УДК 591.111.1.05

DOI: 10.21779/2542-0321-2019-34-4-138–145

М.Б. Саидов, Р.Г. Шейхова

**Популяционный состав эритроцитов крыс при мерказолиловом гипотиреозе
и введении адгезивного фактора Matrix Thyroidea**

*Дагестанский государственный университет; Россия, 367001, Махачкала,
ул. М. Гаджиева, 43а; smagras@mail.ru*

Исследовано влияние экспериментального гипотиреоза, вызванного введением мерказолила в дозе 2,5 мг на 100 г живой массы животного, на динамику изменения популяционного состава крыс. Методика расчета популяций эритроцитов заключается в фотометрической регистрации кинетики лизиса эритроцитов под действием соляной кислоты определенной концентрации. Показано, что экспериментальный гипотиреоз существенно отражается на устойчивых характеристиках мембран и способствует перераспределению популяций эритроцитов. Это выражается в увеличении в крови доли эритроцитов с низкой устойчивостью к кислотному гемолизу и сокращении общей продолжительности гемолиза. Причиной снижения устойчивых характеристик мембран эритроцитов может быть интенсификация окислительных процессов белков и липидов в мембранах. Трехмесячное самовосстановление после перенесенного экспериментального гипотиреоза не приводит к полной нормализации популяционного состава и устойчивых характеристик мембран эритроцитов. Введение адгезивного фактора Matrix Thyroidea животным с перенесенным экспериментальным гипотиреозом способствует полной нормализации процентного содержания популяций и кислотной резистентности эритроцитов. При этом продолжительность гемолиза, время наступления максимума гемолиза и все популяции эритроцитов, определяемые у интактных животных и животных, перенесших экспериментальный гипотиреоз, практически совпадают.

Ключевые слова: *эритроциты, мембраны, гипотиреоз, мерказолил, адгезивный фактор, кислотная резистентность.*

Введение

Доказано, что нарушение процесса кроветворения является одной из сопутствующих патологий гипотиреоза, в основе которого – нарушение клеточного метаболизма и недостаточность кислорода, переносимого эритроцитами, что отражается на морфофункциональных характеристиках красных клеток крови. Морфофункциональные изменения состояния эритроцитов могут охарактеризовать степень выраженности патологического процесса и его природу [1].

Таким образом, можно предположить, что гипотиреозный статус щитовидной железы способен оказать дезорганизующее влияние на устойчивые характеристики мембран и популяционный состав эритроцитов крови при данной патологии.

Любое воздействие на организм сопровождается изменением его гомеостатических параметров. В первую очередь это касается системы крови. Эритроциты реагируют на внешнее воздействие определенными структурно-функциональными перестройками и появлением обратимо и необратимо измененных форм, оценка которых косвенно является критерием, позволяющим судить о функциональном состоянии крови в целом [2].

Из литературы известно, что заболеваемость щитовидной железы в районах Дагестана занимает одно из ведущих мест, достигая в низменной зоне 45 %, в предгорной 53 % и в горной зоне 53,2 % [3]. Данное заболевание широко распространено и не имеет достаточно эффективной терапии, кроме заместительной. Часто встречающейся патологией щитовидной железы остается гипотиреоз – клинический синдром, развивающийся вследствие недостатка тиреоидных гормонов в организме, сопровождающийся снижением их биологического эффекта на тканевом уровне [4].

Известно, что при недостаточном образовании гормонов щитовидной железы снижаются интенсивность энергетических процессов в организме и активность метаболизма в целом, участником которого является кислород, доставляемый эритроцитами. Одним из характерных проявлений гипотиреоза следует считать снижение образования эритропоэтина, контролирующего эритропоэз, что приводит к его качественным и количественным изменениям [5].

Таким образом, нарушения в эритроидном звене системы крови могут усугублять клинические проявления гипотиреоза [6].

Актуальным на сегодняшний день остаётся исследование тканеспецифических биорегуляторов, обнаруженных в различных тканях организма и активно влияющих на такие биологически важные процессы, как адгезия, миграция и дифференцировка клеток. Обеспечивая стабилизацию биологической ткани, тканеспецифические биорегуляторы способствуют нормализации механической прочности мембран клеток и контактов между ними, поддерживая гомеостаз всего организма [7]. На их основе разрабатываются лекарственные препараты нового поколения, действие которых строго тканево-и органоспецифично [8]. Тем не менее, на сегодняшний день в литературе мало сведений о том, как влияет недостаточное выделение гормонов щитовидной железы на систему кроветворения. Исходя из этого, исследования, направленные на изучение популяционного состава крови при гипотиреозе и возможности коррекции обнаруженных изменений в популяционном составе эритроцитов с помощью пептидных биорегуляторов при экспериментальном гипотиреозе, являются актуальными.

Материал и методы

Для экспериментов были использованы крысы-самцы в возрасте 3 месяцев с массой 200–250 г. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы по следующей схеме: 1 группа – контрольная (интактная); 2 группа – животные, у которых был вызван экспериментальный гипотиреоз. Гипотиреоз вызывали в течение 22 дней спаиванием через пипетки мерказолила в дозе 2,5 мг/100 г живой массы, который готовился на 1% крахмальном растворе. Декапитировали животных на 23 день эксперимента; 3 группа – самовосстановление в течение 3 месяцев после экспериментального гипотиреоза; 4 группа – гипотиреоз и приём в течение 30 дней адгезивного фактора Matrix Thyroidea (1–2 капли на крысу) на фоне поддерживающей дозы 1 мг/100 г живой массы мерказолила.

Определение кислотной резистентности проводили по методу Терскова и Гиттельсона [9]. Принцип метода 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. Кровь для анализа собирали в стеклянные пробирки с гепарином и сразу разводили физиологическим рас-

твором приблизительно 1:100. Полученную взвесь эритроцитов можно хранить до анализа при комнатной температуре в течение 3 ч. В термостатируемую кювету при 24 °С с физиологическим раствором малыми порциями при помешивании вводили исследуемую взвесь эритроцитов до получения значений оптической плотности 0.7 ед. В результате этой операции в рабочей кювете создается взвесь эритроцитов стандартной оптической плотности, что соответствует разведению средней «нормальной» крови 1:1000. Из измерительной кюветы отбирается мерной пипеткой 2 мл взвеси эритроцитов. Оставшийся в кювете избыток взвеси тщательно удаляется. В осушенную кювету возвращается из пипетки 2 мл приготовленной взвеси эритроцитов. Таким образом, в кювете оказывается постоянный объем (2 мл) взвеси эритроцитов стандартной оптической плотности (0.7) при стандартной температуре 24 °С. По сигналу отметчика времени гемолиз (0.004 н раствор соляной кислоты) вводили в рабочую кювету, содержащую взвесь эритроцитов, и тщательно перемешивали с ней. Затем в измерительный тракт спектрофотометра переводили кювету со взвесью эритроцитов и гемолизом. Все эти операции, начиная с момента введения гемолизатора, должны быть выполнены не более чем за 30 с. С этого момента начинают регистрацию кинетики реакции. Измерения ведутся до получения 2–3 совпадающих показаний, что свидетельствует о завершении гемолиза. После окончания гемолиза содержимое кюветы промывают физраствором, и установка готова к следующему анализу.

Статистическую обработку проводили по t-критерию Стьюдента, методом малой выборки [10]. Различия считали достоверными при значениях $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования кислотной резистентности и популяционного состава эритроцитов при экспериментальном мерказолиловом гипотиреозе представлены в таблице 1.

Таблица 1. Процентное содержание популяций эритроцитов крови крыс при экспериментальном гипотиреозе и введении адгезивного фактора Matrix Thyroidea

№ п/п	Популяции эритроцитов	Состояние животного			
		Контроль	Гипотиреоз	Самовосстановление после гипотиреоза	Гипотиреоз + Matrix Thyroidea
1	Сферуляция	13,8±0,11	21,2 $p_{1-2} < 0,001$	17,2±0,72 $p_{1-3} < 0,001$	11,3±0,23
2	Пониженно-стойкие	28,1±0,21	47,7 $p_{1-2} < 0,001$	38,8±0,66 $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,01$	30,2±0,65 $p_{2-4} < 0,001$
3	Средне-стойкие	46,8±0,17	27,1±0,21 $p_{1-2} < 0,001$	35,5±0,42 $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,05$	44,3±0,44 $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,05$
4	Повышенно-стойкие	6,9±0,42	3,9±0,64 $p_{1-2} < 0,05$	4,8±0,48	8,0±0,22 $p_{1-4} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,01$

5	Высоко-стойкие	3,5±0,71	0,9±0,27 p ₁₋₂ <0,001	2,7±0,36 p ₂₋₃ <0,001	3,8±0,58
6	Сверхвысо-костойкие	0,9±0,53	-	0,6±0,18	1,9±0,37 p ₁₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,01
Продолжительность гемолиза, мин		11,5±0,32	6,9±0,52 p ₁₋₂ <0,001	10,5±0,49	11,8±0,25
Время выхода основного пика, мин		4±0,09	3,0±0,28 p ₁₋₂ <0,05	3,5±0,48	4±0,59

Из результатов, приведенных в таблице, видно, что в крови интактных животных определяются все популяции эритроцитов. Продолжительность гемолиза при этом составляет 11,5 минут и время выхода основного пика, характеризующего лизис основной массы эритроцитов, составляет 4 минуты. В крови у контрольных животных наиболее многочисленными являются среднестойкая и повышенностойкая популяции эритроцитов. Эти данные находятся в удовлетворительном согласии с результатами, полученными ранее в нашей лаборатории [11].

Экспериментальный гипотиреоз существенно отражается на устойчивых характеристиках мембран и способствует перераспределению популяций эритроцитов. При этом продолжительность гемолиза сокращается до 6,9 минут и максимум выхода основного пика эритрограммы смещается влево, составляя 3 минуты. На 47 % увеличивается популяция эритроцитов, подвергшихся сферуляционным изменениям. Популяция пониженностойких эритроцитов увеличивается на 31 %. При этом существенно снижается содержание среднестойких эритроцитов, достигая 27,1 % против 46,8 % в контроле. Популяции повышенностойких и высокостойких эритроцитов также снижаются, достигая до 3,9 и 0,9 % соответственно против 6,9 и 3,5 % у контрольных животных. А популяция сверхвысокостойких клеток вовсе исчезает из кровеносного русла.

Таким образом, экспериментальный гипотиреоз приводит к существенному перераспределению популяций эритроцитов крови экспериментальных животных.

Сокращение продолжительности гемолиза, увеличение в крови доли эритроцитов, подвергшихся сферуляционным изменениям, значительное увеличение популяции пониженностойких эритроцитов, смещение пика гемолиза влево и существенное снижение доли среднестойких эритроцитов, возможно, связано со «старением» популяции эритроцитов при экспериментальном гипотиреозе. На наш взгляд, причиной ускоренного лизиса эритроцитов, обнаруженного при экспериментальном гипотиреозе, могут быть нарушения, возникшие в эритроцитарной мембране, и выброс в кровь из депо эритроцитов, обладающих низкой устойчивостью.

Действительно, у людей при гипотиреозе в периферической крови имеет место резкий пойкилоцитоз, проявляющийся увеличением количества эритроцитов нетипичной формы: большого количества сфероцитов и необратимо измененных (деформированных) клеток. Также отмечается повышение способности красных клеток крови к деформации на низких показателях давления и снижение этой способности при высоком давлении. При гипертиреозе пойкилоцитоз выявлен в меньшей степени. Изменения объясняются снижением устойчивости мембраны эритроцитов вследствие гормонального дисбаланса и степенью выраженности тканевых метаболических нарушений [12].

Эритроциты с трансформированной мембраной обладают наименьшей осмотической стойкостью [13]. Эти результаты позволяют предположить, что при эксперимен-

тальном гипотиреозе, возможно, происходит трансформация дискоцитов в необратимо измененные формы, обладающие низкой кислотной устойчивостью.

Увеличение в крови эритроцитов с необратимо измененными формами, обладающих низкой кислотной устойчивостью, при экспериментальном гипотиреозе может быть связано, наряду с другими прочими причинами, с интенсификацией окислительных изменений белков и липидов мембран эритроцитов на фоне снижения антиоксидантной защиты. Чрезмерная активация процессов перекисного окисления липидов под действием стрессоров приводит к повреждению биологических мембран: увеличению их проницаемости для ионов, их вязкости вследствие уменьшения количества ненасыщенных жирных кислот, снижению разности потенциалов [14].

Обнаружено небольшое количество работ, где авторы исследовали влияние изменения тиреоидного статуса организма на интенсивность окислительных процессов липидов и белков в клеточных структурах. Показано, что голодание голубей сопровождается увеличением концентрации супероксидного радикала в щитовидной железе и развитием гипотиреоза [15]. В то же время исследования влияния мерказолилового гипотиреоза на интенсивность процессов липопероксидации показали, что содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ)-малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) снижается в ткани печени на 26 и 14 % соответственно [16]. Эти же авторы утверждают, что длительное содержание животных на диете с недостаточным содержанием йода приводит к активации процесса ПОЛ в печени.

Результаты по исследованию процессов ПОЛ в разных тканях животных при экспериментальном гипотиреозе несколько противоречивы. Так, в работе С.И. Колесникова и Н.Г. Макаровой [17] показано, что процессы ПОЛ в течение всего наблюдения за животными с экспериментальным мерказолиловым гипотиреозом активизировались. При этом после 8 недель введения мерказолила концентрация ДК увеличилась в крови в 2,1 раза, а в печени не изменялась. Концентрация МДА не изменялась ни в крови, ни в печени. После отмены мерказолила уровень ДК в крови оставался на прежнем высоком уровне, а в печени повышался через 7 суток в 3 раза, через 4 недели – в 4,3. Концентрация МДА при этом в крови и в печени оставалась в пределах нормы.

Таким образом, анализируя данные литературы, можно полагать, что обнаруженное нами снижение кислотной резистентности эритроцитов может быть связано с интенсификацией процессов липопероксидации в мембранах эритроцитов, вызванной снижением органификации йода при экспериментальном гипотиреозе.

В следующей серии опытов мы исследовали возможность самовосстановления популяций эритроцитов в крови крыс, перенёсших экспериментальный гипотиреоз. Так, через месяц после перенесенного экспериментального гипотиреоза популяционный состав и устойчивость к кислотному гемолизу эритроцитов полностью не нормализуются. При этом достоверно увеличивается продолжительность гемолиза и время выхода основного пика гемолиза по сравнению с состоянием гипотиреоза. Примечательно то, что в крови определяются все популяции эритроцитов, однако процентное соотношение различных популяций не восстанавливается.

Нами предпринята попытка в следующей серии экспериментов проанализировать возможность использования адгезивного препарата Matrix Thyroidea для нормализации обнаруженных изменений в популяциях и кислотной резистентности эритроцитов, обнаруженного при экспериментальном гипотиреозе.

Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) были обнаружены практически во всех тканях животных, причём не только млекопи-

тающих, но и в тканях птиц, амфибий, а также в растениях и грибах. Они локализованы внеклеточно и являются пептидно-белковыми комплексами, состоящими из пептидов (продуктов протеолиза белков межклеточного пространства) и белка-модулятора, представляющего собой изоформы бычьего сывороточного альбумина [8].

Как видно из таблицы, введение адгезивного фактора Matrix Thyroidea животным с перенесенным экспериментальным гипотиреозом способствует полной нормализации процентного содержания популяций и кислотной резистентности эритроцитов. При этом продолжительность гемолиза, время наступления максимума гемолиза и все популяции эритроцитов, определяемые у интактных животных и животных, перенесших экспериментальный гипотиреоз, практически совпадают.

Таким образом, мембранотропный гомеостатический препарат Matrix Thyroidea проявляет мембраностабилизирующий и антиоксидантный эффект.

Активность МГТБ проявляется в поддержании жизнеспособности клеток и структуры ткани. Кроме того, была продемонстрирована способность МГТБ стимулировать восстановительные и репаративные процессы в тканях, из которых выделили изучаемые биорегуляторы. Было показано, что это связано с дополнительной активацией МГТБ клеточных источников регенерации в ткани. Следует также отметить, что специфическое действие этих биорегуляторов проявляется в сверхмалых дозах, что указывает на существование в тканях позвоночных животных ранее не изученного механизма проведения регуляторного сигнала, в котором важнейшая роль отводится биологическим жидкостям, а вода является матрицей для передачи информации [19].

Выводы

1. Экспериментальный гипотиреоз существенно отражается на устойчивых характеристиках мембран и способствует перераспределению популяций эритроцитов в крови, что может свидетельствовать об интенсификации окислительных процессов и снижении активности антиоксидантной системы в мембранах эритроцитов, способствующих их дезорганизации.

2. Через месяц после перенесенного экспериментально гипотиреоза популяционный состав и устойчивость к кислотному гемолизу эритроцитов полностью не нормализуется. При этом достоверно увеличивается продолжительность гемолиза и время выхода основного пика гемолиза по сравнению с состоянием гипотиреоза. В крови определяются все популяции эритроцитов.

3. Введение адгезивного фактора Matrix Thyroidea животным с перенесенным экспериментальным гипотиреозом способствует полной нормализации процентного содержания популяций и кислотной резистентности эритроцитов. При этом продолжительность гемолиза, время наступления максимума гемолиза и все популяции эритроцитов, определяемые у интактных животных и животных, перенесших экспериментальный гипотиреоз, практически совпадают.

Литература

1. *Потапенко А.Я., Кягова А.А., Тихомиров А.М.* Осмотическая устойчивость эритроцитов: учебное пособие. – М., 2006. – 16 с.
2. *Ломако В.В., Шило А.В., Коваленко И.Ф., Бабийчук Г.А.* Эритроциты гетеро- и гомойотермных животных при естественной и искусственной гипотермии // Журн. эвол. биохим. и физиол. – 2015. – Т. 51, № 1. – С. 52–59.

3. Абусуев С.А. Дефицит йода и эндемический зоб в Дагестане // Материалы 2-й Всерос. тиреологического конгресса «Актуальные проблемы заболеваний щитовидной железы». – М., 2002. – С.167.
4. Carter C.R., Cao L., Cawai H., Smith P.A., Dryden W.F., Raftery M.A., Dunn S.M. Chain length dependence of the interactions of bisquaternary ligands with the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor // J. Biochem. Pharmacol. – 2007. – V. 3, № 73. – P. 417–426.
5. Васильева Л.С., Макарова О.А. Предупреждение стресс-индуцированных нарушений эритропоэза и развития анемии // Сибирский медицинский журнал. – 2001. – № 5. – С. 20–23.
6. Окорочков А.Н. Диагностика болезней внутренних органов. – М.: Мед. лит., 2001. – 512 с.
7. Мальцев Д.И. Тканеспецифические мембранные биорегуляторы, выделенные из печени и легкого млекопитающих: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2013. – 25 с.
8. Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С., Борисенко А.В., Маргасюк Д.В., Вечеркин В.В., Скрипникова В.С., Назарова П.А., Битко С.А., Березин Б.Б., Яминский И.В., Мешков Г.Б., Грачев С.А., Серебрякова М.В., Рыбакова Е.Ю., Ямскова В.П. Физико-химические свойства биологически активных в микродозах регуляторных белков, выделенных из различных тканей млекопитающих // Известия Рос. акад. наук. Серия химическая. – 2009. – № 3. – С. 623–628.
9. Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. – 1957. – № 2. – С. 259–265.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 351с.
11. Саидов М.Б., Бекишов К.С., Халилов Р.А. Влияние умеренной гипотермии на кинетику кислотного гемолиза эритроцитов при неполной глобальной ишемии мозга // Фундаментальные исследования. – 2015. – Вып. 15, № 2. – С. 3307–3310.
12. Бондарь Т.П., Эльмесова Л.А. Влияние тиреоидных гормонов на периферическое звено эритрона // Вестник Ставроп. гос. университета. – 2012. – Т. 78, № 1. – С. 210–214.
13. Ломако В.В., Коваленко И.Ф., Шило А.В. Эритроциты периферической крови при разных вариантах гипотермии гомеотермного организма // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, № 4. – С. 398–409.
14. Lelevich V.V. Biological chemistry. – Grodno: State Mining and Metallurgical University, 2009. – 256 p.
15. Виноградов В.В., Степура И.И., Надольник Л.И., Лабор С.А., Яскевич С.С., Чумаченко С.С. Механизмы прооксидантного действия альфа-липоевой (тиоктовой) кислоты // Новости медико-биологических наук. – 2013. – Т. 7, № 2. – С. 151–158.
16. Балаева-Тихомирова О.М., Гусакова Е.А. Способы коррекции активности перекисного окисления липидов при нарушении функции щитовидной железы // Сибирский мед. журн. – 2017. – № 2. – С. 20–23.
17. Гармаева Д.В., Васильева Л.С., Макарова О.А., Макарова Н.Г. Состояние эритроидного звена системы крови у стрессированных животных с гипотиреозом // Acta Biomedica Scientifica. – 2012. – Вып. 1. – С. 112–114.
18. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н., Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусынина М.М., Рыбакова Е.Ю. Экспериментальные доказательства роли физико-химических факторов в механизме биологического действия сверхмалых доз // Рос. хим. журн. – 1999. – Т. 43, № 5. – С. 34–39.

Поступила в редакцию 10 сентября 2019 г.

UDC 591.111.1.05

DOI: 10.21779/2542-0321-2019-34-4-138–145

**Population composition of rat erythrocytes with mercasolyl hypothyroidism
and administration factor Matrix Thyroidea**

M.B. Saidov, R.G. Scheikhova

Dagestan State University; Russia, 367001, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a; sma-gras@mail.ru

The effect of experimental hypothyroidism caused by the administration of mercasolyl 2,5 mg per 100 g wet weight on the dynamics of changes in the population composition of rats has been studied. The method for calculating erythrocyte populations is photometric kinetics recording the of erythrocyte lysis under the influence of hydrochloric acid of a certain concentration. The research has shown that experimental hypothyroidism significantly affects the stable characteristics of the membranes and promotes the redistribution of red blood cell populations. This is expressed in an increase in the blood fraction of erythrocytes with low resistance to acid hemolytic and a decrease in the total duration of hemolysis. The reason for the decrease in the stable characteristics of erythrocyte membranes may be the intensification of the oxidative processes of proteins and lipids in the membranes. Three-month self-termination after experimental hypothyroidism does not lead to a complete normalization of the population composition and stable characteristics of erythrocyte membranes. Administering of the adhesive factor Matrix Thyroidea to animals with experimental hypothyroidism contributes to the complete normalization of the percentage of populations and acid resistance of red blood cells. Moreover, the duration of hemolysis, the period before the maximum hemolysis, and the populations of red blood cells of the intact animals and the animals that underwent experimental hypothyroidism, are the same.

Keywords: *erythrocytes, membranes, hypothyroidism, mercasolil, adhesive factor, acid resistance.*

Received 10 July, 2019