

7. Кокунин В. А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн.— 1975.— 47, № 6.— С. 776—790.
8. Лукаш А. И., Внуков В. В. Внеэритроцитарный гемоглобин и железосодержащие продукты деструкции гемоглобина — система усиления токсического эффекта гипероксии // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 5.— С. 616—618.
9. Осипов А. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Усп. биол. химии.— 1990.— 31.— С. 180—208.
10. Петровский Б. В., Ефунг С. Н., Демуров Е. А., Родионов В. В. Гипербарическая оксигенация и сердечно-сосудистая система.— М.: Наука, 1987.— 325 с.
11. Шестаков В. А., Бойчевская Н. О., Шерстнев М. П. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода // Вопр. мед. химии.— 1979.— № 2.— С. 132—137.
12. Gutteridge J. M. C., Richmond R., Halliwell B. Oxygen free radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein caeruloplasmin // FEBS Lett.— 1980.— 112, N 2.— P. 269—272.
13. Lange S. B., Josphe D. D., Lec C. et al. Changes in the permeability of the blood-brain barrier under hyperbaric oxygen // Congr. Univ. Aberdeen, IX.— 1977.— P. 173—179.

Науч.-исслед. ин-т биологии
Ростов. ун-та М-ва высш.
и сред. спец. образования РСФСР

Материал поступил
в редакцию 29.12.90

УДК 616—001.12+085.356+616.153.1—0929

О. В. Ковалева, И. А. Никишкин, Н. И. Распопова, В. И. Козыро

Влияние метаболитов на активность ферментов, обеспечивающих стабильность мембран эритроцитов при декомпрессионной болезни в эксперименте

Изучено влияние сукцината Na, тиамин и рибофлавина на серийный осмотический гемолиз эритроцитов, ферменты пентозофосфатного пути обмена углеводов и глутатионредуктазу при декомпрессионной болезни. Показано, что применявшиеся дозы метаболитов оказывали отрицательное влияние на мембранную стойкость эритроцитов.

Введение

До настоящего времени не выяснен вопрос, влияет ли кислород непосредственно на образование газовых пузырьков в тканях или снижает резистентность организма, определяемую уровнем обменных процессов по отношению к венозной газовой эмболии [1, 2, 4]. Некоторые естественные метаболиты — интермедиаты ЦТК (соли ди- и трикарбоновых кислот, витамины-коферменты) в определенном соотношении при введении в организм могут явиться необходимым препаратом, способствующим повышению работоспособности акванавтов, а также активации детоксикационных механизмов в ответ на накопление избыточного количества кислорода в тканях. Они могут служить источником энергии, субстратом для синтеза углеводов, аминокислот и липидов. По направленности действия на глюконеогенез восстановленные интермедиаты ЦТК можно отнести к синергистам глюкокортикоидных гормонов. Способность, например, янтарной кислоты (ЯК) к восстановлению НАДФ может быть использована для усиления детоксикации в качестве стимулятора работоспособности, особенно в период восстановления после выполнения работы [3].

Цель работы — выяснить, влияет ли сукцинат на изменения стабильности эритроцитарных мембран и активности ферментов пентозо-

© О. В. КОВАЛЕВА, И. А. НИКИШКИН, Н. И. РАСПОПОВА, В. И. КОЗЫРО, 1991

ISSN 0201-8489. Физиол. журн. 1991. Т. 37, № 4

8*

115

фосфатного пути (ПФП) обмена углеводов, возникающие при декомпрессии. Исходя из вышеизложенного, мы провели опыты по изучению влияния одновременного введения аммония янтарнокислого (АмЯ) и витаминов, участвующих в сукцинатдегидрогеназной реакции, на отдельные звенья метаболизма в клетках красной крови при декомпрессионной болезни.

Методика

Опыты проведены на крысах-самцах линии Вистар стадного разведения в возрасте 6—8 мес массой 200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животные были распределены на четыре группы: контрольную и три опытные, каждая группа состояла из 20 животных и подвергалась декомпрессионным воздействиям. В течение месяца до эксперимента и интервалом в 2 сут животным разных групп внутрибрюшинно (за исключением последних суток перед опытом) вводили такие растворы: контрольной — физиологический раствор (0,25 мл), I опытной — раствор АмЯ (20 мг/кг) в 0,25 мл физиологического раствора, II опытной — раствор АмЯ (в той же дозе) в комплексе с тиаминном (витамин В₁, 0,05 мг/кг) в 0,25 мл физиологического раствора; III опытной — раствор АмЯ и тиамина в тех же дозах в комплексе с рибофлавином (витамин В₂, 0,15 мг/кг) в 0,25 мл физиологического раствора. После окончания курса введения препаратов животных контрольной и опытных групп помещали в барокамеру и создавали модель декомпрессионной болезни со следующим режимом: *p* 0,64 МПа в течение 2 ч, компрессия — 46 мин, декомпрессия — 2 мин. После извлечения из барокамеры животных декапитировали, кровь собирали в пробирки, содержащие гепарин, после чего в образцах определяли серийный осмотический гемолиз [6], в гемолитических фракциях эритроцитов разного возраста активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГД) и глутатионредуктазы (ГР) [5,8].

Результаты и их обсуждение

Результаты влияния метаболитов на серийный осмотический гемолиз при создании модели декомпрессионной болезни у крыс представлены в табл. 1. Следует отметить, что усиление гемолитического процесса наблюдалось в первых трех фракциях, содержащих старые эритроциты. Введение АмЯ в комплексе с витамином В₁ приводило к достоверному увеличению объема 1-й и 3-й фракций, а введение всего комплекса — к увеличению объема 2-й и 3-й фракций. В 4-й фракции, содержащей зрелые эритроциты, не обнаружено достоверных изменений при сохраняющейся тенденции к увеличению ее объема у животных всех опытных групп. Фракции 5-я и 6-я, содержащие молодые эритроциты, при введении АмЯ не изменяли свой объем. Введения АмЯ в комплексе с витамином В₁ вызывало достоверное уменьшение объема 6-й

Таблица 1. Относительное изменение серийного гемолиза эритроцитов крыс на модели декомпрессионной болезни с предварительным внутрибрюшинным введением метаболитов ($M \pm m$, $n=20$), % гемолиза

Фракция	Физиологический раствор	Аммоний янтарнокислый	<i>P</i>	Аммоний янтарнокислый и витамин В ₁	<i>P</i>	Аммоний янтарнокислый и витамины В ₁ и В ₂	<i>P</i>
1-я	0,52±0,05	0,73±0,06	<0,01	0,63±0,06	>0,1	0,59±0,04	>0,1
2-я	0,68±0,11	0,92±0,08	<0,1	0,81±0,07	>0,1	0,91±0,04	<0,05
3-я	7,98±0,97	14,21±1,98	<0,01	10,72±0,83	<0,05	15,90±0,93	<0,001
4-я	51,91±2,25	51,17±1,34	>0,1	55,34±0,81	>0,1	55,76±1,23	>0,1
5-я	30,83±3,40	27,43±2,92	>0,1	28,72±1,53	>0,1	21,41±1,73	<0,02
6-я	5,19±0,46	4,18±0,36	<0,1	3,79±0,18	<0,01	4,09±0,29	<0,05

фракции, а введение всего комплекса (АмЯ+В₁+В₂) — уменьшение объема 5-й и 6-й фракций (на 27 и 21 % соответственно).

В табл. 2 представлены основные критерии, используемые для анализа изменения гемолитического процесса, предложенные Suess и соавт. [7]. Показано, что введение метаболитов приводит к увеличению хрупкости клеточной мембраны эритроцитов. Возрастает концентрация раствора, в котором (в опыте раньше, чем в контроле) происходит гемолиз 90 % клеточной популяции эритроцитов. Возрастает также концентрация раствора, в котором осуществляется гемолиз 50 % клеток, иными словами «средняя клеточная хрупкость» увеличивается. Ширина кривой гемолиза уменьшается (95 % клеточной популяции эритроцитов разрушилось у опытных групп животных в меньшем диапазоне концентрации), максимальное гемолитическое приращение возрастает. На основании анализа приведенных результатов можно заключить, что введение только одного АмЯ или АмЯ в комплексе с витаминами в используемых дозах приводит к усилению гемолиза эритроцитов, что может быть вызвано изменением проницаемости их мембран для субстратов в ответ на неадекватную декомпрессию.

Наблюдаемое усиление гемолиза эритроцитов, вероятно, вызвано фактором гипербарии. Однако при подборе «оптимальной» дозы субстрата ЯК ее действие может иметь и обратный характер.

Для изучения механизмов нарушения гемолиза популяции зрелых эритроцитов при действии гипербарии и неадекватной декомпрессии мы считали целесообразным исследовать активность Г-6ФДГ, 6-ФГД и ГР — ферментов, ответственных на различных этапах метаболизма за устойчивость мембран эритроцитов к различным повреждающим воздействиям. Из табл. 3 видно, что введение препаратов во всех случаях вызывало разнонаправленные изменения активности ферментов дегидрирования пентоз и ГР. При незначительной тенденции к снижению активности Г-6ФДГ при введении АмЯ наблюдалось ее достоверное повышение в 4-й фракции при добавлении тиамина и понижение в 3-й после введения всего комплекса. Применение комплекса АмЯ и В₁, В₂ вызывало снижение активности дегидрирования глюкозо-6-фосфата в 5-й гемолитической фракции. Изменения активности 6-ФГД носили однонаправленный характер, причем ее снижение, наблюдаемое в 10%-ном гемолизате, вероятно, осуществлялось за счет клеток, относящихся к популяции зрелых и молодых эритроцитов, циркулирующих в кровяном русле. Характерно, что активность ГР стабильно повышалась также во фракции молодых эритроцитов у животных всех опытных групп, что указывает на мобилизацию детоксикационных механизмов стабильности мембран за счет внутренних резервов более энергообеспеченных, по сравнению со старыми, молодых клеток. Изменение активности Г-6ФДГ и 6-ФГД, определяющих начальные этапы ПФП обмена углеводов при изучавшихся воздействиях, под-

Таблица 2. Изменение показателей, характеризующих гемолитический процесс у крыс, на модели декомпрессионной болезни с предварительным внутрибрюшинным введением метаболитов

Показатель	Физиологический раствор	Аммоний янтарнокислый	Аммоний янтарнокислый и витамин В ₁	Аммоний янтарнокислый и витамины В ₁ , В ₂
Концентрация раствора, в котором происходит гемолиз				
90 % клеток	0,325	0,333	0,337	0,340
50 % клеток	0,390	0,413	0,413	0,420
Ширина кривой гемолиза	0,250	0,180	0,156	0,180
Максимальное гемолитическое приращение	51,91	51,17	55,34	55,76

Таблица 3. Изменение активности ферментов дегидрирования пентоз в гемолитических фракциях эритроцитов крыс на модели декомпрессионной болезни с предварительным введением метаболитов ($M \pm m$), $\Delta E_{620} \cdot g^{-1} Hb \cdot min^{-1}$

Вариант опыта	Фракция				
	3-я	4-я	5-я	6-я	10 % гемо- лизата
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа					
Физиологический раствор	24,20 $\pm$ 1,16	24,0 $\pm$ 1,12	25,06 $\pm$ 0,98	30,14 $\pm$ 1,54	23,19 $\pm$ 0,97
Аммоний янтарнокис- лый	22,53 $\pm$ 1,12 $P > 0,1$	23,48 $\pm$ 1,01 $P > 0,1$	24,14 $\pm$ 1,07 $P > 0,1$	26,96 $\pm$ 0,97 $P < 0,1$	22,54 $\pm$ 1,16 $P > 0,1$
Аммоний янтарнокис- лый и витамин В ₁	23,65 $\pm$ 0,71 $P > 0,1$	27,54 $\pm$ 0,86 $P < 0,05$	26,16 $\pm$ 0,76 $P > 0,1$	27,66 $\pm$ 0,85 $P > 0,1$	24,45 $\pm$ 0,88 $P > 0,1$
Аммоний янтарнокис- лый и витамины В ₁ , В ₂	20,80 $\pm$ 0,88 $P = 0,02$	22,62 $\pm$ 1,55 $P > 0,1$	20,92 $\pm$ 0,64 $P < 0,001$	28,09 $\pm$ 0,80 $P > 0,1$	25,51 $\pm$ 1,42 $P > 0,1$
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа					
Физиологический раствор	11,95 $\pm$ 0,54	14,57 $\pm$ 0,37	14,29 $\pm$ 0,82	16,82 $\pm$ 0,80	13,79 $\pm$ 0,65
Аммоний янтарнокис- лый	12,91 $\pm$ 0,54 $P > 0,1$	12,54 $\pm$ 0,58 $P < 0,01$	12,82 $\pm$ 0,33 $P < 0,1$	16,13 $\pm$ 0,78 $P > 0,1$	11,79 $\pm$ 0,48 $P < 0,02$
Аммоний янтарнокис- лый и витамин В ₁	13,49 $\pm$ 0,60 $P > 0,1$	14,81 $\pm$ 1,13 $P > 0,1$	14,16 $\pm$ 0,69 $P > 0,1$	16,93 $\pm$ 0,87 $P > 0,1$	13,91 $\pm$ 0,86 $P > 0,1$
Аммоний янтарнокис- лый и витамины В ₁ , В ₂	11,15 $\pm$ 0,45 $P > 0,1$	11,19 $\pm$ 0,66 $P < 0,001$	12,12 $\pm$ 0,52 $P < 0,05$	15,02 $\pm$ 0,77 $P > 0,1$	12,76 $\pm$ 1,08 $P > 0,1$
Глутатионредуктаза					
Физиологический раствор	5,03 $\pm$ 0,92	4,42 $\pm$ 0,48	4,72 $\pm$ 0,91	3,96 $\pm$ 0,29	4,91 $\pm$ 0,99
Аммоний янтарнокис- лый	1,62 $\pm$ 0,19 $P < 0,01$	3,40 $\pm$ 0,47 $P > 0,1$	5,22 $\pm$ 0,86 $P > 0,1$	9,43 $\pm$ 1,08 $P < 0,001$	3,46 $\pm$ 0,49 $P > 0,1$
Аммоний янтарнокис- лый и витамин В ₁	3,99 $\pm$ 0,70 $P > 0,1$	5,49 $\pm$ 0,66 $P > 0,1$	4,27 $\pm$ 0,95 $P > 0,1$	6,83 $\pm$ 0,90 $P < 0,01$	5,46 $\pm$ 0,71 $P > 0,1$
Аммоний янтарнокис- лый и витамины В ₁ , В ₂	4,16 $\pm$ 0,73 $P > 0,1$	5,43 $\pm$ 0,50 $P > 0,1$	5,61 $\pm$ 1,11 $P > 0,1$	5,79 $\pm$ 0,35 $P < 0,001$	6,50 $\pm$ 0,62 $P > 0,1$

тверждает предположение, что это изменение вызвано субстратным регулированием обмена углеводов с учетом некоферментного влияния рибофлавина, который является коферментом сукцинатдегидрогеназы — одного из ключевых ферментов ЦТК.

Усиление гемолиза эритроцитов после введение аммония янтарнокислого при декомпрессии в отличие от сдвигов у интактных животных, описанных в литературе [3], вероятно, вызвано действием факторов гипербарии. Однако при подборе правильной (оптимальной) дозы субстрата — янтарной кислоты его влияние может иметь и противоположный характер.

O. V. Kovaleva, I. A. Nikishkin, N. I. Raspopova, V. I. Kozyro

EFFECT OF METABOLITES ON THE ACTIVITY OF ENZYMES PROVIDING STABILITY OF ERYTHROCYTIC MEMBRANES IN DECOMPRESSION DISEASE IN THE EXPERIMENT

Metabolites have been studied for their effect (sodium succinate, thiamine, riboflavin) on the pentosophosphate pathways and glutathione reductase. The possible mechanisms

of its influence on the membrane stability of erythrocytes in decompression disease are discussed.

Research Institute of Hematology and Blood
Transfusion, Ministry of Public Health
of the Byelorussian SSR, Minsk

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков Л. К., Юнкин И. П. Влияние повышенного содержания кислорода в дыхательной газовой смеси на процесс декомпрессионного газообразования // Человек и животные в гипербарических условиях. — Л.: Наука. — 1980. — С. 145—147.
2. Зальцман Г. Л., Кучук Г. А., Гургенидзе А. Г. Основы гипербарической физиологии. — Л.: Медицина. — 1979. — 319 с.
3. Кондрашова М. Н. Терапевтическое действие янтарной кислоты. — Пушкино. — 1976. — 234 с.
4. Мухин Е. А., Кептя Э. Б., Николай С. Л. и др. Гипербарическая фармакология. — Кишинев: Штиинца. — 1985. — 117 с.
5. Ellis H. A., Kirkman H. N. A colorimetric method for assay of erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase // Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. — 1961. — 106, № 3. — P. 607—609.
6. Simon E. R., Topper Y. J. Fractionation of human erythrocytes on the basis of their age // Nature. — 1957. — 180. — P. 1211—1212.
7. Suess J., Limentani D., Dameshek W., Dolloff M. J. A quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility // Blood. — 1948. — 3, № 11. — P. 1290—1297.
8. Tillotson J. A., Sauberlich H. E. Effect of riboflavin depletion and repletion on the erythrocyte glutathione reductase in the rat // J. of Natur. — 1971. — 101, № 11. — P. 211—215.

Науч.-исслед. ин-т
гематологии и переливания крови
М-ва здравоохранения БССР, Минск

Материал поступил
в редакцию 29.12.90

УДК 612.575.223:599.323.4

Е. И. Шиманская, Т. П. Шкурат, Л. Г. Медведев, Е. П. Гуськов

Прогнозирование реакции генома соматических клеток водолазов на гипероксическую среду

Анализировали число аберраций хромосом в лимфоцитах периферической крови у добровольцев до и после пребывания в атмосфере чистого кислорода (0,25 МПа, 90 мин). Гипероксическая среда индуцировала увеличение числа аберраций хромосом у всех испытуемых. Анализ лимфоцитов периферической крови профессиональных водолазов до и после погружения при 1,1 МПа воздушной среды в течение 240 мин также выявил значительное превышение уровня спонтанного мутационного процесса после окончания погружения. Как в первом, так и во втором случаях выявлены значительные индивидуальные различия числа аберрантных клеток, индуцированные факторами водолазных спусков. Сравнение результатов анализа числа индуцированных хромосомных аберраций, полученных *in vitro* и после погружения, показали высокое совпадение реакции генома индивидуумов. Предлагаемый метод позволяет *a priori* оценить индивидуальную чувствительность генома к действию факторов водолазного спуска.

Введение

Пребывание человека в ситуациях, которые являются для организма необычными, т. е. эволюционно новыми, как правило, вызывает в организме стрессорную реакцию. Последствия этой реакции можно вы-

© Е. И. ШИМАНСКАЯ, Т. П. ШКУРАТ, Л. Г. МЕДВЕДЕВ, Е. П. ГУСЬКОВ, 1991