Трубачева О.А.¹, Суслова Т.Е.¹, Беляева С.Н.¹, Петрова И.В.²

Влияние супероксид-аниона на тромбоциты и эритроциты периферической крови

¹Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

²Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Россия, Томск)

doi: 10.18411/lj-11-2020-30

idsp: ljjournal-11-2020-30

Аннотация

В настоящем исследовании изучали эффект преинкубации эритроцитов с активными формами кислорода, генерируемыми системой ксантиноксидаза/ксантин, на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов и агрегацию тромбоцитов. Увеличение внутриклеточной концентрации кальция в присутствии кальциевого ионофора A23187 вело к гиперполяризации эритроцитарной мембраны вследствие открывания Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов. Мембранный потенциал эритроцитов был зарегистрирован благодаря измерению pH среды инкубации в присутствии протонофора. Агрегационную активность тромбоцитов исследовали с помощью метода Борна Г. в модификации Габбасова З.А. на двухканальном лазерном анализаторе (220 LA “НПФ Биола”, Россия). В ходе исследования установлено, что супероксид-анион, продуцируемый системой ксантин-ксантиноксидаза, влияет на функциональную активность тромбоцитов, а также участвует в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов и Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов здоровых доноров. Результаты работы могут быть использованы для диагностики и выявления скрытых нарушений внутриклеточного редокс состояния при патологии сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: эритроциты, Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы, активные формы кислорода, агрегация тромбоцитов.

Abstract

In this study, we studied the effect of preincubation of red blood cells with active oxygen forms generated by the xanthine oxidase/xanthine system on the Ca^{2+} -dependent potassium permeability of the red blood cell membrane and platelet aggregation. An increase in intracellular calcium concentration in the presence of calcium ionophore A23187 led to hyperpolarization of the erythrocyte membrane due to the opening of Ca^{2+} -dependent potassium channels. The membrane potential of red blood cells was registered by measuring the pH of the incubation medium in the presence of a protonophore. Platelet aggregation activity was studied using the born method In the modification of Gabbasov Z. A. on a two-channel laser analyzer (220 LA “NPF Biola”, Russia). The study found that the superoxide anion produced by the xanthine-xanthine oxidase system affects the functional activity of platelets, and also participates in the regulation of Ca^{2+} -activated potassium channels and Ca^{2+} -ATPase of red blood cells from healthy donors. The results of this work can be used to diagnose and detect hidden disorders of the intracellular redox state in the pathology of the cardiovascular system. Key words:

Keywords: red blood cells, Ca^{2+} -activated potassium channels, reactive oxygen species, platelet aggregation.

Активные формы кислорода (АФК) в настоящее время рассматриваются в качестве универсальных низкомолекулярных биорегуляторов, оказывающих влияние на широкий спектр физиологических и патологических процессов [1,2]. Их регуляторное значение прослеживается в отношении большинства метаболических

путей, реализующихся на клеточно-тканевом уровне [1,2,3]. Учитывая нелинейность биологического ответа живых систем на действие экзогенных и эндогенных биорадикалов, доза последних может рассматриваться в качестве фактора, лимитирующего их эффект [4,5]. Одним из наиболее значимых АФК является супероксид-анион (O_2^-), продукция которого существенно увеличена при ряде патологических состояний: ишемии, гипоксиях, стрессовых ситуациях, что часто сопровождает жизнь здоровых людей и может приводить к развитию патологий сердечно-сосудистой системы или [6,7]. Известно, что O_2^- образуется в эндотелии сосудов благодаря ксантиноксидазе, обладающей высокой удельной активностью в этих клетках. Свободные радикалы считают элементами патологических процессов при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, а также при многих воспалительных процессах [6,7,8,9,10]. Однако в последнее время АФК рассматриваются в качестве регуляторов внутриклеточных процессов клеток крови. Основной характеристикой функциональной активности тромбоцитов является их способность к агрегации. Установлено, что риск тромбообразования тесно коррелирует с изменением плазматического окислительно-восстановительного статуса [11,12]. Появляется все больше работ, в которых обсуждается механизм включения АФК в регуляцию ионтранспортных систем клетки. Известно ингибирующее влияние супероксид-аниона на Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикулума гладкомышечных клеток сосудов [3,13]. Традиционной моделью для изучения ионного транспорта служат клетки красной крови. Мембрана эритроцитов содержит только Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы, что позволяет проводить исследования на суспензии интактных эритроцитов. Показано, что Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы вносят определенный вклад в деформируемость красных клеток крови [13]. В процессе своего функционирования клетки крови подвергаются действию многих физико-химических факторов, одним из которых являются АФК, постоянно образующиеся в организме. Роль активированных кислородных метаболитов в регуляции агрегационной активности тромбоцитов и Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов недостаточно изучена, в связи, с чем проведение настоящего исследования представляется весьма актуальным.

Цель исследования – изучить роль супероксид-аниона, продуцируемого внеклеточными источниками, на агрегационную способность тромбоцитов и Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров.

Материал и методы. В работе использовалась кровь здоровых добровольцев (50 чел.). Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак. Агрегационную активность тромбоцитов исследовали с помощью метода Борна Г. в модификации Габбасова З.А. на двухканальном лазерном анализаторе (220 LA “НПФ Биол”, Россия) [12]. Для индукции агрегации использовали коллаген в конечной концентрации 2 мг/мл. Оценивали следующие параметры агрегации: степень агрегации по кривой светопропускания и размер агрегата по кривой среднего размера агрегатов. Для исследования Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов был применен метод регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов по изменениям рН среды инкубации в присутствии протонофора, основанный на том, что в этих условиях распределение протонов зависит от мембранного потенциала [13]. Добавление кальциевого ионофора A23187 к суспензии клеток, содержащей хлорид кальция, приводило к выходу ионов калия и развитию гиперполяризационного ответа (ГО) мембраны эритроцитов, что находило свое отражение в изменении рН суспензии. Защелачивание среды инкубации соответствовало гиперполяризации мембраны, а восстановление рН – возвращению мембранного потенциала (МП) к исходному значению. Амплитуда гиперполяризационного ответа и скорость его развития характеризуют Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы, а скорость восстановления мембранного потенциала – активность Ca^{2+} -АТФазы [13]. В качестве продуцента супероксид-аниона использовалась система, включающая ксантин (100 мкМ) и ксантиноксидазу (10

мU/мл). Инкубацию тромбоцитов и эритроцитов с этими агентами проводили в течение 30 минут. Продукцию супероксид-аниона системой ксантин-ксантиноксидаза оценивали спектрофотометрически в бесклеточной среде по степени восстановления цитохрома с при 550 нм. Было выбрано соотношение ксантина и ксантиноксидазы, при котором выделялось от 9- 15,5 мкМ супероксид-аниона. Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 10.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде “среднее значение параметра $\pm$ ошибка среднего” ($X \pm m$). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова-Смирнова. Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы непараметрические критерии. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Для проверки однородности парных или зависимых выборок был использован T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Полученные результаты. Для изучения влияния супероксид-аниона на агрегацию тромбоцитов был применен подход, описанный в литературе, где в качестве источника O_2^- использовалась ксантиноксидазная реакция. Параметры агрегации тромбоцитов здоровых доноров на фоне индуктора коллагена составили $20,337 \pm 8,45$ % степени агрегации по кривой светопропускания и $2,033 \pm 0,46$ отн. ед размера агрегата по кривой среднего размера агрегатов. В условиях прединкубации тромбоцитов с ксантином и ксантиноксидазой наблюдалось значимое снижение степени коллаген-индуцированной агрегации по кривой светопропускания до $17,303 \pm 7,99\%$, а размер агрегата имел тенденцию к снижению по кривой среднего размера агрегатов у здоровых доноров до $1,85 \pm 0,43$ отн. ед. Амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов, подвергнутых прединкубации в присутствии ксантина и ксантиноксидазы в течение 30 мин снижалась до $86,36 \pm 0,76$ %. Кроме того, обнаружено значимое снижение скорости развития гиперполяризационного ответа эритроцитов до $56,39 \pm 1,95\%$. Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов, отражающая активность Ca^{2+} -насоса мембраны эритроцитов, значимо снижалась и оставила $75,74 \pm 2,01\%$. Внутриклеточное редокс состояние регулирует функцию клеток через модуляцию сигнальных путей. Свое действие АФК на клетки крови могут реализовывать различными путями однако важно, чтобы сохранялся баланс в прооксидантных-антиоксидантных системах. Когда генерация АФК происходит в пределах лимитов буферной способности клетки, то свободные радикалы, не только не вредят, но и даже помогают сохранять надлежащую внутриклеточную редокс среду. При излишней же генерации, АФК вызывают клеточную смерть или различные патологические процессы. В организме происходит постоянное изменение баланса между про- и антиоксидантами и от состояния этого равновесия: баланса или дисбаланса зависит развитие многих патологических процессов.

Заключение. В ходе исследования установлено, что супероксид-анион, продуцируемый системой ксантин-ксантиноксидаза, влияет на функциональную активность тромбоцитов, а также участвует в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов и Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов здоровых доноров. Результаты работы могут быть использованы для диагностики и выявления скрытых нарушений внутриклеточного редокс состояния при патологии сердечно-сосудистой системы.

1. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск: БГУ, 2004.
2. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Митрофанов В.Н. Оценка влияния некоторых физических факторов на энергетический метаболизм крови in vitro // Биомедицина. 2013. № 1. С. 103–108.

3. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., и т.д. Газовая сигнализация клетках млекопитающих // Успехи физиологических наук. 2015. Т. 46, № 4. С. 53–73.
4. Реутов. В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты // Успехи физиологических наук. 2007. Т. 38, № 4. С. 39–58.
5. Мартусевич А.А., Перетягин С.П., Мартусевич А.К. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы // Современные технологии в медицине. 2012. №2. С. 128–134.
6. Коган А. Х. Двойное потенцирование ишемической болезни сердца активными формами кислорода и антиоксиданты / Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2002. № 2. С. 3–6.
7. Лебедев В. В. Супероксидная теория патогенеза и терапии иммунных расстройств // Вестник РАМН. 2002. № 4. С. 34–40.8-10
8. Серебрякова В.Н., Трубаева И.А., Кавешников В.С. Нарушения липидного и углеводного обмена в организованной популяции женщин, занятых умственным трудом // Сибирский медицинский журнал. 2014. № 2, Т. 29. С. 79-84.
9. Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshel'skaya O.A. et al. System of matrix metalloproteinases and cytokine in type 2 diabetes and impaired carbohydrate tolerance associated with arterial hypertension. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2014. Т. 156. № 5. С. 635-638.
10. Sill J.C., Proper J.A., Johnson M.E., Uhl C.B., Katusic Z.S. Reactive oxygen species and human platelet GP IIb/IIIa receptor activation. // Free Radic Biol Med. 2009. №.18 (8). P. 613-619.
11. Трубаева О.А., Ситожевский А.В., Петров И.В., и т.д. Влияние активных форм кислорода на коллаген-зависимую агрегацию тромбоцитов у пациентов сахарным диабетом и артериальной гипертензией. Сибирский медицинский журнал. 2011. Т. 26. № 4-2. С. 111-118.
12. Трубаева О.А., Кремёно С.В., Петрова И.В и т.д. Участие активных форм кислорода в регуляции Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов эритроцитов. Бюллетень сибирской медицины. 2009. Т. 8. № 2. С. 56-60.

**Устьянцева Л.С., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Рюмин В.Е., Шакирова К.П.
Становление микробиоценоза и локального иммунитета кишечника детей с
экстремально низкой массой тела, сформировавших бронхолегочную дисплазию**

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и
младенчества» МЗ РФ
(Россия, Екатеринбург)*

doi: 10.18411/lj-11-2020-31

idsp: ljjournal-11-2020-31

Аннотация

Проведено исследование микробиоценоза и локального иммунитета кишечника у 75 глубоко недоношенных детей с экстремально низкой массой тела с бронхолегочной дисплазией в зависимости от срока гестации в динамике постнатального периода. Выявленные изменения доказывают участие условно-патогенной микрофлоры в формировании гуморального иммунитета и подтверждается наличием положительных корреляционных связей условно-патогенной микрофлоры с уровнем sIgA в копрофильтратах в возрасте 1 месяца жизни и содержанием IL-4 в 38-40 недель постконцептуального возраста.

Ключевые слова: бронхолегочная дисплазия, иммунитет, микрофлора кишечника, экстремально низкая масса тела, цитокины

Abstract

The study of microbiocenosis and local immunity of the intestine in 75 extremely premature infants with extremely low birth weight with bronchopulmonary dysplasia in the dynamics of the postnatal period. The revealed changes prove the participation of opportunistic microflora in the formation of humoral immunity and is confirmed by the presence of positive correlations between opportunistic microflora and sIgA level in