

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ЭРИТРОЦИТОВ У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ДИХЛОРЭТАНОМ

Срубиллин Д.В., Гадельшина Г.Ф., Еникеев Д.А., Султанов Э.Ф.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России», Уфа, e-mail: rectorat@bashgmu.ru

Целью работы было изучение энергетического метаболизма эритроцитов при хронической интоксикации дихлорэтаном (ДХЭ). Эксперименты проведены на крысах-самцах массой 180-220 г. Хроническую интоксикацию вызывали ежедневным внутрижелудочным введением дихлорэтана в дозе 0,05 LD₅₀. В крови животных определяли активность гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, Na,K-АТФазы, а также содержание восстановленного глутатиона, АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ). Тестирование осуществляли на 14, 30 и 60-е сутки введения дихлорэтана. Установлено, что при длительном введении ДХЭ наблюдаются разнонаправленные изменения содержания АТФ и 2,3-ДФГ: на 14-е сутки содержание АТФ увеличивается на 28,1%, концентрация 2,3-ДФГ не меняется; на 30-е сутки содержание АТФ и 2,3-ДФГ снижаются на 40,4% и 10,9% соответственно; на 60-е сутки содержание 2,3-ДФГ уменьшается на 29%, что свидетельствует о повышении сродства гемоглобина с кислородом и ухудшении оксигенации тканей. Снижение АТФ и 2,3-ДФГ возникает из-за прогрессивного уменьшения активности гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Замедление процессов гликолиза влияет на состояние антиокислительной защиты: уменьшается содержание восстановленной формы глутатиона на 34,4% на 60-е сутки хронической интоксикации ДХЭ и, как следствие, подавляется глутатионпероксидазная активность эритроцитов, что увеличивает опасность окислительного повреждения мембран, меняется их проницаемость, свойства и, как следствие, активность фермента Na,K-АТФазы, уровень которого снижался на 60-е сутки хронической интоксикации ДХЭ на 19,6%. Полученные результаты свидетельствуют, что при хронической интоксикации ДХЭ развивается гипоксия, формирование которой связано с угнетением энергетического метаболизма, повышением сродства гемоглобина к кислороду, возникающему вследствие снижения активности 2,3-ДФГ.

Ключевые слова: дихлорэтан, эритроциты, крысы, энергетический метаболизм, гипоксия, 2,3-дифосфоглицерат.

EFFECT OF LOW INTENSIVE LASER RADIATION ON THE ENERGY METABOLISM OF ERYTHROCYTES IN RATS WITH CHRONIC INTOXICATION WITH DICHLOROETHANE

Srubilin D.V., Gadelshina G.F., Enikeyev D.A., Sultanov Je.F.

FGBOU VO "Bashkir State Medical University" of the Ministry of Health of Russia, Ufa, e-mail: rectorat@bashgmu.ru

The aim of the study was to analyze the energy metabolism in chronic intoxication with dichloroethane (DCE). Methods. The experiments were carried out on male rats weighing 180-220 g. Chronic intoxication was caused by daily intragastric administration of dichloroethane at a dose of 0,05 LD₅₀. Hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, Na, K-ATPase, as well as the content of reduced glutathione, ATP and 2,3-di-phosphoglycerate (2,3-DPG) were determined in the blood of animals. Testing was carried out on the 14th, 30th and 60th day of dichloroethane administration. Results. It was established that with long-term administration of dichloroethane, multidirectional changes in the content of ATP and 2,3-di-phosphoglycerate were observed: on the 14th day the ATP content increased by 28.1%, the concentration of 2,3-di-phosphoglycerate did not change; on the 30th day the ATP and 2,3-DPG levels reduced by 40.4% and 10.9%, respectively; on the 60th day, the content of 2,3-DPG decreased by 29%, which indicated an increase in the hemoglobin oxygen affinity and a deterioration in tissue oxygenation. A decrease in ATP and 2,3-DPG arises from the progressive decrease in the activity of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The slowing down of glycolysis affects the antioxidant protection: the content of reduced form of glutathione decreased by 34.4% on the 60th day of chronic intoxication with dichloroethane and as a result glutathione peroxidase erythrocyte activity was suppressed, which increased the risk of oxidative damage to the membranes, their permeability, properties. As a result, the activity of the enzyme Na, K-ATPase was suppressed, the level of which decreased by 19.6% on the 60th day of chronic intoxication with dichloroethane. Conclusion. The obtained results indicate that during chronic intoxication with dichloroethane hypoxia develops, the formation of which is

associated with inhibition of energy metabolism, an increase in the hemoglobin oxygen affinity, resulting from a decrease in the activity of 2,3-DPG.

Keywords: dichloroethane, red blood cells, rats, energy metabolism, hypoxia, 2,3-diphosphoglycerate.

Химическая промышленность играет исключительно важную роль в обеспечении жизненных потребностей общества. Дихлорэтан (ДХЭ) широко применяется в органическом синтезе по всему миру, в основном при производстве поливинилхлорида, а также как растворитель, в производстве нитроцеллюлозных и ацетилцеллюлозных лаков, для растворения смол, для дегазации отравляющих веществ. Острые интоксикации ДХЭ, несмотря на их небольшую частоту (до 5%), характеризуются высокой смертностью. Попадая внутрь организма, ДХЭ вначале в значительных количествах накапливается в крови и затем, как гидрофобное вещество, быстро распределяется, накапливаясь в тканях, богатых липидами. Метаболизм ДХЭ происходит в печени, почках, легких, селезенке, эпителии желудочно-кишечного тракта и связан с образованием радикала $\text{CICH}_2\text{-CH}_2$, который способен алкилировать биосубстраты и активировать процессы перекисидации. В процессе метаболизма с участием микросомальных цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ ДХЭ превращается в гидрофильные значительно более токсичные метаболиты: 2-хлорэтанол, хлоруксусный альдегид, моноклоруксусная кислота, которые попадают в кровь. В дальнейшем метаболиты ДХЭ конъюгируют с глутатионом с участием глутатио-S-трансферазы и выводятся из организма виде меркаптуровых кислот. Необходимо также учитывать действие молекулы ДХЭ в целом, которая блокирует активные центры ферментов и рецепторов [1].

С практической точки зрения важны состояния, которые возникают при длительном контакте с ДХЭ у работников химического производства хлорорганического синтеза, когда может не наблюдаться явной клинической симптоматики отравления, но возможно развитие профессиональной хронической интоксикации, при этом способ введения ДХЭ, как показали многочисленные наблюдения, не оказывает существенного влияния на распределение его метаболитов. Несмотря на многолетнее изучение токсических свойств ДХЭ, которые в основном проводились при острых интоксикациях, остаются нераскрытыми некоторые принципиальные вопросы и существует необходимость оценки влияния хронической интоксикации ДХЭ и возможности коррекции постинтоксикационных нарушений. Как известно, ДХЭ кумулятивными свойствами не обладает. При хроническом поступлении в организм ДХЭ в небольших дозах концентрация яда в крови незначительна, но, вероятно, важное значение в механизме токсического действия приобретают нарастающие патологические состояния в органах, связанных с метаболизмом ДХЭ, метаболиты которого, а также продукты, образующиеся в печени при ее патологии,

постоянно попадают в кровь. Рядом авторов выявлены изменения функционального состояния нейтрофилов, лимфоцитов и эритроцитов периферической крови, угнетение иммунных реакций при хроническом отравлении ДХЭ [2; 3]. В ранее выполненных нами исследованиях установлено увеличение содержания веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) в эритроцитах и плазме крови крыс, а также были выявлены изменения липидного состава, проницаемости и сорбционной способности мембран эритроцитов при хронической интоксикации ДХЭ [4]. В условиях длительного введения ДХЭ в стенке тонкого кишечника развивался окислительный стресс, подавлялись биоэнергетические процессы, что вело к нарушению кишечного барьера и увеличивало концентрацию липополисахарида в крови. Известно, что взаимодействие эндотоксина с рецепторами на мембране эритроцитов может изменить их состояние [5]. Однако механизмы, приводящие к нарушению функции эритроцитов, не вполне выяснены. Возможно, одной из причин изменения активности эритроцитов является нарушение биоэнергетики клеток. При продолжении исследований в данном направлении существует необходимость оценить влияние хронической интоксикации ДХЭ на энергетический метаболизм эритроцитов.

Важным показателем, характеризующим функции органов и систем, является система энергетического обеспечения клеток. Оценивание показателей энергетического метаболизма эритроцитов, с одной стороны, позволяет получать информацию об энергетическом обмене клеточных структур, с другой - позволяет оценивать эффективность транспорта кислорода. Значимым фактором, регулирующим сродство гемоглобина и кислорода, является содержание внутриэритроцитарной 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (2,3-ДФГ). Определение концентрации данного макроэрга можно считать функциональной биопсией адекватного снабжения тканей кислородом [6]. Содержание 2,3-ДФГ зависит от интенсивности гликолитических процессов в эритроцитах, определяющих их энергетический потенциал. Форма эритроцитов, способность к деформации тесно связаны с их энергетическим метаболизмом и фосфорилированием мембранных белков цитоскелета.

В медицине все шире применяется низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ), которое признается как эффективный и перспективный метод лечения самых различных заболеваний. НИЛИ уменьшает выраженность воспалительных реакций, стимулирует иммунитет, нормализует нарушенную микроциркуляцию и реологические свойства крови [7-9]. Ряд авторов отмечают превентивное и лечебное действие облучения гелий-неоновым лазером области печени на течение гепатита [10]. В основе эффекта НИЛИ лежит комплексное неспецифическое действие на организм, связанное с формированием защитно-адаптивной реакции. В отличие от большинства работ в наших исследованиях использовалась комбинация инфракрасного и красного лазерного излучения, примененных в

импульсном режиме с достаточно низкой интенсивностью излучения. Нами выявлено, что проведение курса инфракрасного НИЛИ при хронической интоксикации ДХЭ улучшает функциональное состояние печени и восстанавливает структурное состояние мембран эритроцитов за счет снижения активности свободных радикалов [4; 11]. При продолжении исследования в данном направлении представляло интерес изучить влияние лазерного излучения на энергетический метаболизм эритроцитов при хроническом отравлении ДХЭ. В доступной литературе мы не нашли подобных исследований.

Цель исследования – изучение влияния НИЛИ на энергетический метаболизм эритроцитов у крыс при хронической интоксикации ДХЭ.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 48 здоровых половозрелых неинбредных белых крысах-самцах массой 180-220 г, разделенных на 5 групп: 1-я – контрольная (n=12); 2, 3, 4 и 5-я – животные с моделированной интоксикацией дихлорэтаном (n=12 в каждой группе). Животных 2-й группы выводили из эксперимента на 14-е сутки, 3-й группы на 30-е сутки и 4-й группы на 60-е сутки исследования. Животные 5-й группы дополнительно получали курс сочетанного воздействия импульсного НИЛИ с длиной волны 0,63 и 0,89 мкм. Использовался аппарат АЛТ «Матрикс» с зеркальной насадкой для воздействия в области печени контактной методикой (0,89 мкм, импульсная мощность 7 Вт, частота 80 Гц, доза 0,01 Дж/см²) и акупунктурной насадкой для надвенозного облучения крови в области хвостовой вены (0,63 мкм, импульсная мощность 5 Вт, частота 80 Гц, доза 0,012 Дж/см²). Курс лазеротерапии начинали с 5-й недели и продолжали 12 дней. Эксперименты выполнялись в осенне-зимний период. Забор биологического материала производился в утренние часы. Эксперименты проводились в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и Приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Хроническая интоксикация дихлорэтаном достигалась ежедневным энтеральным введением токсиканта в растворе оливкового масла в дозе 0,05 LD₅₀. Контрольные животные получали внутривенно равный объем оливкового масла. Животных умерщвляли методом краниоцервикальной дислокации под легким эфирным наркозом и для исследования брали смешанную артериальную и венозную кровь, которую стабилизировали гепарином (150-200 ЕД/мл) и немедленно помещали в стакан со льдом. После

центрифугирования в течение 10 минут в рефрижераторной центрифуге при 3000 об/мин отделяли плазму, после чего проводили 3-кратное отмывание эритроцитов с добавлением 3 объемов охлажденного 0,15М раствора хлористого натрия, приготовленного на 10 мМ трис-НСl буфере (рН 7,6 при 25 °С). Третий раз длительность центрифугирования увеличивали до 15 минут для получения более плотной упаковки эритроцитов. Часть отмывтых эритроцитов гемолизировали в 5 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,6 при 25 °С) в соотношении 1:9 в течение 30 минут при 4 °С для определения активности гексокиназы [12], глюко-6-фосфатдегидрогеназы [13], глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы [14]. Восстановленный глутатион (ГлSH) определяли по методу, разработанному Путилиной Е.Ф., а деформабельность и жесткость эритроцитарных мембран изучали по методам Федоровой З.Д. и Моисеевой О.М.

Другую часть выделенных упакованных эритроцитов использовали для одновременного определения содержания АТФ и 2,3-ДФГ по методу, разработанному Виноградовой И.Л., Багрянцевой С.Ю., Дервизом Г.В., а также определяли активность Na,K-АТФазы [15]. Для выявления активности Na,K-АТФазы проводили инкубацию эритроцитов с 1,5% раствором твин 20 в соотношении 1:1, после чего добавляли раствор сахарозы, чтобы разведение составило 1:10. Активность оценивали, измеряя количество неорганического фосфата, который освобождается в ходе гидролиза АТФ в среде объемом 0,3 мл следующего состава (в мМ): трис – 50, NaCl – 100, KCl – 20, MgCl₂ – 3, АТФ – 3 (рН 7,5). Реакцию начинали внесением 0,1 мл субстрата и инкубировали 30 минут при 37 °С, останавливали реакцию добавлением холодного раствора трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%). Для ингибирования Na,K-АТФазы использовали 1 мМ убаина. Активность Na,K-АТФазы рассчитывали как разность между общей и Mg²⁺-зависимой АТФазной активностью. Количественное определение фосфата проводили методом Ратбуна и Бетлаха, который позволяет определять неорганический фосфат в присутствии АТФ.

Обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики. После проверки нормальности распределения изучаемых параметров в сравниваемых группах определяли средние величины (M), ошибку средних величин (m) при соответствии распределения признака закону нормального с расчетом сравнения групп показателей по критерию Стьюдента (t). Минимальный уровень статистически значимых различий верифицировали при p<0,05. Математическую обработку выполняли на компьютере с применением стандартных пакетов программы Statistica 10.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенных исследований, представленные в таблицах 1 и 2, показывают, что при длительном введении ДХЭ наблюдаются разнонаправленные

изменения содержания АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах в различные сроки интоксикации. Содержание АТФ на 14-е сутки увеличивается на 28,1% (P=0,007), концентрация 2,3-ДФГ значительно не изменяется. Количество АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах зависит от интенсивности гликолиза, основными ферментами которого являются гексокиназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ). В проведенном исследовании, как следует из данных, приведенных в таблице 2, активность данных ферментов увеличивается на 36,1% (P<0,0001) и 22,1% (P=0,0079) соответственно. Г-6-ФДГ является ключевым ферментом пентозофосфатного шунта, влияющим на ферменты глутатионредуктазного цикла, от активности которых зависит соотношение окисленных и восстановленных форм глутатиона. Повышение активности антиокислительных ферментов глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы на 14-е сутки хронической интоксикации ДХЭ соответственно на 41,9% (P<0,0001) и 36,4% (P=0,0148) является адаптивным процессом, связанным с увеличением содержания гидроперекисей липидов в мембране эритроцитов. Увеличение образования АТФ можно рассматривать как компенсаторный механизм на изменения свойств эритроцитарной мембраны, которые выражаются в увеличении ее текучести, а также проницаемости для катионов [4]. Изменение внутриклеточной концентрации катионов Na⁺ и K⁺ влияет на активность Na,K-АТФазы. В наших исследованиях на 14-е сутки интоксикации ДХЭ активность Na,K-АТФазы увеличивается на 24,7% (P=0,02), что вызывает повышенную потребность в макроэргах и вторично активизирует гликолиз.

Таблица 1

Показатели активности ферментов гликолитического цикла, системы глутатиона и содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах крыс при хронической интоксикации дихлорэтаном (M±m)

Исследуемый показатель	Группы животных				
	1-я группа, интактные животные (n=8)	2-я группа, 15-е сутки интоксикации и ДХЭ (n=8)	3-я группа, 30-е сутки интоксикации и ДХЭ (n=8)	4-я группа, 60-е сутки интоксикации и ДХЭ (n=8)	5-я группа, интоксикация ДХЭ + коррекция НИЛИ (n=8)
Глутатионпероксидаза, ммоль восстановленного глутатиона/л х мин.	45,41±4,86	61,92±3,42 P=0,0148	35,56±3,4 P=0,119 P ₁ <0,0001	25,9±2,78 P=0,0037 P ₁ <0,0001 P ₂ =0,046	52,4±2,46 P=0,27 P ₁ =0,056 P ₂ =0,0028 P ₃ <0,0001
Глутатионредуктаза, мкмоль окисленного глутатиона/л х мин.	130,89±4,2	185,78±6,08 P<0,0001	139,53±6,26 P=0,293 P ₁ <0,0001	95,28±3,94 P<0,0001 P ₁ <0,0001 P ₂ <0,0001	123,05±6,93 P=0,36 P ₁ <0,0001 P ₂ =0,105 P ₃ =0,003

Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, нмоль НАДФН ₂ на 1 мг гемоглобина в мин.	14,25±0,22	17,4±0,93 P=0,0079	12,12±0,46 P=0,0019 P ₁ =0,0005	12,2±0,44 P=0,0019 P ₁ =0,0005 P ₂ =0,898	15,58±0,56 P=0,052 P ₁ =0,125 P ₂ <0,0001 P ₃ =0,0008
Гексокиназа, мкмоль НАДФН ₂ на 1 г гемоглобина в час	11,35±0,2	15,45±0,176 P<0,0001	10,45±0,099 P=0,002 P ₁ <0,0001	8,26±0,12 P<0,0001 P ₁ <0,0001 P ₂ <0,0001	12,3±0,26 P=0,0163 P ₁ <0,0001 P ₂ <0,0001 P ₃ <0,0001
Восстановленный глутатион, мкмоль на мл крови	2,62±0,16	2,88±0,14 P=0,248	1,95±0,18 P=0,019 P ₁ =0,0019	1,72±0,16 P=0,002 P ₁ =0,0002 P ₂ =0,375	2,41±0,184 P=0,4 P ₁ =0,067 P ₂ =0,099 P ₃ =0,016

Примечание: P – достоверность с 1-й группой животных; P₁ – достоверность со 2-й группой животных; P₂ – достоверность с 3-й группой животных; P₃ – достоверность с 4-й группой животных.

Таблица 2

Изменение концентрации АТФ, 2,3-дифосфоглицерата и активности Na,K-АТФазы в эритроцитах крыс при хронической интоксикации дихлорэтаном (M±m)

Исследуемый показатель	Группы животных				
	1-я группа, интактные животные (n=8)	2-я группа, 15-е сутки интоксикации и ДХЭ (n=8)	3-я группа, 30-е сутки интоксикации ДХЭ (n=8)	4-я группа, 60-е сутки интоксикации и ДХЭ (n=8)	5-я группа, интоксикация ДХЭ + коррекция НИЛИ (n=8)
АТФ, мкмоль на 1 мл эритроцитов	3,74±0,23	4,79±0,24 P=0,007	2,23±0,27 P=0,0008 P ₁ <0,0001	2,99±0,54 P=0,23 P ₁ =0,009 P ₂ =0,22	3,45±0,16 P=0,357 P ₁ <0,0001 P ₂ =0,0039 P ₃ =0,49
2,3-ДФГ, мкмоль на 1 мл эритроцитов	9,55±0,41	9,4±0,24 P=0,85	8,51±0,3 P=0,06 P ₁ =0,01	6,78±0,2 P<0,0001 P ₁ <0,0001 P ₂ =0,0003	8,9±0,5 P=0,33 P ₁ =0,177 P ₂ =0,49 P ₃ <0,001
Na,K-АТФаза, мкмоль Фн/мл эритроцитов/час	13,8±0,76	17,21±1,03 P=0,02	15,3±1,21 P=0,31 P ₁ =0,25	11,1±0,63 P=0,018 P ₁ =0,0003 P ₂ =0,0096	14,23±0,82 P=0,705 P ₁ =0,049 P ₂ =0,49 P ₃ =0,01

Примечание: P – достоверность с 1-й группой животных; P₁ – достоверность со 2-й группой животных; P₂ – достоверность с 3-й группой животных; P₃ – достоверность с 4-й группой животных.

На 30-е сутки хронической интоксикации ДХЭ энергетические возможности эритроцитов уменьшались. Содержание АТФ и 2,3-ДФГ снижалось на 40,4% ($P=0,0008$) и 10,9% ($P=0,06$) соответственно, одной из причин являлось замедление скорости гликолиза из-за уменьшения активности гексокиназы на 22,4% ($P<0,0001$) относительно 14-х суток эксперимента и на 8,0% ($P=0,002$) относительно интактных животных. С другой стороны, активность Na,K-АТФазы на 30-е сутки оставалась повышенной, превосходя контрольные показатели на 11,1% ($P=0,31$), что увеличивало расход АТФ. Так как активность гексокиназы на 30-е сутки лишь незначительно отличалась от контрольных значений, можно предположить, что снижение количества АТФ в эритроцитах на 30-е сутки в большей степени связано с повышенной работой Na,K-АТФазы. Известно, что в норме для обеспечения работы Na,K-АТФазы расходуется 15-20% АТФ, но при стимуляции активности транспорта катионов из-за увеличения проницаемости биологических мембран расход значительно увеличивается. Подавление процессов гликолиза проявлялось также в снижении активности ферментов Г-6-ФДГ и глутатионредуктазы на 30,35% ($p=0,0005$) и 24,9% ($P<0,0001$) соответственно в сравнении с 14-ми сутками эксперимента. Данные ферменты определяют процесс образования восстановленного глутатиона, уровень которого снижался на 25,57% ($P=0,019$) относительно интактных животных. Восстановленная форма глутатиона обеспечивает транспорт глюкозы внутрь эритроцита, создает его буферную систему [16]. Активность глутатионпероксидазы на 30-е сутки снижалась на 21,7% ($P<0,0001$) относительно контроля. Глутатионпероксидаза активно использует глутатион для восстановления перекиси водорода и органических перекисей и играет важную роль в защите мембраны клетки от экзогенного повреждения.

На 60-е сутки хронической интоксикации ДХЭ наблюдается снижение содержания 2,3-ДФГ на 29% ($P=0,0003$), а также АТФ на 20,05% ($P=0,22$), что может быть связано с замедлением гликолиза: активность гексокиназы угнетается на 27,22% ($P<0,0001$), а Г-6-ФДГ на 13,4% ($P=0,0019$). Значительное снижение содержания 2,3-ДФГ на 60-е сутки хронической интоксикации ДХЭ повышает сродство гемоглобина к кислороду и ухудшает оксигенацию тканей. Следует отметить, что уровень уменьшения концентрации АТФ на 60-е сутки меньше, чем на 30-е сутки, при этом активность гексокиназы на 60-е сутки хронической интоксикации ДХЭ снижена в большей степени, чем на 30 сутках. Это может быть связано с угнетением активности Na,K-АТФазы на 19,6% ($P=0,018$). Деятельность данного фермента в значительной степени зависит от состояния биологической мембраны, то есть от ее текучести и липидного окружения фермента [17]. С другой стороны, снижение активности Na,K-АТФазы может быть связано с уменьшением выработки АТФ вследствие угнетения гликолиза. В ранее проведенных исследованиях нами установлено, что при

хронической интоксикации ДХЭ наблюдаются структурные изменения клеточных мембран эритроцитов, усиливается их перекисное окисление. Переход мембран эритроцитов от высокой проницаемости на 14 сутках хронической интоксикации ДХЭ к патологическому уплотнению на 60 сутках может служить причиной снижения их деформированности [4]. Токсичные продукты ПОЛ подавляют ферменты гликолиза, разрушают АТФ [18]. Поэтому более высокое содержание АТФ на 60-е сутки в сравнении с 30-ми сутками хронической интоксикации ДХЭ на фоне значительного снижения активности гексокиназы можно расценить как результат уменьшения скорости его утилизации из-за снижения активности Na,K-АТФазы. Снижение концентрации АТФ в эритроцитах влияет на состояние антиокислительной защиты. Уменьшается скорость образования восстановленной формы глутатиона вследствие угнетения Г-6-ФДГ на 13,4% ($P=0,0019$) и глутатионредуктазы и 27,2% ($P<0,0001$) и, как следствие, подавляется глутатионпероксидазная активность эритроцитов. Это увеличивает опасность окислительного повреждения мембран и вызывает изменения их свойств, снижая способность к деформации. Известно протекторное действие восстановленного глутатиона к эритроцитарным белкам, заключающееся в восстановлении окисленных тиогрупп. АТФ поддерживает на необходимом уровне фосфорилирование мембранного белка спектрина, от которого зависит дисковидная форма эритроцитов и эластичность мембраны. Также установлено, что снижение активности 2,3-ДФГ ухудшает деформируемость эритроцитов [19].

В серии исследований у крыс определяли деформабельность и жесткость эритроцитарных мембран. Результаты экспериментов, представленные в таблице 3, свидетельствуют, что в динамике хронической интоксикации ДХЭ индекс деформабельности прогрессивно снижается. На 30-е сутки интоксикации индекс составлял 87,84% от нормы ($P=0,09$), а на 60-е сутки отравления был ниже исходного уже на 21,66% ($P=0,015$). Жесткость мембран эритроцитов, напротив, возрастала. На 30-е сутки увеличение данного показателя было недостоверным, однако на 60-е сутки хронической интоксикации ДХЭ жесткость мембран эритроцитов превышала исходный уровень на 11,9% ($P=0,01$). Уменьшение способности эритроцитов к деформации замедляет газообмен в тканях, а повышение сродства гемоглобина к кислороду ухудшает их оксигенацию, что приводит к развитию хронической гипоксии на 60-е сутки хронической интоксикации ДХЭ.

Таблица 3

Индекс деформабельности и жесткость мембран эритроцитов при хронической интоксикации ДХЭ ($M\pm m$)

Исследуемый показатель	Группы животных			
	1-я группа, интактные	3-я группа, 30-е сутки	4-я группа, 60-е сутки	5-я группа, интоксикация

	животные (n=8)	интоксикации ДХЭ (n=8)	интоксикации ДХЭ (n=8)	ДХЭ + коррекция НИЛИ (n=8)
Индекс деформабельности эритроцитов, усл. ед.	0,74±0,036	0,65±0,031 P=0,09	0,58±0,04 P=0,015 P ₂ =0,19	0,69±0,022 P=0,25 P ₂ =0,36 P ₃ =0,044
Жесткость мембран эритроцитов, %	62,75±1,89	62,87±2,05 P=0,97	70,22±1,46 P=0,01 P ₂ =0,015	63,81±1,5 P=0,67 P ₂ =0,72 P ₃ =0,012

Примечание: P – достоверность с 1-й группой животных; P₂ – достоверность с 3-й группой животных; P₃ – достоверность с 4-й группой животных.

Таким образом, при хронической интоксикации ДХЭ развивается гипоксия, формирование которой вначале связано с угнетением энергетического метаболизма и изменением свойств мембраны эритроцитов, уменьшением ее способности к деформации. Повышение сродства гемоглобина к кислороду, возникающему вследствие снижения активности 2,3-ДФГ, усиливает в дальнейшем гипоксическое состояние, замыкая порочный круг.

Применение импульсного НИЛИ в виде сочетания красного и инфракрасного излучения (длина волны 0,63 и 0,89 мкм) при хронической интоксикации ДХЭ оказывает благоприятное влияние на состояние эритроцитов. Оценку результатов на фоне применения лазерного излучения проводили на 60-е сутки эксперимента. Это позволяет оценить и эффективность, и сохранение эффектов НИЛИ. На фоне коррекции лазерным излучением содержание АТФ и 2,3 ДФГ возросло соответственно на 15,4% (P=0,49) и 31,3% (P<0,001) в сравнении с животными 4-й группы. Улучшение энергетического статуса эритроцитов связано с восстановлением активности ключевых ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути: гексокиназы и Г-6-ФДГ, активность которых возросла соответственно на 48,9% (P<0,0001) и 27,7% (P=0,0008) в сравнении с крысами 4-й группы. Важно отметить положительные изменения в активности НАДФН-зависимых ферментов глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы и увеличении содержания восстановленного глутатиона, что свидетельствует о нормализации механизмов компенсации в регуляции антиокислительной защиты мембран. Стабилизация антиоксидантной системы эритроцитов на фоне применения НИЛИ подавляет свободнорадикальные процессы на уровне мембранных компонентов, что является важным фактором восстановления активности гексокиназы и увеличения образования АТФ. Нормализация энергетического метаболизма эритроцитов, с одной стороны, а также проницаемости и липидного спектра мембран эритроцитов - с другой, данный факт был установлен нами ранее [5], восстанавливает активность мембранно-

связанного фермента Na,K-АТФазы, участвующего в распределении катионов натрия и калия между клеткой и межклеточным пространством. Известно, что осмотическая активность внутриклеточного натрия, который удерживает избыток воды, играет важную роль в регуляции объема эритроцита, влияет на его форму и способность к деформации. Применение лазеротерапии практически восстановило индекс деформабельности эритроцитов, а жесткость их мембран снизилась и лишь незначительно превосходила контрольные показатели, что в целом можно трактовать как восстановление эластичности мембран красных клеток крови.

Выводы

1. При хронической интоксикации ДХЭ угнетается энергетический метаболизм эритроцитов, их способность к деформации, повышается сродство гемоглобина к кислороду, что способствует развитию гипоксического состояния.

2. Применение импульсного НИЛИ в виде сочетания красного и инфракрасного излучения (длина волны 0,63 и 0,89 мкм) при хронической интоксикации ДХЭ оказывает благоприятное влияние на энергетический статус эритроцитов, повышает активность 2,3 ДФГ, восстанавливает эластичность их мембран и тем самым нормализует кислородное обеспечение тканей.

Список литературы

1. Забродский П.Ф., Лим В.Г. Иммунопатология при острых отравлениях спиртами и хлорированными углеводородами. Фармакологическая коррекция. Саратов, 2012. 341 с.
2. Забродский П.Ф., Громов М.С., Яфарова И.Х. Нарушение иммунного статуса при хронической интоксикации 1,2-дихлорэтаном и их коррекция полиоксидонием // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. Т.76, №8. С. 35-38.
3. Иванов Д.Ю. Нарушение иммунного гомеостаза при сочетанном действии дихлорэтана и тяжелой механической травмы: дис. ... канд. мед. наук. Саратов, 2007. 187 с.
4. Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на проницаемость и липидный спектр мембран эритроцитов у крыс при интоксикации дихлорэтаном // Фундаментальные исследования. 2012. №10-2. С. 318-323.
5. Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А. Активация процессов перекисного окисления липидов в слизистой тонкой кишки в механизмах формирования эндогенной интоксикации при длительном поступлении дихлорэтана // Фундаментальные исследования. 2014. №10-9. С. 1805-1810.

6. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Ишутина Н.А., Мироненко А.Г. Механизмы формирования гипоксии в период беременности и нарушение кровоснабжения плода при цитомегаловирусной инфекции // Вестник Российской академии медицинских наук. 2015. Т.70, №1. С. 106-112.
7. Москвин С.В., Хадарцев А.А. Методы эффективной лазерной терапии при лечении больных бронхиальной астмой (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2019. №5. Публикация 3-1. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-5/3-1.pdf> (дата обращения: 13.09.2019). DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16522.
8. Москвин С.В., Чернова Н.И. Лазерная терапия при герпесвирусных инфекциях (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2019. №4. Публикация 3-2. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-4/3-2.pdf> (дата обращения: 02/07.2019). DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16467.
9. Москвин С.В. Эффективность лазерной терапии. М.: НПЛЦ «Техника», 2014. 896 с.
10. Емельянов Д.Н., Свириденко О.Ю., Стаценко И.Ю., Мязин Р.Г. Инфракрасная лазерная терапия в лечении диффузных заболеваний печени // XVIII Российская гастроэнтерологическая неделя: материалы конференции (г. Москва, 8-10 октября 2012 г.). Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии (приложение №40). 2012. Т. XXII, №5. С. 77.
11. Срубилин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А., Исаков И.Д. Лазеротерапия при хронической интоксикации дихлорэтаном в эксперименте // Вопросы патогенеза типовых патологических процессов: труды II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (г. Новосибирск, 18-19 марта 2010 г.). Новосибирск: Издательство Новосибирского государственного медицинского университета, 2010. С. 338-342.
12. Саркисян О.Г. Биохимические механизмы урогенитальной атрофии у женщин в пострепродуктивном периоде: дис. ... докт. мед. наук. М., 2016. 239 с.
13. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Сливкин А.И. Активность некоторых НАДФН-генерирующих ферментов в тканях крыс при введении производных янтарной кислоты и хитозана в различных дозах на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга // Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. 2015. №3. С. 89-93.
14. Блинецова Г.Н. Перекисное окисление липидов, антиоксидантная система и оксид азота при токсическом поражении печени: дис. ... канд. биол. наук. Воронеж, 2004. 194 с.
15. Силиванова С.А. Активность Na,K-АТФазы эритроцитов и различных регионов головного мозга крыс при ингибировании ацетилхолинэстеразы разными дозами неостигмина // Вестник тюменского государственного университета. 2006. №5. С. 12-20.

16. Петушок Н.Э., Тарасов Ю.А., Пеховская Т.А., Евкович И.Н., Шевалье А.А., Чумаченко С.С. Эффекты органической субстанции селена – селенометионина при острой алкогольной интоксикации // Биомедицинская химия. 2011. Т.57, вып. 2. С. 180-186.
17. Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на активность Na, К-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии и реперфузии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т.13, №1. С. 260-263.
18. Ксейко Д.А., Генинг Т.П., Бочкова Е.Г., Котельников С.В., Садретдинова Л.Н., Маракаева Т.Р. Антиоксидантная резистентность эритроцитов после кровопотери и в условиях коррекции аскорбиновой кислотой // Фундаментальные исследования. 2014. №12-11. С. 2357-2360.
19. Чашкова Е.Ю., Горохова В.Г., Кузнецова Э.Э., Коротаяева Н.С., Григорьев Е.Г., Пак В.Е. Структурно-функциональные нарушения клеточной мембраны эритроцита при болезни крона // Терапевтическая гастроэнтерология. 2009. №5. С. 21-27.