

УДК 557.342

**ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ НА КИНЕТИКУ
КИСЛОТНОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ
ПРИ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА**

Саидов М.Б., Бекшоков К.С., Халилов Р.А.

ФГБОУ ВПО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, e-mail: smagras@mail.ru

Исследовано влияние умеренной гипотермии (33–34°C) на кинетику кислотного гемолиза эритроцитов крыс при неполной глобальной ишемии мозга. Непосредственно перед окклюзией сонных артерий температуру тела животного снижали до 33–34°C, обкладывая тело животного целлофановым пакетом с мелкоколотым льдом. Показано, что часовая окклюзия общих сонных артерий приводит к снижению кислотной резистентности и существенному перераспределению популяций эритроцитов, что может свидетельствовать об интенсификации окислительных процессов и снижении активности антиоксидантной системы в мембранах эритроцитов, способствующих их дезорганизации. У ложно оперированных животных достоверно повышается содержание сверхвысокостойких эритроцитов по сравнению с интактной контрольной группой. Предварительное умеренное снижение температуры тела животного перед окклюзией сонных артерий способствует нормализации всех параметров эритрограммы и стабилизации всех популяций эритроцитов в крови, оказывая тем самым протекторный эффект.

Ключевые слова: ишемия, эритроцит, гипотермия, мембрана

**INFLUENCE OF THE MILD HYPOTHERMIA ON KINETICS OF ACID HEMOLYSIS
OF ERYTHROCYTES AT INCOMPLETE GLOBAL ISCHEMIA OF THE BRAIN**

Saidov M.B., Bekshokov K.S., Khalilov R.A.

*Federal state budget educational establishment of higher professional education
«Dagestan State University», Mahachkala, e-mail: smagras@mail.ru*

Here we explore how does mild hypothermia (33–34°C) on the kinetics of acid hemolysis of red blood cells of rats with incomplete global cerebral ischemia. Immediately before occlusion of the carotid arteries the body temperature of the animal was reduced to 33–34°C, to impose the body of the animal bag with finely crushed ice. Occlusion of common carotid arteries for 1 hour leads to the reduction of acid resistance and significant redistribution fractions of erythrocytes. This may indicate an intensification of oxidative processes and reducing the activity of the antioxidant system in erythrocyte membranes, contributing to their disorganization. In blood falsely operated animals significantly increases the content superhigh stability of erythrocytes as compared with intact control group. Preliminary mild decrease in body temperature of the animal prior to occlusion of the carotid arteries contributes to the normalization of all parameters of erythrogramma and stabilization of all populations of red blood cells, thus exerting a protective effect.

Keywords: ischemia, erythrocyte, hypothermia, membrane

К наиболее распространенным заболеваниям зрелого, пожилого, а в последние десятилетия и молодого возраста относятся острые нарушения мозгового кровообращения. Постинсультная инвалидизация занимает первое место среди всех возможных причин утраты трудоспособности, к прежней работе возвращаются лишь около 20% лиц, перенесших инсульт, при этом одна треть больных – люди социально активного возраста [1]. В настоящее время общепризнанно, что процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) играют важнейшую роль в развитии многих патологий, в том числе и при ишемии мозга [2]. Активация свободнорадикальных процессов при ишемии мозга приводит к развитию оксидативного стресса, являющегося одним из универсальных

механизмов повреждения тканей. Это и обуславливает необходимость подробного анализа тех изменений, которые обнаруживаются в крови и эритроцитах при ишемии. Необходимо подчеркнуть, что эритроциты весьма чувствительны к окислительному стрессу вследствие того, что липиды их мембран богаты полиненасыщенными жирными кислотами. Известно, что устойчивость мозга к дефициту кровоснабжения может повышаться при снижении температуры тела [3]. Особенно эффективным является применение мягкой умеренной гипотермии. Механизмы защитного действия гипотермии разнообразны. Они связаны с уменьшением эксайтотоксичности глутамата, ограничением кальциевой перегрузки в очаге ишемии. В связи с этим представляет интерес

исследование влияния умеренной гипотермии на популяционный состав эритроцитов при ишемии.

Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены на белых беспородных лабораторных крысах. Предварительно животных наркотизировали введением тиопентала натрия в расчете 6 мг на 100 г массы тела животного. Зафиксированным животным бритвой убрали шерсть в области шеи и производился вертикальный кожный разрез. Выделяли обе сонные артерии и проводили перевязку сосудов кетгутом, прекращая кровоток по этим сосудам к головному мозгу. Для создания неполной глобальной ишемии сонные артерии зажимали с помощью кетгута и зажимов на 1 час. Контрольную группу животных наркотизировали аналогично опытной группе, производили кожный разрез и выделение сонных артерий без перевязки сосудов (ложная операция). Непосредственно перед окклюзией сонных артерий температуру тела животного снижали до 33–34 °С. Гипотермию вызывали, обкладывая тело животного целлофановым пакетом с мелкоколотым льдом. Температуру тела измеряли ректальным термометром. Отбор крови производился сразу после декапитации. Кровь для исследования собирали в стеклянные пробирки, заранее обработанные гепарином. Эритроциты осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 минут. Затем их трижды отмывали физиологическим раствором. После этого готовили суспензию эритроцитов необходимой концентрации. Принцип метода кислотных эритрограмм заключается в фотометрической регистрации кинетики лизиса эритроцитов под действием соляной кислоты определенной концентрации. Очередность вовлечения эритроцитов в гемолиз позволяет построить гистограмму их распределения по стойкости, которая отражает стойкостную неоднородность эритроцитарной популяции, связанную главным образом с их возрастом [4].

Результаты исследования и их обсуждение

В норме мембрана эритроцита устойчива к окислительному стрессу. Это достигается как за счет структурной организации мембраны, так и за счет наличия в ней липофильных антиоксидантов. Стойкость эритроцитов к кислотному гемолизу является важнейшей величиной, связанной с их физиологическим состоянием и возрастом, а также отражающей состояние мембраны клетки. Результаты, полученные нами при исследовании популяционного состава и гемолитической устойчивости эритроцитов при ишемии и ишемии на фоне умеренной гипотермии, представлены в таблице. Из результатов видно, что в крови ложно оперированных животных наиболее представленной является популяция среднестойких эритроцитов. На их долю приходится около 40% эритроцитов. Максимум гемолиза наступает на 3,2 минуте. Продолжительность гемолиза составляет 16,8 минут.

Состояние ишемии в течение 1 часа характеризуется значительным изменением популяционного состава эритроцитов крови крыс. При этом значительно увеличивается (на 68%) содержание пониженностойких эритроцитов. По сравнению с ложно оперированной группой в 3 раза увеличивается популяция эритроцитов, подвергшихся сферуляционным изменениям. Популяция среднестойких эритроцитов сокращается на 30%. При этом наблюдается незначительный рост (на 16%) популяции высокостойких эритроцитов и на 33% увеличивается доля сверхвысокостойких эритроцитов. Значительные изменения в популяционном

Распределение эритроцитов по группам стойкости к кислотному гемолизу при ишемии и гипотермии (в % к общему числу эритроцитов)

№ п/п	Группа стойкости	Состояние животного		
		контроль (ложная операция)	ишемия 1 час	ишемия + гипотермия 33°С
1	Сферуляционные изменения	3,8	11,9 *p < 0,001	5,6 **p < 0,05
2	Пониженностойкие	16,7	27,2 *p < 0,01	15,2 **p < 0,05
3	Среднестойкие	40,0	27,6 *p < 0,01	41,1 **p < 0,05
4	Повышенностойкие	16,6	16,0	17,3
5	Высокостойкие	6,8	7,9	9,4
6	Сверхвысокостойкие	11,8	15,7	12,6
7	Время выхода основного пика (мин)	3,2	2,8	3,5
8	Продолжительность гемолиза (мин)	16,8	16,3	16,2

Примечания:

* – достоверность по отношению к контролю (ложная операция);

** – достоверность по отношению к ишемии 1 час.

составе эритроцитов при ишемии приводят к незначительному сокращению продолжительности гемолиза и смещению пика эритрограммы влево. Таким образом, обнаруженные нами изменения в популяциях эритроцитов крови при снижении мозгового кровотока свидетельствуют о снижении устойчивости мембран эритроцитов при ишемических состояниях. Снижение кислотной резистентности эритроцитов при исследованных нами состояниях может быть связано с интенсификацией перекисных процессов в мембранах и понижением активности антиокислительной системы. Действительно, показано, что в патогенезе ишемии мозга окислительный стресс, обусловленный гиперпродукцией свободных радикалов и других активных форм кислорода, играет важную роль [5]. Так, обнаружено, что экспериментальная ишемия-реперфузия мозга, моделируемая перевязкой общих сонных артерий у крыс (на фоне тиопенталового наркоза) в течение 1 часа и последующим снятием лигатур в течение 3 часов приводила к выраженной активации процессов ПОЛ и напряжению антиокислительной активности системы глутатиона, нарушениям образования энергии в мозге, а также активацией процессов ПОЛ в крови. Однако при этом исходный уровень и наработка ТБК-активных продуктов в больших полушариях после 1 часа ишемии и 3 часов реперфузии повышается не только в мозге, но и в плазме крови, будучи сниженными в эритроцитах. Исследование свободнорадикальных процессов и активности антиокислительной системы в крови крыс при двусторонней окклюзии сонных артерий показало усиление образования продуктов, связывающихся с тиобарбитуровой кислотой на фоне снижения активности каталазы и глутатионредуктазы [6]. Ишемия мозга – процесс, развивающийся из локальных нарушений кровообращения как комбинация гипоксии, гипогликемии и ацидоза. Закисление среды приводит к высвобождению ионов железа, который в норме связан с белком трансферинном. Однако в условиях закисления среды способность трансферина связывать ионы железа снижается. Присутствие в среде свободных металлов переменной валентности, таких как ионы железа, ускоряет образование гидроксид-радикалов [7]. Они в свою очередь окисляют молекулы липидов, особенно активно атакуя мембранные липиды, которые содержат ненасыщенные двойные связи. Это приводит к образованию таких продуктов перекисного окисления липидов, как малоновый диальдегид. Как следствие, образуются сшивки биополимеров, умень-

шается количество ненасыщенных липидов в микроокружении мембранных белков, снижается каталитическая активность мембранных белков. При ишемических состояниях, возможно, активация процессов перекисного окисления липидов в крови может происходить на фоне дисбаланса окислительно-антиокислительной системы. Таким образом, ишемия способствует снижению кислотной резистентности эритроцитов, что может быть связано с активацией процессов перекисного окисления липидов и снижением антиокислительной активности.

В следующей серии наших экспериментов мы проанализировали влияние умеренной гипотермии на популяционный состав эритроцитов при ишемии. При предварительном снижении температуры тела перед ишемией популяционный состав эритроцитов крови не претерпевает существенных изменений (таблица). При этом в два раза по сравнению с ишемией снижается популяция эритроцитов, подвергшихся сферуляционным изменениям. В то же время по отношению к контролю данная популяция остается повышенной на 47%. Фракция пониженностойких эритроцитов снижается у предварительно гипотермированных животных на 45% по сравнению с ишемией. Процентное содержание среднестойких эритроцитов полностью восстанавливается при использовании умеренной гипотермии. Популяции повышенностойких и сверхвысокостойких эритроцитов при сочетании гипотермии и ишемии восстанавливаются до контрольных значений (незначительное превышение на 4 и 6,7% соответственно), а фракция высокостойких эритроцитов повышена по отношению к контролю на 38%. Время наступления максимума гемолиза при сочетании ишемии с гипотермией составляет 3,5 минут. Продолжительность гемолиза на протяжении всех опытов поддерживалась на уровне 16 минут.

Таким образом, полученные экспериментальные результаты позволяют говорить о том, что умеренная гипотермия способствует нормализации популяционного состава эритроцитов, нарушенного при ишемическом повреждении. Выше было сказано, что при ишемии происходит усиление образования активных форм кислорода и других реакционноспособных метаболитов на фоне снижения антиокислительной активности тканей. Протекторный эффект умеренной гипотермии при ишемии, возможно, связан со снижением при гипотермии потребности тканей в кислороде и уменьшением метаболической активности, тем самым ограничивая ишемические повреждения тканей.

Выводы

1. Часовая окклюзия сонных артерий приводит к снижению кислотной резистентности и существенному перераспределению популяций эритроцитов, что может свидетельствовать об интенсификации окислительных процессов и снижении активности антиоксидантной системы в мембранах эритроцитов, способствующих их дезорганизации.

2. У ложно оперированных животных незначительно меняется популяционный состав эритроцитов, общая продолжительность гемолиза и время выхода основного пика, по сравнению с интактным контролем. В то же время существенно увеличивается процентное содержание сверхвысокой эритроцитов.

3. Предварительное умеренное снижение температуры тела животного перед окклюзией сонных артерий способствует нормализации всех параметров кислотной эритрограммы и сохранению всех популяций эритроцитов в крови, оказывая тем самым протекторный эффект.

Список литературы

1. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т. 34, № 3. – С. 21–34.
2. Канунникова Н.П., Башун Н.З., Радуга Е.Ф., Елганинова М.А., Мойсеенок А.Г. Коррекция нарушений прооксидантно-антиоксидантного баланса и энергетического метаболизма, обусловленных ишемией-реперфузией мозга, при действии средств в метаболической терапии // Мат. 21-съезда физиол. общества им. И.П. Павлова. – Калуга, 2010. – 261 с.
3. Косенко Ю.В. Интенсивность свободнорадикальных процессов в крови крыс с разным латеральным профилем в условиях двусторонней окклюзии сонных артерий // Мат. 21-съезда физиол. общества им. И.П. Павлова. – Калуга, 2010. – 304 с.
4. Леонова В.Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. – Новосибирск: Наука, 1987. – 242 с.
5. Овсепян Л.М., Захарян Г.В., Мелконян М.М., Зазариан А.В., Аганянц М.А. Нейтральные и кислые гликолипиды в головном мозге при ишемии и лечении препаратом ан-

тиоксидантного действия // Патологическая физиология. – 2009. – № 4. – С. 5–8.

6. Суслина З.А., Максимова М.Ю., Кистенев Б.А., Федорова Т.Н. Нейропротекция при ишемическом инсульте: эффективность милдроната // Кардиология, неврология. – М.: ГУ НИИ неврологии РАМН. – 2005. – № 13.

7. van der Worp H.B., Sena E.S., Donnan G.A., Howells D.W., Macleod M.R. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis // Brain. – 2007. – V. 130. – P. 3063–3074.

References

1. Boldyrev A.A. Rol aktivnykh form kisloroda v zhiznedeyatel'nosti neyrona // Uspekhi fiziol. nauk. 2003. T. 34, no. 3. pp. 21–34.
2. Kanunnikova N.P., Bashun N.Z., Raduga E.F., Elganinova M.A., Moyseenok A.G. Korrektsiya narusheniy prooksidantno-antioksidantnogo balansa i energeticheskogo metabolizma, obuslovlennykh ishemiy-reperfuziyey mozga, pri deystvii sredstv v metabolicheskoy terapii // Mat. 21 sezda fiziol. obschestva im. I.P. Pavlova. Kaluga, 2010. 261 p.
3. Kosenko YU.V. Intensivnost svobodnoradikalnykh protsessov v krovi krysa s raznym lateralnym profil'em v usloviyakh Ivustoronney okklyuzii sonnykh arteriy // Mat. 21 sezda fiziol. obschestva im. I.P. Pavlova. Kaluga, 2010. 304 p.
4. Leonova V.G. Analiz eritrotsitarnykh populyatsiy v ontogeneze cheloveka. Novosibirsk: Nauka, 1987. 242 p.
5. Ovsepyan L.M., Zakharyan G.V., Melkonyan M.M., Zazaryan A.V., Aganyants M.A. Neytralnye i kislye glikolipidy v golovnom mozge pri ishemii i lechenii preparatom antioksidantnogo deystviya // Patologicheskaya fiziologiya. 2009. no. 4. pp. 5–8.
6. Suslina Z.A., Maksimova M.YU., Kistenev B.A., Fedorova T.N. Neyroprotektsiya pri ishemicheskom insulte: effektivnost mildronata // Kardiologiya, nevrologiya. M.: GU NII nevrologii RAMN. 2005. no. 13.
7. van der Worp H.B., Sena E.S., Donnan G.A., Howells D.W., Macleod M.R. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis // Brain. 2007. Vol. 130. pp. 3063–3074.

Рецензенты:

Саидов М.З., д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии, ГБОУ ВПО «Дагестанская государственная медицинская академия», г. Махачкала;

Габибов М.М., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой анатомии, физиологии, гистологии, ФГБОУ ВПО «Дагестанский государственный университет», г. Махачкала.

Работа поступила в редакцию 10.04.2015.