О МЕХАНИЗМАХ СОПРОТИВ. ЗАДНЕЙ КО ОБЪЕМА

Одним из механизмов артериального давления являются реакции органов, опосредованные ловляющие сдвиги со [11, 14, 17, 19]. Поскольку одним из важных гемососудов задней конечности циркулирующей крови бета-адренорецепторов.

Опыты проведены на 64 (0,5 г/кг) и применения гепатодинамически изолировали динамической изоляции органа места их прикрепления к тазовую полость и вычленили седалищный нерв при этом ных сосудов задней конечности экстракорпорального венозного гана постоянным объемом крови из него. При этом увеличилась емкость органа, а уменьшение

Перфузионное, венозное, в измерительном цилиндре режущем приборе Н-327/5. Следовательно изменения сосудистого сопротивления, а сдвиги венозного оттока находящегося в сосудистом опытов составляет для конечности на 10 и 20%, исходные делали методом разведения артерии со скоростью 0,5 мл крови поддерживали на уровне

Реакции пре- и посткапители и после блокады (30 мин). Блокаду производили за 15 мин в магистральную артерию пропранолола. В ряде опытов сократительной способности сцинтиграфии вводили Во всех опытах давление 10 мм рт. ст., так как извест