

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
УКРАИНСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ

На правах рукописи

ВОЛОШЕНЮК Татьяна Григорьевна

УДК 611.155.1

МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ
ПРИ НАРУШЕНИЯХ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ

03.00.04 - биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев -1992 г.

Работа выполнена в лаборатории биохимии Украинского
НИИ фармакологии и токсикологии МЗ Украины

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор Ю. И. ГУВСКИЙ

Научный консультант: доктор медицинских наук,
профессор Л. П. ЧЕНКИЙ

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
О. К. КУЛЬЧИЦКИЙ
доктор биологических наук,
профессор
М. Д. КУРСКИЙ

Ведущая организация: Киевский государственный
университет им. Т. Г. Шевченко

Защита диссертации состоится " " _____ 1992 г.
в ___ часов на заседании специализированного совета
Д 088.19.01 по защите диссертаций при Украинском
научно-исследовательском институте фармакологии и
токсикологии МЗ Украины по адресу: 252038, Киев, ул.
Жена Потье, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке инсти-
тута.

Автореферат разослан " " _____ 1992 г.

Ученый секретарь
специализированного совета
профессор

В. С. Даниленко

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00816389 (Z)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Несмотря на достигнутые в последние годы значительные успехи в экспериментальной мембранологии, биохимические закономерности нарушений структуры и функции мембран в условиях клиники изучены крайне недостаточно. Проведенные к настоящему времени исследования в области патологии мембран у человека посвящены, главным образом, изучению изменений в мембранах эритроцитов при гипертензии (Постнов В.Ю., Орлов С.Н., 1987; Орлов С.Н. и соавт., 1985, 1987), ферментные, са-транспортные и структурные характеристики мембран эритроцитов в условиях глубоких нарушений кислотно-основного состояния (КОС), при стрессе, вызванном черепно-мозговой травмой (ЧМТ) (Ромоданов А.П. 1989) и хирургическим вмешательством (Губский В.И., 1987, Рябов Г.А., 1988), ранее не изучались.

Вместе с тем, являясь уникальной, кислородтранспортной системой, эритроциты выполняют, в то же время, ряд жизненно важных функций по поддержанию буферного равновесия и других физико-химических и метаболических констант организма, участвуя в системах регуляции гомеостаза и детоксикации. Выполненные ранее работы по изучению состояния эритроцитов при различных видах клинической патологии были направлены, главным образом, на изучение кислородтранспортных характеристик (Travis S.F., 1981; Schitz J.E., 1984; Ворисюк М.В., 1986; Чепкий Л.П. и соавт., 1988) и биоэнергетических процессов (Кузин В.М. и соавт., 1985; Шепотиновский В.И., 1984; Yoshida, A.M. et al., 1986; Wandrup J. et al., 1988) в эритроцитах. Так, в ряде работ показано, что определенную роль в развитии гипоксии при перитонитах (Schweigart V. et al., 1983; Чепкий Л.П. и соавт., 1986), операциях на открытом сердце (Goldstein, J. et al., 1985; Venditti F. et al., 1987), сахарном диабете (Воднар П.Н. и соавт., 1985; Shilo S. et al., 1985) может играть снижение концентрации в эритроцитах 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДПГ) и АТФ. В то же время, в мировой практике накоплен опыт коррекции нарушений кислородтранспортной функции крови, обусловленных снижением содержания в эритроцитах 2,3-ДПГ и АТФ (Lentz R.D. et al., 1978; Vannatta J.b., 1983; Kingston M., 1985). Улучшение снабжения кислородом тканей у больных перитонитом (Rasmussen A., et al., 1985; Чепкий Л.П. и соавт. 1990), энтероколитом (Pigon J., et al., 1985; Swaminathan R. et al., 1979) удавалось достичь при

при внутривенном введении калия дигидрофосфата. Влияние этого препарата на метаболизм эритроцитов, при нарушениях КОС, вызванных ЧМТ и операционным стрессом, ранее также не изучалось.

Известно, что мембрана и цитоскелет эритроцитов являются не только структурными компонентами, необходимыми для поддержания уникальной формы эритроцитов, но и принимают активное участие в его метаболизме (Черницкий Е. А., Воробей А. В., 1981; Беклемишев и соавт., 1987; Захарова Н. В. и соавт., 1988; Conway R. G., 1981; Sarcadi B., et al., 1987). Нарушения в структуре и свойствах взаимосвязанных компонентов эритроцита - мембраны, цитоскелета, гликолитических ферментов отражаются на общем метаболическом состоянии клетки.

Установлено, что существенную роль в модификации физико-химических свойств биомембран, регуляции функционирования мембраносвязанных ферментных и ион-транспортующих белков играет перекисное окисление липидов (ПОЛ). Как показано исследованиями последних лет (Каган В. Е. и соавт., 1983, 1986; Губский Ю. И. и соавт., 1987, 1990), к числу наиболее выраженных биохимических проявлений повреждения биомембран при активации ПОЛ относятся изменения параметров транспорта Ca^{2+} . Однако, состояние системы липоперекисления в связи с изменениями транспорта Ca^{2+} , биоэнергетических процессов в эритроцитах, физико-химических и ферментных свойств мембран при нарушениях КОС не были исследованы.

Цель и задачи работы.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось изучение молекулярных механизмов повреждения мембран эритроцитов в условиях нарушений КОС, вызванных черепно-мозговой травмой и операционным стрессом после хирургических операций на органах брюшной полости.

В соответствии с данной целью были сформулированы следующие задачи работы.

1. Изучение динамики КОС у лиц с черепно-мозговой травмой и операционным стрессом.
2. Изучение биоэнергетических процессов в эритроцитах при нарушениях КОС.
3. Изучение закономерностей транспорта Ca^{2+} и ферментных активностей мембран эритроцитов при нарушениях КОС.

4. Изучение активности NADPH и аскорбат-зависимого липопереокисления в мембранах эритроцитов при нарушениях КОС.

5. Изучение изменений структурного состояния липидного бислоя и мембранных белков эритроцитов при нарушениях КОС.

Научная новизна. Установлено, что при нарушениях КОС по типу метаболического ацидоза и гипоксии, вызванных ЧМТ и операционным стрессом, наблюдается снижение содержания в эритроцитах АТФ и 2,3-DPG. Впервые показано, что глубокие сдвиги КОС сопровождаются активацией ПОЛ в мембранах эритроцитов, контролируемого по скорости накопления малонового диальдегида (МДА) и интенсивности биофлуоресценции. Стимуляция липопереокисления и модификация структурной организации мембран эритроцитов приводят к нарушению АТФ-зависимого транспорта Ca^{2+} . Изменения состояния липидного бислоя и мембранных белков эритроцитов характеризуются повышением микровязкости гидрофобной фазы, сдвигом поверхностного потенциала и нарушением конформации белковых молекул.

На защиту выносятся следующие положения.

1. При нарушениях КОС, вызванных ЧМТ и операционным стрессом, наблюдаются изменения структурно-функционального состояния мембран эритроцитов, проявляющиеся снижением микровязкости липидного бислоя, изменением липид-белковых взаимодействий, модификацией поверхности эритроцитарной мембраны.

2. В мембранах эритроцитов при нарушениях КОС наблюдается активация NADPH- и аскорбат-зависимых систем ПОЛ, контролируемых по накоплению МДА и активности биофлуоресценции.

3. Переизбыточная модификация мембран эритроцитов при нарушениях КОС сопровождается снижением АТФ-зависимого транспорта Ca^{2+} и уменьшением активности Ca^{2+} -, Na^+ , K^+ АТФ и Mg^{2+} -АТФаз.

4. Структурно-функциональные изменения в мембранах эритроцитов при нарушениях КОС приводят к развитию метаболических сдвигов в эритроцитах: снижению содержания АТФ, 2,3-DPG. Введение большим калия дигидрофосфата предупреждает снижение содержания АТФ и 2,3-DPG.

Практическая значимость работы. На основе изучения биохимических механизмов повреждения мембран эритроцитов при нарушениях КОС, вызванных ЧМТ и операционным стрессом, обосновываются новые звенья патогенеза метаболических и функциональных нарушений при данной патологии. Использование флуоресцентных

вондов в исследовании структурного состояния мембран эритроцитов может быть применено в клинической биохимии для диагностики ранних метаболических нарушений при ЧМТ и операционном стрессе.

Разработан и внедрен в практику метод коррекции нарушений кислородтранспортной функции крови, путем внутривенного введения калия дигидрофосфата, способствующий улучшению снабжения организма кислородом и энергетическому обеспечению клеток. Показана возможность использования этого метода у больных реанимационного профиля, перенесших ЧМТ и оперативное вмешательство на органах брюшной полости. Методы внедрены в практику работы отделений реанимации больниц № 7, 23, 22 г. Киева, № 3 г. Черкассы.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертации доложены на заседании секции дыхания Киевского отделения Всесоюзного физиологического общества им. А. А. Богомольца АН УССР (1987 г.), на 8-й научно-практической конференции врачей анестезиологов-реаниматологов Черкасской области (1988 г.), IV-м Всесоюзном съезде анестезиологов и реаниматологов (г. Одесса, 1989 г.), Республиканской научной конференции молодых ученых-медиков по актуальным вопросам нейрохирургии и нейроанестезиологии (г. Киев, 1990 г.), 8-м Европейском конгрессе анестезиологов (г. Варшава, 1990 г.), на заседании Апробационного Совета по проблеме "Биохимия" Украинского НИИ фармакологии и токсикологии (г. Киев, 1992 г.).

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 170 страницах машинописи, содержит введение, обзор литературы, 4 главы собственных исследований, заключение и выводы. Работа иллюстрирована 31 таблицами и 11 рисунками. Список литературы включает 240 источников, из которых 105 отечественных и 135 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Для решения поставленных задач обследовано 158 больных после операций на органах брюшной полости и 78 больных с ЧМТ.

Больные в послеоперационном состоянии (состояние операционного стресса по Губскому В. И., 1987, Дерябину И. И., Насонкину О. С., 1987, Рябову Г. А., 1988) были распределены на две группы, в которых возраст пациентов, диагноз заболевания, объем оператив-

ного вмешательства были идентичными. В первой группе (115 больных) применяли общепринятую терапию, во второй (43) дополнительно внутривенно капельно вводили по 20-50 мл 6,8% раствора калия дигидрофосфата 1-2 раза в сутки в 400 мл 5-10% раствора глюкозы.

Среди больных с ЧМТ, 58 пациентов получали общепринятую интенсивную терапию (первая группа), 20-ти дополнительно внутривенно вводили, как у послеоперационных, раствор калия дигидрофосфата.

Контролем служили эритроциты и плазма крови 72 доноров.

Для характеристики газового состава и состояния КОС крови определяли следующие показатели: pH, pCO_2 , pO_2 с помощью "Radiometra" (Дания), значения AB, SB, BB вычисляли по номограммам.

Содержание 2,3-ДФГ, АТФ и P_i в эритроцитах определяли одновременно (Виноградова И.Л. и соавт., 1980), неорганического фосфора плазмы методом Фиске и Суббароу (Меньшиков В.В., 1987), концентрацию кальция и магния - атомно-абсорбционным методом (Szoro Namoto et. al., 1987).

Препараты мембран эритроцитов получали из свежей гепаринизированной крови, все операции проводили при 0-2°C.

Эритроциты отмывали от плазмы и клеток белой крови трехкратно 3-4 -кратным раствором изотонического раствора (KCl - 130 мМ, трис-HCl - 20 мМ, pH 7,4), осаждали центрифугированием (1500g, 5 мин). Отмытые эритроциты гемолизировали в 20-ти кратном объеме гипотонического буфера (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) в течение 10 мин. В ряде работ показано, что введение в среду ЭДТА (1-2 мМ) позволяет получить препараты с высокой и стабильной Ca^{2+} (Plishker G.A. и соавт., 1980) и Na^+ , K^+ -АТФазной активностью (Казеннов А.М. и соавт., 1984). Тени эритроцитов осаждали (20000 g, 20 мин), отмывали до обесцвечивания в гемолизирующем буфере. В полученных фрагментах мембран эритроцитов определяли активность АТФаз, как разность между активностью Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы (трис-HCl-50 мМ (pH 7,4), $MgCl_2$ -3 мМ, холинхлорид-45 мМ, ЭДТА-0,1 мМ) и Ca^{2+} -АТФазы (трис-HCl-50 мМ, pH 7,4, $MgCl_2$ -3 мМ, $CaCl_2$ - 125 мкМ, холинхлорид-55 мМ, ЭДТА-1 мМ). Активность Na^+ , K^+ -АТФазы как разность между активностью Mg^{2+} - АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы (трис-HCl 50 мМ, pH 7,4; $MgCl_2$ -3 мМ, NaCl -50 мМ, KCl -5 мМ, ЭДТА-0,1 мМ). Реакции инициировали добавлением 2 мМ АТФ.

Для получения вывернутых везикул мембран эритроцитов ис-

пользовали методические подходы, разработанные Steck L. (1974), Орловым С.Н. (1983). Отмытые мембраны эритроцитов помещали в 20-ти кратный объем, по отношению к исходному объему эритроцитов (1 мМ трис-НСl, рН 8,0) для получения правильно ориентированных везикул мембран (ROV), и в раствор 1мМ трис-НСl, рН 8,0; 1мМ ЭДТА - для получения вывернутых везикул мембран эритроцитов (IOV). Суспензию выдерживали 90 мин при 0-2°C (центрифугировали 20000g, 20 мин). Относительное содержание правильно ориентированных и вывернутых везикул определяли по активности ацетилхолинэстеразы методом Элмана (Дядюша Г.П., 1979). Активность Ca^{2+} -АТРазы оценивали по степени ингибирования общей Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТРазной активности (трис-НСl - 50 мМ, KCl - 100 мМ, $MgCl_2$ - 3 мМ, $CaCl_2$ - 125 мкМ, АТФ - 2 мМ, ЭДТА - 1 мМ) в присутствии 2 мМ ЭДТА (Villalobo A., et al., 1986).

Активный транспорт кальция оценивали по скорости АТФ-зависимого накопления ^{45}Ca (Plishker G.A., 1980) в среде (трис-НСl - 50 мМ, рН 7,4, 37°C, KCl - 100 мМ, $MgCl_2$ - 5 мМ, АТФ - 3 мМ, ^{45}Ca - 10^{-6} М).

Активность ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) и показателям биохемилюминесценции в ферментной (NADPH-зависимой - НЭП) и неферментной (аскорбат-зависимой - АЭП) системах (Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 1972, Губский Ю.И., 1978). Параметры биохемилюминесценции (I-интенсивность, максимальное значение за выбранный промежуток времени, S- площадь светосуммы) определяли на биохемилюминометре ВХЛ-6 (СССР).

Структурные особенности мембран эритроцитов исследовали методом флуоресцентной спектроскопии. Измерения проводили на флуориметре Hitachi MPF-4 (Япония), с помощью зондов пирена и 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС). Параметры собственной белковой флуоресценции характеризовали, как описано в работе Лебедева О.И. и соавт. (1991).

Результаты обработаны статистически с использованием критерия "t" Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Характеристика показателей газового гомеостаза и КОС. Состояние стресса, вызванное оперативным вмешательством и ЧМТ характеризовалось развитием выраженных нарушений газового гомеостаза и КОС. Начиная с 3-х суток наблюдения, уменьшение парциального давления O_2 в артериальной крови отмечалось во всех исследуемых группах больных и оставалось сниженным на 4-5 сутки

после стрессорного воздействия.

Гипоксемия в различные сроки проведения интенсивной терапии у 17,3-74,2% больных с ЧМТ и у 9,1- 66,3% лиц после операций сочеталась с гипокапнией, максимум развития которой также приходился на 3-и сутки наблюдения.

Исследование артерио-венозной разницы по насыщению крови кислородом ($ABPO_2$) выявило сходный характер изменений в обеих группах пациентов: минимальные значения $ABPO_2$, достигающие критических значений ($30,9 \pm 2,0$ мм рт ст - у больных с операционным стрессом и $28,5 \pm 1,8$ мм рт ст - у больных с ЧМТ) наблюдали на 2-3 сут интенсивной терапии.

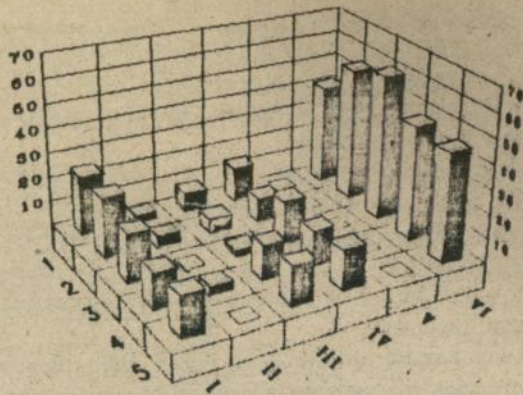
Снижение оксигенации артериальной крови, $ABPO_2$ и гипокапния приводили к глубоким нарушениям кислотно-основного равновесия у обследованных пациентов (рис.1).

Гипоксический метаболический ацидоз, как ведущее нарушение КОС, у больных в состоянии операционного стресса составил 49,7% всех нарушений КОС с частотой встречаемости от 35,0 до 58,2%. У больных с ЧМТ нарушения КОС по этому типу регистрировали в 42,6% случаев, при этом наблюдались более выраженные нарушения метаболизма, характеризующиеся снижением величин AB, SB, BB и накоплением нелетучих кислот - уменьшением BE. С другой стороны, метаболический ацидоз у части больных развивался в ответ на гипервентиляцию и дыхательный алкалоз, который отмечали в 17,3% всех нарушений КОС у больных с ЧМТ и в 14,9% - в состоянии операционного стресса.

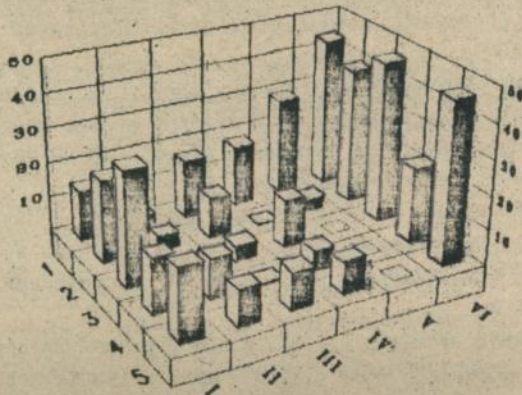
Метаболический алкалоз у лиц после операций на органах брюшной полости регистрировали в 16,0% случаев (частота встречаемости 2-16%), у больных с ЧМТ - 11,8% (частота встречаемости 2-18%).

Дыхательный ацидоз, обусловленный гиповентиляцией, отмечался в 9,0% всех нарушений КОС в состоянии операционного стресса и в 10,6% - у больных с ЧМТ (рис.1).

Биоэнергетические процессы в эритроцитах при нарушениях КОС. Известно, что изменение газового гомеостаза и развитие ацидоза сопровождается нарушением биоэнергетических процессов в эритроцитах (Benesch R., Benesch R.E., 1967, Rapoport A., et al., 1978 Чепкий Л.П. и соавт., 1990). Вместе с тем, комплексные исследования содержания АТФ, 2,3-DPG и P_2 в эритроцитах больных с наруше-



А



В

Рис. 1. Частота встречаемости нарушений КОС у больных в состоянии операционного стресса (А) и ЧМТ (В).
1...5-время наблюдения, сут; I-норма, II-дыхательный ацидоз, III-метаболический алкалоз, IV-респираторный алкалоз, V-метаболический ацидоз, респираторный алкалоз, VI-метаболический ацидоз.

ниями КОС, вызванными операционным стрессом и ЧМТ, ранее не проводились.

Результаты изучения содержания АТФ и 2,3-DPG в эритроцитах больных в состоянии операционного стресса и ЧМТ представлены на рис. 2.

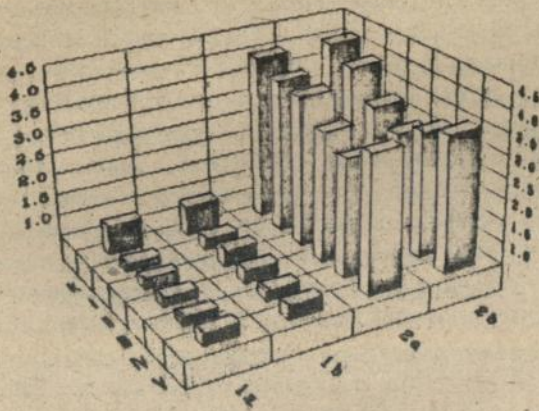


Рис. 2. Динамика изменения содержания АТФ (1) и 2,3-DPG (2) в эритроцитах больных с нарушениями КОС: (а)-операционный стресс, (б)-ЧМТ, по оси ординат- концентрация в мМ /л эритроцитов, 1...5-время наблюдения, сут.

Как можно видеть из полученных данных, концентрация АТФ уже в первые сутки наблюдения была ниже, чем в контроле на 0,51 и на 0,42 мМ/л у больных операционным стрессом и ЧМТ, соответственно. Содержание АТФ оставалось сниженным на протяжении всего периода исследований.

Проведенные нами исследования показали также, что содержание 2,3- DPG в эритроцитах больных с операционным стрессом было уменьшено в 67,0% наблюдений, не отличалось от контроля- в 22,9%, и было повышенным - в 10,1% случаев. Изменения концентраций этого метаболита в эритроцитах больных с ЧМТ были идентичны: в 68,0% случаев наблюдали снижение концентрации, в 12,0%-она была нормальной и в 20%-повышенной.

Учитывая, что 2,3-DPG является основным аллостерическим регулятором средства гемоглобина к кислороду, выявленное в наших

исследованиях снижение содержания 2,3-DPG в эритроцитах больных с нарушениями КОС может явиться одним из существенных механизмов развития тканевой гипоксии при данной патологии (Чепкий Л.П. и соавт., 1990, Рябов Г.А., 1988).

С другой стороны, причиной снижения концентрации 2,3-DPG при нарушениях КОС может быть изменение функционирования ферментов гликолитического цикла, участвующих в генерации этого метаболита (Astrup A. et al., 1973).

Обнаружено, что наряду со снижением концентрации АТФ и 2,3-DPG, исследуемые патологические состояния сопровождаются развитием гипофосфатемии с первых суток послеоперационного периода ($0,71 \pm 0,04$ мм/л) и при ЧМТ ($0,62 \pm 0,04$ мм/л, в контроле - $0,84 \pm 0,04$ мм/л), достигая минимальных значений к третьим суткам ($0,70 \pm 0,02$ и $0,55 \pm 0,04$ мм/л). Значительно снижалась концентрация P_i в эритроцитах. При этом было установлено наличие прямой корреляционной связи между концентрацией P_i и 2,3-DPG в эритроцитах ($r=73$, рис.3).

($r < 0,01$)

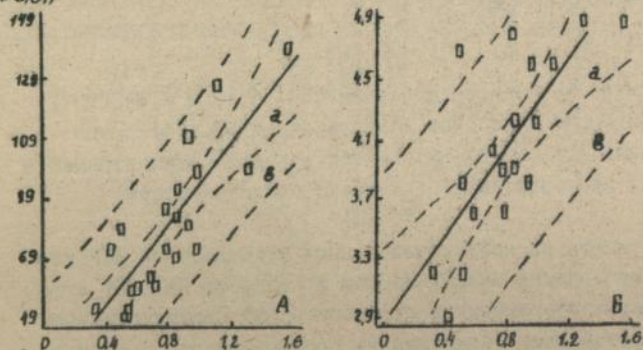


Рис.3. Корреляционные взаимоотношения между концентрацией (мм/л) P_i и АТФ (А) и P_i и 2,3-DPG (Б) в эритроцитах, а - , в-доверительные интервалы для $P < 0,01$ и $P < 0,05$, соответственно.

Подобная корреляционная связь характерна и для взаимоотношений между концентрацией P_i и АТФ ($r=0,83$). Можно предположить, что развитие гипофосфатемии в условиях нарушения КОС было обусловлено гипокальциемией, связанной с перемещением фосфатов в активно метаболизирующие клетки мышц, печени и мозга на фоне активации гликолиза при респираторном алкалозе (Staff J.S., 1980,

Berkelhammer C., Bear R.A., 1984, Bifano E. et al., 1984).

Ранее было показано (Челкий Л.П., Пысько С.А., 1986, Lents R. T., Brown D.M., 1978, Pigon J. et al., 1985, Vannatta J.B., et al., 1983), что переливание калия дигидрофосфата нормализует состояние газового гомеостаза и КОС у хирургических больных. В наших исследованиях введение калия дигидрофосфата приводило к существенной нормализации изучаемых биоэнергетических показателей в эритроцитах больных с операционным стрессом и лиц с ЧМТ. Так, увеличение концентрации 2,3-ДФГ наблюдалось с первых суток послеоперационного периода и было на 14% выше, чем у больных не получавших раствор калия дигидрофосфата, на третьи сутки - выше на 45,0%. Концентрация АТФ также увеличивалась, достигая максимальных величин на третьи сутки (на 57,0% выше, чем в группе больных, не получавших препарат). Еще больший прирост АТФ и 2,3-DFG наблюдали у больных с ЧМТ. Концентрация АТФ возрастала к третьим суткам на 57,0%, 2,3-DFG - почти в 2 раза.

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о глубоких изменениях содержания АТФ, 2,3-DFG и P_i в эритроцитах больных с нарушениями КОС различного генеза. Поскольку органические фосфаты и P_i относятся к числу основных регуляторов сродства гемоглобина к O_2 , (Иржак Л.И., 1975, Benesch R., Benesch R.E., 1967), выявленное нами снижение содержания в эритроцитах АТФ, 2,3-DFG и P_i может явиться одним из биохимических механизмов, лежащих в основе развития гипоксических изменений при стрессе, вызванном оперативным вмешательством и ЧМТ.

АТФазные активности и транспорт Са в мембранах эритроцитов. Основную роль в поддержании ионного гомеостаза эритроцитов играют Ca^{2+} и Na^+ , K^+ -АТФазы плазматических мембран (Волдырев А. А., 1986, Рубин Л.В., 1987).

Проведенными нами исследованиями установлено, что в условиях нарушения КОС кривые нормального распределения Ca^{2+} -зависимой АТФазы имеют явно выраженный сдвиг в сторону минимальных значений (рис. 4). Смещение кривых обусловлено увеличением по сравнению с контролем лиц, с низкой АТФазной активностью на 33,4 и 34,6% наблюдений в группах изучаемых патологий. Частота встречаемости нормальных значений АТФазы у послеоперационных больных уменьшалась до 14,5%, у больных с ЧМТ до 7,6%.

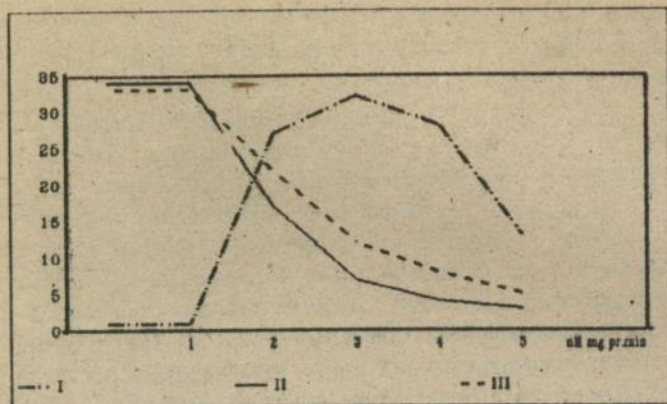


Рис. 4. Полигоны распределения значений Са²⁺-АТФазы мембран эритроцитов: I-контроль, II-операционный стресс, III-ЧМТ. По оси абсцисс- в ранжированных единицах активность фермента в нм/мг белка мин; по оси ординат-частота встречаемости.

Аналогичные закономерности наблюдали и в изменении активности Na⁺, K⁺-АТФазы. В мембранных фрагментах доноров активность этой АТФазы чаще регистрировали в интервале 1,8-3,0 нм/мг белка мин (81,9 %). Выше и ниже этого интервала значений встречаемость активности составила 9,0%. В обследованных группах пациентов величина активности Na⁺, K⁺-АТФазы была значительно ниже, что обусловлено увеличением числа низких активностей ферментов (56,8% - у больных в состоянии операционного стресса и 59,6% - у больных с ЧМТ). В то же время, в обеих группах увеличивается частота встречаемости пациентов, активность Na⁺, K⁺-АТФаз в эритроцитах которых превышает контрольные значения (в 1,5-у лиц с операционным стрессом и в 1,7-у больных с ЧМТ).

При анализе частоты встречаемости активности Mg²⁺-АТФазы было показано, что в условиях нарушения КОС также увеличивается число случаев со сниженной активностью Mg²⁺-АТФазы (шестикратно у послеоперационных и восьмикратно у больных с ЧМТ). В то же время, патологические состояния могут сопровождаться высокой Mg²⁺-АТФазной активностью, не проявляющейся у доноров (7,1% у больных в состоянии операционного стресса и 8,8% у больных с ЧМТ).

Ca^{2+} -АТРаза плазматических мембран является молекулярной структурой, ответственной за поддержание низкой концентрации кальция в эритроцитах. Для исследования состояния активного транспорта Ca^{2+} в эритроцитах при нарушениях КОС было проведено изучение поглощения ^{45}Ca и активности Ca^{2+} -АТРаза в вывернутых везикулах (IOV) мембран эритроцитов лиц с нарушениями КОС. Результаты исследования параметров транспорта у больных с операционным стрессом представлены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры транспорта Ca^{2+} в вывернутых везикулах (IOV) мембран эритроцитов в условиях операционного стресса.

Исследуемая группа:	Поглощение ^{45}Ca		Активность	
	: (нМ/мг белка мин)		: Ca^{2+} -АТРа-зы, :	
	: без АТФ	: АТФ-зависим	: мкМР/мг белка мин:	:
Контрольная (n = 7)	0,70 ± 0,26	2,54 ± 0,38	1,35 ± 0,11	
Операционный стресс (n = 7)	0,33 ± 0,46	1,14 ± 0,24*	0,24 ± 0,03*	

Как видно из полученных данных, метаболический ацидоз при операционном стрессе сопровождается снижением скорости АТФ-зависимого поглощения ^{45}Ca и активности Ca^{2+} -АТРаза (на 55,5% и 82,2% по сравнению с контролем). Подобные нарушения показателей активного транспорта кальция в IOV мембран эритроцитов были обнаружены и в условиях ЧМТ.

Изменения параметров Ca -насоса в плазматических мембранах эритроцитов сопровождалось существенным повышением содержания внутриклеточного кальция, определяемого методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Отмечалось возрастание концентрации Ca в эритроцитах, начиная со вторых-третьих суток наблюдения, при этом уровень максимального значения Ca превышал контрольные величины на 33,4% и 52,0% у лиц с операционным стрессом и ЧМТ, соответственно.

Поскольку молекулярная организация Ca -транспортирующих структур плазматических мембран зависит от физико-химического состояния гидрофобной фазы и степени перекисленности мембранных липидов (Губский Ю.И., 1989, 1991), представлялось необходимым провести изучение активности ПОЛ и биофизических параметров

мембран эритроцитов при нарушениях КОС.

Перекисное окисление липидов в мембранах эритроцитов.

Результаты исследования активности ПОЛ в мембранах эритроцитов, контролируемого по скорости накопления МДА, в неиницированной, NADF·Н - и аскорбат-зависимых системах перекисления, представлены в табл.2.

Таблица 2. Активность ПОЛ в мембранах эритроцитов при нарушениях КОС (нмоль МДА/мг белка мин).

Исследуемая группа	Без	В присутствии прооксидантов	
	прооксидантов:	+NADF Н	: аскорбат
Контрольная (n = 7)	0,10 ± 0,01	1,10 ± 0,15	0,16 ± 0,03
Операционный стресс (n = 7)	0,47 ± 0,08 *	2,44 ± 0,40 *	0,53 ± 0,05 *
ЧМТ (n = 7)	0,20 ± 0,07	2,10 ± 0,05 *	0,87 ± 0,17 *

Как видно из полученных данных, в эритроцитах больных с нарушениями КОС наблюдается активация, как NADF·Н - зависимого - на 100% у больных с операционным стрессом и ЧМТ по сравнению с контролем, так и аскорбат-зависимого перекисления (на 302% и 190% в изучаемых группах, соответственно). При этом, соотношение между неферментативным (аскорбат-зависимым) и ферментативным (NADF·Н-зависимым) ПОЛ (АЗП/НЭП) резко сдвигается в сторону преобладания неферментативного процесса (контроль-0,145; операционный стресс и ЧМТ -0,217 и 0,414, соответственно).

Информативным показателем активности свободно-радикальных перекисных процессов в клетке является хемилюминесценция биосубъектов в присутствии инициаторов ПОЛ (Е.Б.Бурлакова и соавт., 1986, В.А.Барабой, и соавт., 1991), отражающая скорость рекомбинации свободных радикалов. Проведенные нами исследования кинетики реакций перекисления методом биохемилюминесценции подтверждают результаты, полученные при определении скорости накопления МДА (табл.2). Как в мембранах эритроцитов, так и в плазме крови установлено увеличение площади светосуммы спонтанной (неиницированной) биохемилюминесценции (S) у послеоперационных больных (рис.5). Спонтанная биохемилюминесценция

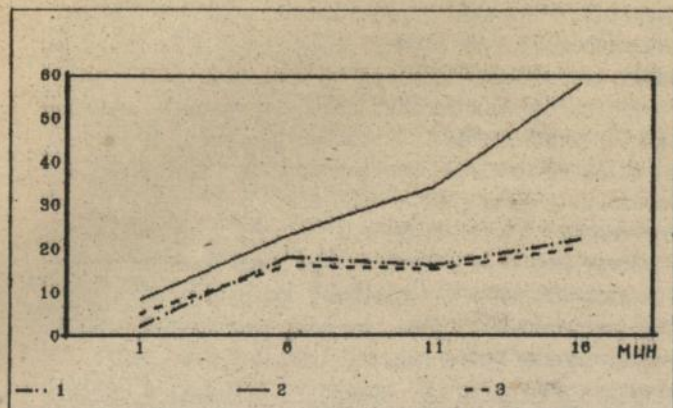


Рис. 5. Площадь светосуммы неиницированной биохемиллюминесценции ($S, \text{имп} \cdot 10^6$) мембран эритроцитов: 1-ЧМТ, 2-операционный стресс, 3-контроль.

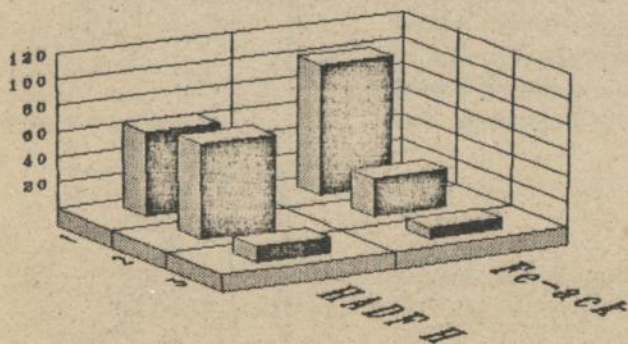


Рис. 6. Степень активации площади светосуммы биохемиллюминесценции (ΔS) мембран эритроцитов: 1-ЧМТ, 2-контроль, 3-операционный стресс.

больных с ЧМТ не отличалась от контроля.

Степень активации реакций перекисления в NADF·H - и аскорбат-зависимых системах была обратно пропорциональна величине неиницированной биофлуоресценции у больных в состоянии операционного стресса. Высокий уровень свечения мембран эритроцитов сочетался с низкой степенью активации процесса. У больных с ЧМТ достоверные различия были зарегистрированы при активации реакций перекисления Fe-аскорбатом (рис.6.).

Полученные данные могут свидетельствовать о существенных нарушениях регуляции ПОЛ в мембранах эритроцитов больных с нарушениями КОС, связанных, как с модификацией жирнокислотного состава биомембран, в частности, ПНЖК- основных субстратов ПОЛ, так и с изменением содержания биооксидантов (Губский Ю.И., 1991).

Биофизические характеристики липидного бислоя и белков мембран эритроцитов. Зондирование липидного бислоя мембран эритроцитов пиреном выявило, как у больных с операционным стрессом, так и у лиц с ЧМТ, снижение степени эксимеризации зонда (рис.7, А), что свидетельствует о повышении микровязкости липидного бислоя мембран в условиях нарушения КОС.

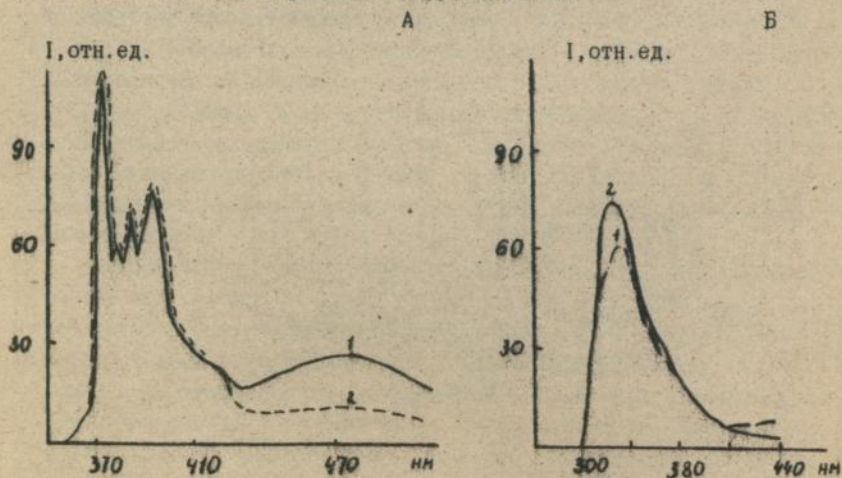
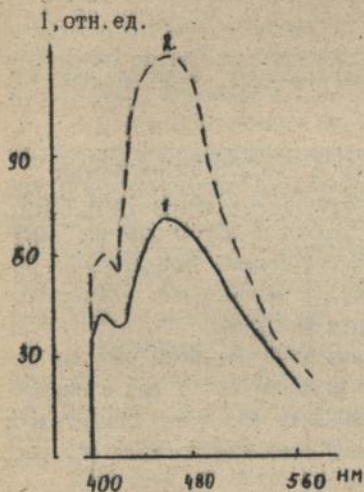


Рис.7. Спектры флуоресценции (А)-пирена (длина волны возбуждения 334 нм концентрация пирена 5 мкМ), (Б)-мембранных белков эритроцитов (длина волны возбуждения 280 нм), 1-контроль, 2-операционный стресс.

Исследованием спектральных показателей собственной флуоресценции мембранных белков эритроцитов выявлено увеличение интенсивности и сдвиг спектра флуоресценции в коротковолновую сторону у больных с операционным стрессом и в меньшей степени у пациентов с ЧМТ. Полученные результаты можно объяснить увеличением вклада триптофанилов, локализующихся внутри белковой глобулы, в общий спектр флуоресценции (рис. 7. В).

Полученные данные свидетельствуют об изменениях конформации белков мембран эритроцитов, вызванных раыворачиванием белковых глобул и экспозицией гидрофильных триптофанилов в водную фазу (Лакович Д., 1986).



Структурные изменения поверхности мембран эритроцитов были выявлены у лиц с операционным стрессом с помощью зонда АНС. Показано, что в условиях патологии интенсивность его флуоресценции увеличивается, что может быть обусловлено увеличением мест связывания АНС на мембране или изменением физико-химических параметров его микроокружения (рис. 8).

Рис. 8. Спектр флуоресценции АНС (длина волны возбуждения 340 нм, концентрация АНС 10^{-6} М), 1-контроль, 2-операционный стресс.

Выявленные изменения биофизических параметров липидного бислоя и мембранных белков наблюдались, как в мембранных фрагментах эритроцитов, так и в правильно ориентированных везикулах (ROV). Вместе с тем, в мембранных белках вывернутых везикул (IOV), полученных у больных с нарушениями КОС, были выявлены изменения, отличные от наблюдаемых в мембранных препаратах ROV.

Таблица 3. Спектральные показатели флуоресцентного излучения белков IOV (I_o/I_k).

Спектральные показатели:	Исследуемые группы	
	Операционный стресс:	ЧМТ
Интенсивность собственной флуоресценции белковых люминофоров (n = 9)	0,74 ± 0,09 *	0,78 ± 0,05 *
Эффективность индуктивно-резонансного переноса энергии (n = 9)	1,01 ± 0,02	0,90 ± 0,03 *

Примечание: I_o/I_k - отношение спектральных показателей в исследуемых группах к контролю.

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, спектральные показатели белков внутренней поверхности мембран были также изменены. Интенсивность собственной белковой флуоресценции снижалась в обеих обследованных группах, что может указывать на повышение гидрофобности белковых глобул и перемещение поверхностных триптофанилов в глубинные области мембраны.

Эффективность индуктивно-резонансного переноса энергии донорно-акцепторной пары: белковые люминофоры-АНС у лиц с нарушениями КОС, вызванными ЧМТ, также снижалась, что может свидетельствовать о нарушениях межмолекулярных взаимодействий в белково-липидных ансамблях мембран эритроцитов.

Т.о. проведенные исследования свидетельствуют о том, что при глубоких нарушениях КОС, вызванных операционным стрессом или ЧМТ, происходят выраженные изменения мембран эритроцитов, связанные с их перекисной модификацией и сопровождающиеся нарушением ферментных и Са-транспортирующих процессов. Увеличение содержания в эритроцитах Ca^{2+} , снижение уровня АТФ и 2,3-DPG и изменения физической структуры мембран могут являться ведущими молекулярными механизмами в нарушении кислородтранспортирующих и реологических свойств эритроцитов у больных с патологией кислотно-основного гомеостаза.

ВЫВОДЫ.

1. Ведущим типом нарушения КОС у больных в состоянии стресса, вызванного оперативным вмешательством и ЧМТ является метаболический ацидоз, сопровождающийся гипокапнией и снижением pO_2 в артериальной крови.

2. Изменения биоэнергетических процессов в эритроцитах больных с нарушениями КОС характеризуются снижением содержания АТФ, 2,3-DPG и P_2 . Введение пациентам калия дигидрофосфата приводит к существенной коррекции уровня органических фосфатов и P_1 в эритроцитах.

3. В мембранах эритроцитов больных с послеоперационным стрессом и ЧМТ отмечается выраженное снижение Ca^{2+} - и Na^+, K^+ -АТФазных активностей, свидетельствующее об изменениях ион-транспортирующих процессов.

4. При исследовании на вывернутых везикулах мембран эритроцитов (IOV) обнаружено значительное снижение, в условиях нарушения КОС, параметров активного транспорта ^{45}Ca : АТФ-зависимого накопления ^{45}Ca и активности Ca^{2+} -АТФазы.

5. Изменения в эритроцитарных мембранах параметров активного транспорта Ca^{2+} при нарушениях КОС сопровождаются накоплением в эритроцитах ионов кальция.

6. Изменения в липидной фазе мембран эритроцитов при нарушениях КОС характеризуются повышением активности неиницированного, NADF·H - и аскорбат-зависимого ПОЛ, со сдвигом соотношений АВП/НЭП в сторону преобладания неферментативного процесса.

7. Изменения активности ПОЛ в мембранах эритроцитов у больных с нарушениями КОС характеризуются существенным возрастанием площади светосуммы (S) неиницированной биохемилюминесценции. Выявлены сдвиги в степени активации биохемилюминесценции (ΔS) прооксидантами NADF·H и аскорбатом, зависящие от характера патологического процесса.

8. Модификации в структуре гидрофобной фазы мембран эритроцитов при нарушениях КОС характеризуются снижением микровязкости липидного бислоя, изменением белок-липидных взаимодействий.

9. Выявлены значительные нарушения конформационных свойств мембранных белков эритроцитов, проявляющиеся увеличением степени экспонирования белковых триптофанилов в гидрофобную фазу, возрастанием поверхностного заряда мембран.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. T.G.Voloshenyuk, S.A.Pasko Erythrocyte ATPase membrane activity in the intensive care unit (ICU) patients. - 8th European congress of anaesthesiology. - Warsaw. - September 9-15. - 1990. - P. 18.

2. S.A.Pasko, T.G.Voloshenyuk Hypophosphatemia, its consequences, treatment in patients with traumatic head injury (THI). - 8th European congress of anaesthesiology. - Warsaw. - September 15. - 1990. - P. 10.

3. S.A.Pasko, T.G.Voloshenyuk Use of the anticalmodulin drug trifluoperazine (TFP) in treatment of ICU patients. - там же, с. 11.

4. Волошенко Т.Г., Пасько С.А. Нарушения фосфорного обмена и его коррекция в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы. - Ж. вопросы нейрохирургии. - 1990, N 3. - с. 14-16.

5. Пасько С.А., Волошенко Т.Г. Коррекция расстройства обмена фосфора и кальция у больных после операций на органах брюшной полости. - Клиническая хирургия. - 1990, N 10. - с. 11-15.

6. Волошенко Т.Г., Пасько С.А. Оптимизация активности транспортных АТФаз мембран эритроцитов у больных отделения реанимации в критических состояниях. - IV Всесоюзный съезд анестезиологов и реаниматологов. - Одесса, 13-16 декабря, 1989. - Тезисы докладов. - с. 458-459.

7. Волошенко Т.Г., Пасько С.А. Гипофосфатемия и ее коррекция у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой в критических состояниях. - там же, с. 456-458.

8. Пасько С.А., Волошенко Т.Г., Софиенко Г.И. Гипофосфатемия. - Врачебное дело. - 1989. - N 10. - с. 11-15.

9. Губский Ю.И., Волошенко Т.Г., Примак Р.Г., Курская Н.М. Сравнительная характеристика ферментных активностей и физической структуры прямых и вывернутых везикул эритроцитарных мембран человека. - Украинский биохимический журнал, 1992, т. 64, N 6, (в печати).

Подп. к печ. № 3-92 Формат 60:14 $\frac{1}{16}$ Бумага *Тш* 12 печ. офс.

Усл. печ. л. 1,1² Уч.-изд. л. 0,23 Тираж 100

Зак. 1-3/71 Бесплатно

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Решина, 4.

4278511

AB 25.604