

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА АКТИВНОСТЬ Na, K-АТФазы ЭРИТРОЦИТОВ И БАЛАНС ИОНОВ НАТРИЯ И КАЛИЯ В ПЛАЗМЕ И ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ДАЛАРГИНА

Саидов М.Б.¹, Газимагомедова М.М.², Кличханов Н.К.¹

¹ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, e-mail: klich-khan@mail.ru;

²ГБОУ ВПО «Дагестанская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Махачкала

Исследована активность Na, K-АТФазы эритроцитов и содержание одновалентных катионов в плазме крови и эритроцитах крыс после снижения температуры тела до 30 °С (умеренная гипотермия) и 20 °С (глубокая гипотермия), а также при введении даларгина. Показано, что при умеренной гипотермии активность Na, K-АТФазы возрастает на 38,3 %, а при глубокой гипотермии на 27,4 % относительно контроля. Внутривенное введение даларгина (100 мкг/кг) за 30 мин до холодного воздействия предотвращает повышение активности Na, K-АТФазы при гипотермии 30 °С, но не при гипотермии 20 °С. Умеренная гипотермия не влияет на содержание ионов Na⁺ и K⁺ в плазме и эритроцитах. После гипотермии 20 °С содержание ионов Na⁺ снижается в плазме и увеличивается в эритроцитах, а содержание K⁺, наоборот, возрастает в плазме и снижается в эритроцитах. Введение даларгина при гипотермии 30 °С не влияет на содержание одновалентных катионов в плазме крови и эритроцитах, а при гипотермии 20 °С не предотвращает нарушение их распределения. Таким образом, защитный эффект даларгина проявляется только при умеренной гипотермии.

Ключевые слова: гипотермия, даларгин, эритроциты, Na, K-АТФаза, ионы натрия, ионы калия.

EFFECT OF HYPOTHERMIA ON ERYTHROCYTE Na, K-ATPase ACTIVITY AND THE BALANCE OF SODIUM AND POTASSIUM IONS IN RAT'S PLASMA AND RED BLOOD CELLS UNDER DALARGIN INJECTION

Saidov M.B.¹, Gazimagomedova M.M.², Klichhanov N.K.¹

¹Dagestan state university, Makhachkala, e-mail: klich-khan@mail.ru;

²Dagestan State Medical Academy, Makhachkala

The activity of erythrocytes Na, K-ATPase and the content of monovalent cations in the plasma and red blood cells of rats after reduction of body temperature to 30 °C (moderate hypothermia) and to 20 °C (deep hypothermia), and injection of dalargin was studied. It is shown that at moderate hypothermia the Na, K-ATPase activity increased by 38.3 %, and with deep hypothermia by 27.4 % as compared to the control. Intraperitoneally dalargin injection (100 µg/kg) 30 min prior to cold exposure prevents the increase of Na, K-ATPase activity at hypothermia 30 °C, but not at hypothermia 20 °C. Moderate hypothermia did not affect on the plasma and erythrocyte sodium and potassium level. After hypothermia 20 °C sodium content in the plasma reduced and within erythrocytes increases and potassium content, on the contrary, increased in plasma and erythrocytes is reduced. At hypothermia 30°C dalargin injection does not affect the content of monovalent cations in plasma and erythrocytes, and at hypothermia 20°C does not prevent the violation of their distribution. Thus, the protective effect of dalargin occurred only at moderate hypothermia.

Keywords: hypothermia, dalargin, erythrocytes, Na, K-ATPase, sodium ions, potassium ions.

Искусственное снижение температуры тела как метод снижения кислородных запросов организма успешно применяется для повышения устойчивости органов и тканей к различным видам стресса, защиты организма от травматических повреждений, восстановления функции органов и тканей после ишемии-реперфузии [3]. Наряду с повышением устойчивости организма к воздействию многих неблагоприятных факторов, гипотермия вызывает ряд нежелательных изменений. При снижении температуры тела происходит нарушение микроциркуляции, обусловленное вазоспазмом и централизацией кровотока, а также повышением вязкости крови [8]. Негативными эффектами гипотермии

являются также смещение прооксидантно-антиоксидантного баланса в сторону избыточной генерации свободных радикалов и возникновение дефицита антиоксидантов [12]. Это в свою очередь, может быть причиной изменения физико-химического состояния эритроцитарных мембран [8] и нарушения работы мембраносвязанных ферментов.

Na, K-АТФаза является интегральным ферментом мембран эритроцитов, участвующим в регуляции ионного гомеостаза красных клеток. Ранее на изолированных мембранах эритроцитов крыс нами было установлено, что глубокая гипотермия (20 °С) снижает активность Na, K-АТФазы [6]. При гипотермии увеличивалось количество связанного с мембранами эритроцитов гемоглобина. Снижение активности Na, K-АТФазы при гипотермии отрицательно коррелировало с количеством связанного с мембранами гемоглобина. В процессе получения белых теней эритроцитов мембрана теряет ряд белков, особенно цитоскелета [5], что может отразиться на активности Na, K-АТФазы. В связи с этим представляет интерес исследование активности Na, K-АТФазы в составе цельных эритроцитов в условиях гипотермии.

Даларгин (Тир-D-Ала-Гли-Фен-Лей-Арг) является синтетическим аналогом нейропептида лей-энкефалина с широким спектром биологической активности. Важным эффектом пептида является антистрессорный, проявляющийся и при гипотермии [7]. Даларгин препятствует развитию стрессорной вазоконстрикции [1]. Нами показано, что предварительное введение даларгина предотвращает активацию процессов перекисного окисления липидов и снижение антиоксидантной защиты эритроцитов [10], а также стабилизирует структурно-функциональное состояние их мембран при умеренной гипотермии у крыс [9]. Учитывая тот факт, что Na, K-АТФаза весьма чувствительна как к составу липидов в микроокружении фермента, так и к их физико-химическому состоянию [13], представляет интерес изучение влияния даларгина на активность Na, K-АТФазы эритроцитов в условиях гипотермии.

Цель работы. Исследовать зависимость активности Na,K-АТФазы эритроцитов и содержания ионов Na^+ и K^+ в плазме крови и эритроцитах крыс от глубины гипотермии, а также возможности коррекции обнаруженных изменений путем введения даларгина.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на самцах беспородных белых крыс массой 180–200 г. Гипотермию вызывали охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная (5 °С) вода. Температуру тела крыс равномерно (0,28 °С/мин) снижали до 30 °С (кратковременная умеренная гипотермия) и 20 °С (глубокая гипотермия). За 30 мин до декапитации (контроль) или за 30 мин до начала снижения температуры тела животным внутрибрюшинно вводили 0,5 мл фармакопейного препарата даларгина в дозе 100 мкг/кг массы. После декапитации

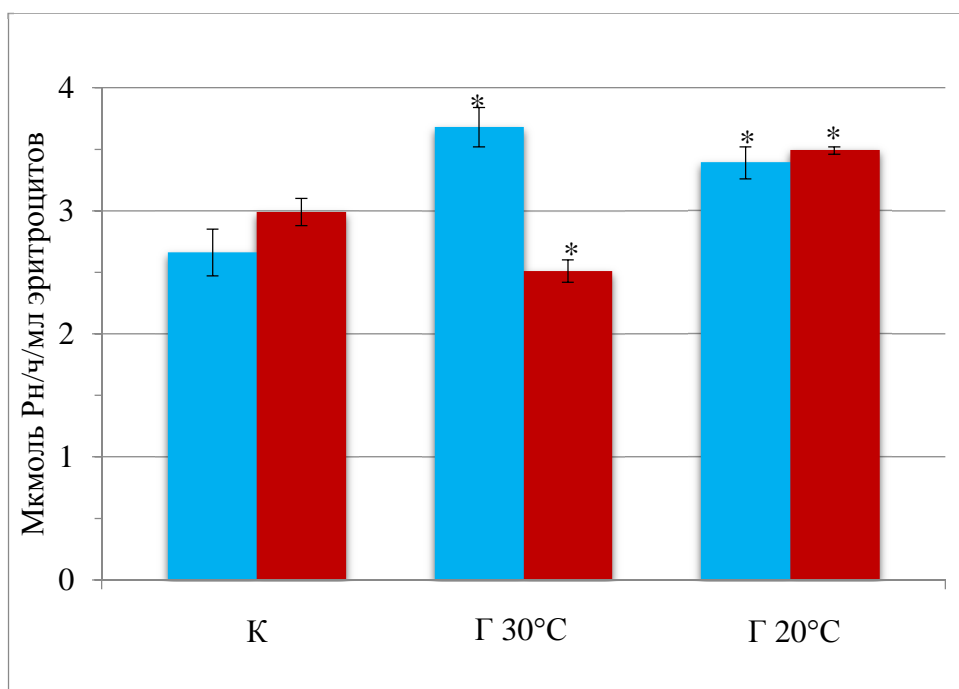
животного собирали кровь в пробирку с гепарином (50 ед/мл). Эритроциты осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин, а затем трижды промывали 0,145 М раствором NaCl, приготовленном на 0,02 М трис-HCl буфере (pH 7,6 при 20 °C).

Активность Na, K-АТФазы в цельных эритроцитах определяли по методу Казёнова А.М. и сотр. [4]. Для образования пор, проницаемых для АТФ, эритроциты обрабатывали твином-20. Преинкубацию цельных эритроцитов с твином-20 проводили в следующих условиях: отмытые эритроциты смешивали с равным объёмом 1 % твина-20, приготовленного на 0,145 М NaCl в 0,02 М трис-HCl буфере, и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Далее взвесь эритроцитов разводили в 4 раза 0,145 М NaCl в 0,02 М трис-HCl буфере без детергента. Для определения активности Na,K-АТФазы 0,2 мл конечной суспензии эритроцитов, обработанных твином-20, вводили в 1 мл инкубационной среды, содержащей (в mM концентрациях) Na⁺ – 100, K⁺ – 10, трис-HCl – 50, АТФ – 3, MgCl₂ – 3, ЭДТА – 1. Инкубацию проводили при 37 °C в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 20 % ТХУ. Активность Na, K-АТФазы рассчитывали по разнице между АТФ-азной активностью в отсутствии и присутствии 0,2м Муабайна. Об активности фермента судили по накоплению в среде инкубации неорганического фосфора и выражали в мкмоль P_n/мл/ч.

Содержание ионов натрия и калия в плазме крови и эритроцитах определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS-1N (CarlZeiss, Германия).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0 и Excel общепринятыми методами вариационной статистики. В таблице результаты представлены в виде средних значений (M) ± стандартная ошибка (m). Для определения статистической значимости полученных результатов были использованы: параметрический t-критерий Стьюдента (t-тест), непараметрический U-критерий Манна – Уитни (U-тест). Достоверно различающимися признавали значения при p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. Острая кратковременная гипотермия 30 °C приводит к повышению активности Na, K-АТФазы на 38 % относительно контроля (баблунок). При глубокой гипотермии активность фермента остается повышенной, хотя несколько снижается относительно умеренной гипотермии. Таким образом, независимо от длительности гипотермии активность Na, K-АТФазы эритроцитов повышается.



Активность Na, K-АТФазы эритроцитов при гипотермии и введении даларгина
■ – без введения даларгина; ■ – на фоне введения даларгина;
 К – контроль; Г30 °С и Г20 °С – гипотермия 30 °С и 20 °С соответственно.
 * – достоверность различий относительно контроля

Ранее на отмытых от гемоглобина мембранах эритроцитов крыс нами было обнаружено снижение активности этого фермента при гипотермии 20 °С [6]. Чем же объяснить такие различия в изменении активности фермента в цельных эритроцитах и в белых телях эритроцитов при гипотермии? Было показано, что последовательное удаление внутриклеточного содержимого и периферических белков мембран эритроцитов крыс – спектрина и актина, сопровождается прогрессивным падением активности Na, K-АТФазы [5]. Авторы показали, что как в гемолизате эритроцитов, так и в растворе смеси солубилизованных белков мембран цитоскелета присутствуют факторы, активирующие Na, K-АТФазу эритроцитарной мембраны и головного мозга крыс, причем степень эффекта зависела от вида мембран и проявляется более выражено в случае мембранных препаратов, лишенных периферических белков. Недавно было показано, что в зависимости от способа получения телей эритроцитов и солубилизованных белков мембранного скелета наблюдается как активирование, так и ингибирование Na, K-АТФазы удаленными с мембраны белками скелета [11]. Авторы пришли к выводу, что в смеси солубилизованных белков мембранного скелета эритроцитов содержится фактор (факторы) Mg^{2+} , Ca^{2+} -зависимо модулирующие активность Na, K-АТФазы. Эти данные позволяют предположить, что внесение ЭДТА на стадии гемолиза эритроцитов и отмыwania мембранных препаратов от

внутриклеточного содержимого способствует удалению из препаратов мембран веществ, оказывающих модулирующее влияние на активность Na, K-АТФазы при гипотермии.

Активность и свойства транспортных АТФаз плазматических мембран в значительной степени определяются структурными особенностями липидного матрикса, в который погружены молекулы фермента [13]. Исследование структурных свойств мембран эритроцитов с помощью флуоресцентного зонда пиренане выявило изменение вязкости липидного бислоя после снижения температуры тела крыс до 30 и 20 °С [9]. В то же время выявлено зависимое от температуры тела снижение микровязкости зон белок-липидных контактов, которые представлены аннулярными липидами, составляющими микроокружение мембранных белков. Введение даларгина предотвращало изменение текучести аннулярных липидов.

В работе Хашимото и коллег [14] было показано, что уменьшение вязкости аннулярных липидов коррелирует с увеличением активности некоторых ферментов, в том числе Mg^{2+} -АТФазы. Кроме того, в той же работе было обнаружено, что добавление докозагексаеновой жирной кислоты уменьшает вязкость аннулярных липидов сильнее, чем вязкость липидов всей мембраны в целом. Эти результаты позволяют предположить, что при гипотермии происходит избирательное накопление фосфолипидов с ненасыщенными жирнокислотными остатками в микроокружении мембранных белков. Это возможно за счет латеральной сегрегации липидов в мембране, а также за счет обмена с липидами и липопротеинами плазмы. При развитии гипотермии ускоряется гормонзависимый липолиз депонированных липидов и существенно возрастает уровень свободных жирных кислот в плазме крови [12]. В ходе снижения температуры тела в спектре жирных кислот плазмы крови крыс возрастает содержание ненасыщенных жирных кислот, что отражает участие последних в мембранных процессах, препятствующих понижению «текучести» липидов мембран клеток. Следует отметить, что введение даларгина предотвращает обусловленную холодным стрессом секрецию гормонов и, соответственно, мобилизацию депонированных липидов [12].

Причиной активации Na, K-АТФазы при гипотермии может быть также увеличение неспецифической проницаемости мембраны эритроцитов для Na^+ . В этих условиях активация АТФазы является необходимым условием для восстановления ионного баланса внутри клетки. Для проверки этого предположения было исследовано содержание ионов натрия и калия в плазме крови и в эритроцитах. Изменение активности Na, K-АТФазы после гипотермии 30 °С не оказало значимого влияния на баланс одновалентных катионов в эритроцитах (таблица). Концентрация ионов Na^+ и K^+ во вне (ex)- и внутриклеточной (in) среде оставалось без изменений. Соответственно, отношение Na_{ex}^+/Na_{in}^+ и K_{ex}^+/K_{in}^+ совпадает

у контрольных и подвергнутых гипотермии 30 °С крыс. После гипотермии 20 °С отношение Na_{ex}^+/Na_{in}^+ значительно снижается, а отношение K_{ex}^+/K_{in}^+ – существенно возрастает. Такое соотношение процессов указывает на повышение проницаемости эритроцитарных мембран для этих ионов.

Баланс одновалентных катионов в плазме крови и эритроцитах крыс в условиях гипотермии и введении даларгина ($M \pm m$; n = 6-8)

Состояние животного	Na ⁺ , моль/л			K ⁺ , моль/л		
	плазма (ex)	эритроцит (in)	ex/in	плазма (ex)	эритроцит (in)	ex/in
Контроль	133,9±1,21	18,6±0,21	7,20	4,76±0,41	91,4±0,63	0,051
Контроль+ даларгин	137,4±1,16	19,2±0,34	7,16	5,10±0,23	92,6±0,83	0,057
Гипотермия 30°С	138,8±1,79	19,2±0,42	7,23	5,53±0,39	90,2±0,91	0,061
Гипотермия 30°С + даларгин	135,1±1,65	18,6±0,64	7,26	4,87±0,29	92,6±0,92	0,052
Гипотермия 20°С	117,9±2,07*	23,7±0,49*	4,97	6,46±0,26*	76,3±1,67*	0,084
Гипотермия 20°С + даларгин	117,7±1,16*	21,6±0,38*	5,45	6,29±0,21*	77,6±0,42*	0,080

* – достоверные ($p < 0,05$) относительно контроля различия.

Возникновение спазма периферических сосудов, в совокупности со сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина влево, приводит к тканевой гипоксии, нестабильности клеточных мембран, повышению травматизации форменных элементов крови [2]. Установлено, что даларгин способен нормализовать периферический сосудистый тонус в условиях стрессорной вазоконстрикции [1]. При этом ведущее значение в механизмах протекторного эффекта даларгина имеет увеличение уровня продукции NO, обусловленное изменением активности NO-синтаз. Можно предположить, что протекторный эффект даларгина на стрессобусловленные изменения гемодинамики имеет место при умеренной гипотермии, но не при глубокой. В определенной мере об этом свидетельствуют данные о влиянии даларгина на содержание одновалентных катионов в плазме крови и эритроцитах при гипотермии. Введение даларгина не оказало влияния на концентрацию одновалентных катионов в плазме и эритроцитах у контрольных животных и у животных с температурой тела 30 °С (таблица). При гипотермии 20 °С даларгин не предотвращает изменение соотношения Na_{ex}^+/Na_{in}^+ и K_{ex}^+/K_{in}^+ . В крови даларгин быстро подвергается протеолизу [7],

с чем, по-видимому, и связано отсутствие защитного эффекта пептида на распределение исследованных катионов вне и внутри эритроцитов после глубокой гипотермии.

Заключение

Острое кратковременное снижение температуры тела приводит к повышению активности Na,K-АТФазы эритроцитов, что является компенсаторной реакцией, направленной на поддержание ионного гомеостаза клетки, нарушенного под действием низкой температуры. После снижения температуры тела до 20 °С активность Na,K-АТФазы остается повышенной, но это не предотвращает нарушение ионного гомеостаза эритроцитов. Эти данные свидетельствуют о нарушении барьерных свойств мембран эритроцитов при глубокой гипотермии. В условиях гипотермии 30 °С введение даларгина полностью предотвращает повышение активности Na,K-АТФазы, вызываемое низкой температурой. Однако при глубокой гипотермии даларгин не предотвращает активацию Na, К-АТФазы, а также изменение ионного состава эритроцитов.

Список литературы

1. Бебякова Н.А., Левицкий С.Н., Шабалина И.А. Влияние структурной модификации молекулы даларгина на вазоактивный эффект пептида при остром стрессе // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 12. – С. 704-707.
2. Глуткин С. В., Зинчук В. В. Кислородсвязующие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное равновесие при холодовом воздействии и последующем отогревании в условиях коррекции // *Журнал ГрГМУ*. – 2009. – № 2. – С. 24-27.
3. Григорьев Е. В., Шукевич Д.Л., Плотников Г.П., Тихонов Н. С. Терапевтическая гипотермия: возможности и перспективы // *Клиническая медицина*. – 2014. – № 9. – С. 9-16.
4. Казённов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. Исследование активности Na, К-АТФазы в эритроцитах млекопитающих // *Биохимия*. – 1984. – Т. 49, вып. 7. – С. 1089-1095.
5. Казеннов А.М., Рустамов Ф.А., Фролова О.В., Шалабодов А.Д. Влияние белков мембранного скелета на частные реакции Na, К-АТФазы эритроцитов млекопитающих // *Журн. эвол. физиол. и биохим.* – 1996. – Т. 32, № 4. – С. 393-401.
6. Кличханов Н. К., Халилов Р. А., Мейланов И. С. Влияние гипотермии на активность Na, К-АТФазы и связывание гемоглобина в мембранах эритроцитов крыс // *Биофизика*, 2001. – Т.46, № 6. – С. 1092-1095.
7. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Пей Ж.-М., Колар Ф., Жанг И., Портниченко А.Г., Ванг Х. Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов // *Вестник РАМН*. – 2012. – № 6. – С. 73-82.

8. Луценко Д. Г., Марченко В. С., Слета И. В. Применение фрактального анализа для комплексной оценки структурно-функционального состояния микрогемодиализации у крыс после общей гипотермии // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 3. – С. 391-393.
9. Саидов М. Б., Халилов Р. А. Структурно-динамические параметры мембран эритроцитов при гипотермии и введении даларгина // Успехи современного естествознания. – 2013, № 11. – С. 73-75.
10. Таджибова Л. Т., Астаева М. Д., Исмаилова Ж. Г., Даудова Т. Н., Кличханов Н. К. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2010. – Т. 150, № 9. – С. 271-274.
11. Шалабодов А.Д., Маслова М.Н., Кыров Д.Н. Влияние солюбилизованных белков мембранного скелета эритроцитов на активность Na, K-АТФазы // Вестник Тюменского гос. университета. Экология и природопользование. – 2015. – Т. 1, №1(1). – С. 172-181.
12. Эмирбеков Э. З., Кличханов Н. К. Свободнорадикальные процессы и состояние мембран при гипотермии. – Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета, 2011. – 200 с.
13. Cornelius F. Cholesterol-dependent interaction of polyunsaturated phospholipids with Na, K-ATPase // Biochemistry. – 2008. – Vol. 47. – P. 1652-1658.
14. Hashimoto M., Hossain M. S., Shimada T., Yamasaki H., Fujii Y., Shido O. Effects of docosahexaenoic acid on annular lipid fluidity of the rat bile canalicular plasma membrane // J. Lipid Res. – 2001. – Vol. 42, № 7. – P. 1160-1168.