

ОСМОТИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У КРЫС С ГИПЕР- И ГИПОКАЛЬЦИЕМИЕЙ

¹Козаев А.В., ¹Джиоев И.Г., ¹Кабоева Б.Н., ¹Батагова Ф.Э.

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Владикавказ, Россия (362019, Владикавказ, ул. Пушкинская, 40), e-mail: inal44@mail.ru

Целью работы было изучение осмотической резистентности мембран эритроцитов в условиях экспериментальных гипер- и гипокальциемиях, и выяснение степени корреляционной связи с состоянием перекисного окисления липидов и антиоксидантной защитой. Исследования проводили на 30-и крысах линии Вистар, на которых гиперкальциемию ($3,12 \pm 0,34$ ммоль/л) создавали ежедневным, в течение двух недель, внутрижелудочным введением витамина D (аквадетрим) в дозе 10 000 МЕ/100г, а модель гипокальциемии ($1,84 \pm 0,15$ ммоль/л) вызывали оперативным удалением паращитовидных желез. Изменение кальциевого гомеостаза в обоих случаях ослабляло осмотическую стойкость мембран эритроцитов, увеличивая процент гемолизированных. Одновременно повышалось содержание гидроперекисей и малонового диальдегида, а активность ферментов антиоксидантной защиты ослаблялась. При этом, отмечалась корреляционная зависимость осмотической стойкости мембран эритроцитов как с перекисным окислением липидов (сильная, положительная при гиперкальциемии и отрицательная при гипокальциемии), так и антиоксидантной системой (аналогичная, но слабая).

Ключевые слова: экспериментальная гипокальциемия, гиперкальциемия, осмотическая стойкость мембран эритроцитов, корреляционные связи, перекисидация липидов, антиоксидантная защита.

OSMOTIC RESISTANCE OF MEMBRANES OF ERYTHROCYTES AT RATS WITH HYPER - AND HIPOCALCAEMIA

¹Kozaev A.V., ¹Dzhioev I.G., ¹Kaboeva B.N., ¹Batagova F.E.

¹North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia (362019, Vladikavkaz, street Pushkinskaya, 40), inal44@mail.ru

The aim of the current work was studying of osmotic resistance of erythrocyte membranes during experimental hyper-and hypocalcaemia, and clarification of correlation degree with lipids peroxidation profiles and antioxidant protection system. Research was conducted on 30 Wistar rats, in which hypercalcaemia ($3,12 \pm 0,34$ mmol/l) was created daily, within two weeks, by intragastric administration of vitamin D (akvadetrym) at a dose of 10 000 ME/100g, and hypocalcaemia model ($1,84 \pm 0,15$ mmol/l) was performed by removal of parathyroid glands. The changes of calcic homeostasis in both cases weakened osmotic firmness of membranes of erythrocytes, increasing percent of the hemolyzed ones. At the same time the content of hydroperoxides and malone dialdehyde raised, and activity of enzymes of antioxidant protection decreased. Thus, we noted correlation dependence of osmotic firmness of erythrocyte membranes both with lipids peroxidation (strong, positive at hypercalcaemia and negative at hypocalcaemia), and antioxidant system (similar, but weak).

Keywords: experimental hypocalcemia, hypercalcemia, osmotic resistance of erythrocyte membranes, correlation, lipid peroxidation, antioxidant protection.

На простой вопрос: «А для чего в живых клетках нужна мембрана?» можно однозначно дать столь же простой ответ: «А без мембраны не было бы не только самой клетки, но и жизни». Действительно, мембрана отделяет одну клетку от других, делает ее самостоятельной, ограждает от внешней среды, разделяет внутриклеточные органоиды на отдельные составляющие, тем самым предупреждая свободное движение воды и растворенных веществ из цитоплазмы в них и обратно. С мембраны начинается транспорт веществ в клетку, генерирование потенциалов действий, контакт одной клетки с другой и много другое. Мембрана поддерживает трансмембранный градиент веществ и разницу

электрического потенциала, а, благодаря наличию на ней многочисленных рецепторов и антигенов, воспринимающих гормоны, медиаторы и другие биологически активные вещества, она способна менять метаболическую активность клетки и обеспечивает проявлений специфических иммунных ответов. Одним словом, без клеточной мембраны нельзя обойтись и изучение ее состояния остается актуальной задачей, особенно при меняющихся условиях окружающей клетки среды и при воздействии различных патогенных факторов.

В исследованиях, проводимых на крысах, с изучением перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при гипер- и гипокальциемиях было показано усиление процесса перекисидации липидов и ослабление антиоксидантной защиты как при повышении, так и снижении уровня кальция в крови [3,4]. Эти данные не противоречат результатам других авторов, отмечающих, что активные формы кислорода вызывают накопление ионов кальция в цитоплазме, стимулируют фосфорилирование белков, а снижение или блокада их антиоксидантами уменьшает эффекты факторов роста клеток, цитокинов, инсулина, паратиринина и витамина D₃ [1,8,9]. Так как процесс окисления липидов оказывает влияние на осмотическую резистентность мембран эритроцитов (как свойство мембран противостоять различным разрушительным воздействиям), мы решили провести соответствующие исследования в условиях различного кальциевого гомеостаза.

Цель настоящей работы было изучение осмотической резистентности мембран эритроцитов в зависимости от концентрации кальция в крови, в частности при экспериментальных гипер- и гипокальциемиях, и выяснение степени корреляционной связи с перекисным окислением липидов и антиоксидантной защитой.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились на 30-и крысах линии Вистар, разделенных на три группы, по десять в каждой: интактные (контроль); с гиперкальциемией, создаваемой путем ежедневного, в течение двух недель, перорального введения витамина D в виде зарегистрированного аптечного препарата «Аквдетрим» (Польша) в дозе 10 000 МЕ/100г, что составляло 1 мл, к которому добавляли столько же водопроводной воды с целью введения препарата без потерь, но, при этом, не создавать водной нагрузки; с гипокальциемией, создаваемой оперативным удалением околощитовидных желез после того, как крысам внутрибрюшинно вводили 0,1-0,15 мл золетила (Zoletil, Франция) и производили воротничкообразный разрез в шейной области, выделяя щитовидную железу, в толще которой по обе стороны от срединной доли находили околощитовидные железы и выжигали их термокаутером.

Во время проведения экспериментов животные находились в лабораторном виварии, имея постоянный доступ к воде и пище, которая соответствовала стандартному рациону

(злаковые, кукуруза, овощи, яйца), освещение было без прямых попаданий солнечных лучей и немного затемнено, то есть приближено к естественному для грызунов. В день опытов за 30-40 минут до их начала вода из клеток убиралась, что позволяло сохранить водный баланс. Содержание животных и постановка на них опытов проводились в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23 августа 2010 года «Об утверждении Правил лабораторной практики».

У всех крыс с гиперкальциемией кровь брали на следующий день после двухнедельного введения аквадетрима, а с удаленными паразитовидными железами – через 4-5 недель после операции (как времени необходимого для развития гипокальциемии), когда отмечалась судорожная готовность как наиболее характерный признак снижения содержания кальция в крови. Забой всех животных осуществлялся после предварительной инъекции зоветила. В крови крыс спектрофотометрически (UNICO 2000, США) определяли содержание общего кальция, основанного на методе Radin, Gramza с помощью эриохрома синего [7] и осмотическую стойкость мембран эритроцитов [5], вносимых в образцы с разным объемным содержанием изотонического и гипертонического растворов хлористого натрия и мочевины. Среди значительного количества методик определения осмотической стойкости эритроцитарных мембран в растворах, где уменьшается содержание хлористого натрия с 0,9%, мы предпочли методику с мочевиной, которая легко проходит через мембраны клеток, и, поскольку она осмотически активна, за ней устремляется вода, приводя к чрезмерной гидратации и, как следствие, разрыву мембраны, чему также способствует и денатурирующее действие мочевины на белки в результате разрушения решетки гидратов и уменьшения стабилизирующего действия, с одновременным ослаблением гидрофобных взаимодействий [2].

О состоянии перекисного окисления липидов судили по накоплению промежуточных, в частности первичных (гидроперекиси в плазме крови) и вторичных (малоновый диальдегид в мембране эритроцитов) липидных радикалов в остатках полиненасыщенных жирных кислот, а об антиоксидантной системе – по активности внутриклеточных ферментов – гемсодержащей каталазы, способной восстанавливать перекись водорода до воды, и супероксиддисмутазы [1]. Показатели перекисного окисления липидов и ферменты антиоксидантной защиты определялись спектрофотометрически по общепринятым методикам [5,7].

Полученные результаты статистически обрабатывались с применением параметрического метода сравнения средних величин, степень достоверности оценивалась по t-критерию Стьюдента, а при сопоставлении двух показателей использовали коэффициент линейной корреляции (r) Пирсона.

Полученные результаты и их обсуждение. Определение содержания общего кальция в плазме крови крыс, ежедневно, в течение двух недель, получавших аквадетрим в дозе 10 000 МЕ/100г, выявило его достоверное ($p<0,01$) повышение с $2,28\pm 0,14$ ммоль/л (контроль) до $3,12\pm 0,34$ ммоль/л, а у крыс с удаленными околощитовидными железами, наоборот, отмечалось достоверное ($p<0,05$) снижение до $1,84\pm 0,15$ ммоль/л.

Изучение осмотической резистентности мембран эритроцитов у крыс интактной, гипер- и гипокальциемических групп показало, что разрушенных эритроцитов в 5,0 мл раствора №1, состоящего из 40,0 мл 1,8% раствора мочевины и 60,0 мл 0,9% хлористого натрия у крыс контрольной группы было $2,48\pm 0,16\%$, у гиперкальциемических – $3,41\pm 0,28\%$ и $3,59\pm 0,33\%$ у гипокальциемических. В образце раствора №2 (45,0 мл мочевины и 55,0 мл хлористого натрия) этот показатель соответственно был $4,75\pm 0,28\%$, $7,08\pm 0,55\%$ и $7,33\pm 0,42\%$. Процент эритроцитов, у которых были разрушены мембраны при их внесении в растворы № 3, 4, 5 и 6, в каждом из которых на 5,0 мл увеличивалось содержание гипертонического раствора мочевины, а хлористого натрия, наоборот, на столько же снижалось, неуклонно увеличивалось, и графически это выглядело как показано на рисунке 1. Раствор №7, в котором абсолютно все внесённые эритроциты разрушались, состоял только из гипертонического раствора мочевины и расчеты строились, исходя из того, что показатели оптической плотности в этом образце принимались за 100,0%, поэтому, конечная точка на графике, независимо от условий опытов, была одна.

Из полученных результатов видно, что особых отличий стойкости эритроцитов, полученных у контрольных и экспериментальных крыс в растворах №1, 2 и 6 нет. Это можно объяснить тем, что эритроциты в первых двух могут еще противостоять разрушающему действию мочевины, а в шестом образце (в результате превалирующего содержания мочевины) процент гемолиза как нормальных, так и ослабленных примерно одинаков. Достоверные отличия ($p<0,05$) начиная с раствора №3, с максимальным ($p<0,01$) отличием в образцах с раствором №4, состоящего из 55,0 мл мочевины и 45,0 мл физраствора, что можно объяснить тем, что эритроциты с нормальной стойкостью мембран способны еще оказывать противодействие мочевины, а с ослабленной резистентностью уже начинают в большей степени разрушаться.

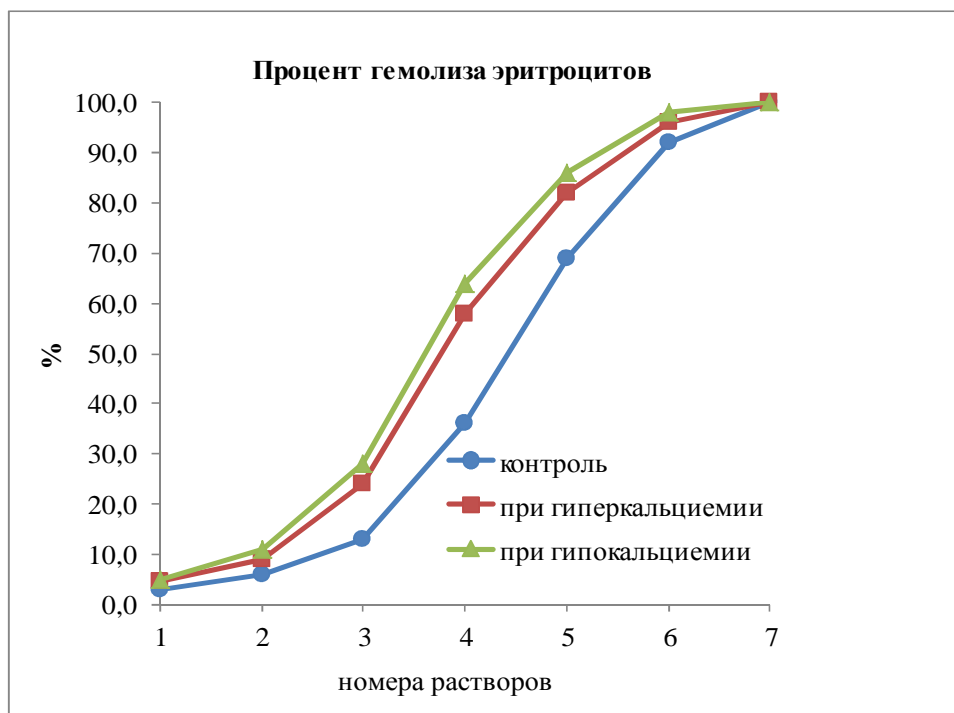


Рис. 1. Осмотическая стойкость мембран эритроцитов у крыс интактных, с гипер-и гипокальциемией по проценту гемолиза

Таким образом, повышение и снижение содержания кальция в плазме крови крыс, вызванные двухнедельным введением аквадетрима и удалением паразитовидных желез, ослабляет осмотическую стойкость мембран эритроцитов, увеличивая процент гемолизированных красных кровяных телец.

Так как в проведенных нами ранее исследованиях [3,4] было показано усиление пероксидации липидов (по повышению содержания гидроперекисей и малонового диальдегида), с одновременным ослаблением антиоксидантной защиты (по активности каталазы и супероксиддисмутазы) в условиях гипер- и гипокальциемии, создаваемые на крысах введением аквадетрима в аналогичной дозе и удалением паразитовидных желез, то в настоящей работе мы не ставили цель повторного подтверждения этого факта. Но, так как изменение осмотической стойкости мембран эритроцитов связано с перекисным окислением липидов и антиокислительной защитой, то мы решили провести корреляционный анализ взаимосвязи осмотической резистентности мембран эритроцитов с этими параметрами, а сравнивать результаты, полученные в разное время не корректно, и для правильной интерпретации корреляционной зависимости необходимо сопоставлять данные по каждому животному. Поэтому, у всех 30-и крыс, задействованных в этом варианте исследований, определяли и осмотическую резистентность мембран эритроцитов, и продукты окисления липидов с активностью антиоксидантных ферментов. Корреляционный анализ проводили сопоставляя результаты при внесении эритроцитов в раствор №4, когда процент

гемолизированных эритроцитов у контрольных крыс составлял $36,6 \pm 1,28\%$, у гиперкальциемических $59,4 \pm 3,15\%$ ($p < 0,01$), а у крыс с удаленными паращитовидными железами – $62,8 \pm 3,84\%$ ($p < 0,01$).

Определение показателей пероксидации липидов выявило достоверное повышение содержания гидроперекисей и малонового диальдегида, с одновременным ослаблением активности ферментов антиоксидантной защиты как у гиперкальциемических, так и гипокальциемических крыс (табл.1).

Таблица 1

Содержание гидроперекисей и малонового диальдегида, активность каталазы и супероксиддисмутазы у крыс интактных и с гипер-и гипокальциемией

Условия опытов на крысах	Стат. показатели	Гидроперекиси (мкмоль/л)	Малоновый диальдегид (мкмоль/л)	Каталаза (10^{-4} МЕ/1г Нб)	Супероксиддисмутаза (ед. ингибир.)
Интактные (контроль, n=10)	M±m	$3,89 \pm 0,35$	$24,65 \pm 2,25$	$6,88 \pm 0,41$	$59,83 \pm 3,66$
Гиперкальциемические (n=10)	M±m p	$8,45 \pm 0,92$ <0,001	$49,81 \pm 5,08$ <0,001	$4,65 \pm 0,51$ <0,001	$40,52 \pm 4,18$ <0,001
Гипокальциемические (n=10)	M±m p	$7,73 \pm 0,84$ <0,001	$44,33 \pm 3,84$ <0,001	$5,05 \pm 0,47$ <0,002	$38,84 \pm 4,47$ <0,001

Расчет корреляционного анализа степени гемолиза эритроцитов и содержания гидроперекисей в плазме крови показал, что у крыс, получавших аквадетрим коэффициент корреляции (r) был равен 0,747 ($p < 0,01$), а у животных с удаленными паращитовидными железами – 0,717 ($p < 0,02$). То есть, отмечалась сильная положительная степень корреляции при гиперкальциемии и такая же, но отрицательная, при гипокальциемии. По отношению к уровню малонового диальдегида степень корреляции была средней и r составлял 0,644 ($p < 0,05$) и 0,678 ($p < 0,05$) соответственно. А то, что корреляционные связи осмотической стойкости мембран эритроцитов оказались более выраженными с содержанием гидроперекисей, очевидно, обусловлено первичностью накопления этих липидных радикалов.

Степень корреляционной связи с активностью ферментов антиоксидантной защиты оказалась слабой: для каталазы $r=0,484$ (положительная при гиперкальциемии) и 0,465 (отрицательная при гипокальциемии); для супероксиддисмутазы – 0,396 и 0,405 соответственно.

Таким образом, ежедневное внутрижелудочное введение крысам витамина D (аквадетрима в дозе 10 000 МЕ/100 г) в течение двух недель, приводящее к повышению содержания кальция в плазме крови, и экспериментальная гипокальциемия, созданная путем удаления паращитовидных желез, ослабляют осмотическую резистентность мембран

эритроцитов, при этом, отмечаются корреляционные зависимости с усилившимся перекисным окислением липидов (сильная, положительная при гиперкальциемии и отрицательная при гипокальциемии) и ослаблением антиоксидантной защитой (слабая, аналогичная).

Список литературы

1. Алехина С.П., Щербатюк Т.Г. Озонотерапия: клинические и экспериментальные аспекты. – Н. Новгород.: Литера, 2003. –240с.
2. Волькенштейн М.В. Биофизика. –М.: Наука, 1988. –592 с.
3. Джигоев И.Г., Козаев А.В., Кабоева Б.Н., Козаев Р.Э. Функционально-морфологическая характеристика почек и состояние антиоксидантной системы у крыс с экспериментальной гипокальциемией // Фундаментальные исследования. –2013. –№7, ч.2. –С.301-304
4. Джигоев И.Г., Козаев А.В., Кабоева Б.Н., Караева Д.А. Влияние экспериментальной гиперкальциемии на показатели крови, перекисное окисление липидов и водовыделительную функцию почек // Современные проблемы науки и образования. –2013. –№6; URL: <http://www.science-education.ru/113-11825>.
5. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. –2003. –Т.II. – 463с.
6. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. –736 с.
7. Рябов С.И., Наточин Ю.В., Бондаренко Б.Б. Диагностика болезней почек / Л.: Медицина, 1979 –254 с.
8. Singh M.1., Sandhir R., Kiran R. Alterations in Ca²⁺ homeostasis in rat erythrocytes with atrazine treatment: positive modulation by vitamin E // Mol Cell Biochem. –2010. –Vol.340 N.1-2. –P.231-8.
9. Terra-Garrán A.1., Proverbio T., Marín R., Proverbio F. Lipid peroxidation and active calcium transport in inside-out vesicles of red blood cells from preeclamptic women // Int J Biochem Cell Biol. –2004. –Vol.36, N.5. –P.806-813.

Рецензенты:

Дзугкоева Ф.С., д.м.н, профессор, заместитель директора Института биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН и Правительства Республики Северная Осетия – Алания, г.Владикавказ.

Брин В.Б., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии Северо-Осетинской государственной медицинской академии, г.Владикавказ.