

Cheremisina V. F. Reaction of adult rats' erythrocytes under gingivitis during respiratory hypoxia. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(1):468-477. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.321677>  
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4284>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 754 (09.12.2016).  
754 *Journal of Education, Health and Sport* eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland  
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.  
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.  
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.  
Received: 02.01.2017. Revised 16.01.2017. Accepted: 24.01.2017.

## REACTION OF ADULT RATS' ERYTHROCYTES UNDER GINGIVITIS DURING RESPIRATORY HYPOXIA

V. F. Cheremisina

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

[cheremishav@mail.ru](mailto:cheremishav@mail.ru)

### Abstract

The article presented results of the investigation of reactions erythrocytes under gingivitis of adult rats with respiratory hypoxia. Studied such factors as changes in the dynamics of hemoglobin, erythrocytes count and hematocrit.

Under gingivitis during respiratory normobaric hypoxia develops oxidative stress and increased generation of ROS. Changes in the number of red blood cells, hemoglobin and red blood cell indices with gingivitis by hypoxia caused to membranes destruction processes in red blood cells, a decrease in their absolute numbers due to hemolysis; changes of hematocrit due of redistribution the blood.

**Keywords: hypoxia, erythrocytes, gingivitis, hemoglobin, hematocrit.**

## **РЕАКЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ВЗРОСЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ГИПОКСИИ**

**В. Ф. Черемисина**

**Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина**

### **Реферат**

В работе представлены результаты исследования реакции эритроцитов взрослых крыс при гингивите в условиях дыхательной гипоксии. Изучены такие показатели, как динамика изменений гемоглобина, количества эритроцитов и гематокрита. При гингивите в условиях дыхательной нормобарической гипоксии развивается окислительный стресс и усиления генерации АФК. Изменения количества эритроцитов, гемоглобина и эритроцитарных индексов при гингивите в условиях гипоксии, обусловлены мембранодеструктивными процессами в эритроцитах, уменьшением их абсолютного числа вследствие гемолиза, а также изменениями гематокрита за счет перераспределения крови.

**Ключевые слова:** гипоксия, эритроциты, гингивит, гемоглобин, гематокритное число.

## **РЕАКЦІЇ ЕРИТРОЦИТІВ ДОРОСЛИХ ЩУРІВ ПРИ ГІНГІВІТІ ЗА УМОВ ДИХАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ**

**В. Ф. Черемісіна**

**Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна**

### **Реферат**

В роботі представлені результати дослідження реакції еритроцитів дорослих щурів при гінгівіті за умов дихальної гіпоксії. Вивчені такі показники, як динаміка змін гемоглобіну, кількості еритроцитів та гематокриту.

При гінгівіті за умов дихальної нормобаричної гіпоксії розвивається окиснювальний стрес та посилення генерції АФК. Зміни кількості еритроцитів, гемоглобіну і еритроцитарних індексів при гінгівіті за умов гіпоксії, обумовлені

мембранодеструктивними процесами в еритроцитах, зменшенням їх абсолютного числа внаслідок гемолізу, а також змінами гематокриту за рахунок перерозподілу крові.

**Ключові слова:** гіпоксія, еритроцити, гінгівіт, гемоглобін, гематокритне число.

**Вступ.** Найбільш чутливі до дефіциту кисню тканини, менш за все пристосовані до анаеробного засобу отримання енергії [1, 2, 3, 5, 6]. Кров, як рідка сполучна тканина організму, не тільки забезпечує взаємозв'язок всіх органів та систем, являючись індикатором стану організму, але і сама безпосередньо реагує на дефіцит кисню. Формені елементи крові: еритроцити, тромбоцити, гранулоцити, лімфоцити, плазматичні клітини і моноцити є цікавими об'єктами для вивчення при гіпоксії, тому що вони відрізняються один від одного не тільки за функціями, що виконують, але і за характером обмінних процесів, ступеню використання кисню, здатності до генерації АФК та стійкості до них. Еритроцити унікальні тим, що вони постійно контактують з киснем, транспортуючи його до всіх тканин, але не використовують кисень для себе. Еритроцити, володіючи виключно анаеробним метаболізмом, не вміщують основних киснево-потребляючих систем: мітохондрій та ендоплазматичної сітки. Утворення енергії в них відбувається шляхом субстратного фосфорилування АДФ в реакціях гліколізу, вони не здатні до синтезу білків та не мають ДНК. З іншого боку, еритроцити – це клітини, що постійно вміщують кисень в складі гемоглобіну та максимально стійкі до пошкоджуючої дії його активних форм. Постійна взаємодія з киснем викликає аутоокиснення гемоглобіну еритроцитів з утворенням су пероксид-радикалів, а також інших АФК, головним чином, перекису водню і гідроксид-радикалів [1, 3, 4, 7, 8]. Для захисту від них в еритроцитах існує потужна система антипероксидного та антирадикального захисту: СОД, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза та інші. Реакція еритроцитів при гінгівіті за умов гіпоксії не вивчена.

**Метою роботи** було дослідження реакції еритроцитів дорослих щурів при гінгівіті за умов дихальної гіпоксії.

**Матеріали та методи дослідження.** Об'єктом дослідження були еритроцити. Кров брали з хвостової вени щурів через 10-12 годин після останнього прийому їжі. У якості антикоагулянту використовували К2ЕДТА 7,2 мг (в перерахунку на масу щурів за Риболовлевим Ю.П.) [10]. Робочу суспензію еритроцитів отримували за допомогою троекратної відмивки розчином низької іонної сили Liss (виробник ТОВ «Гематолог») з режимом центрифугування при 2700 об/хв протягом 8 хвилин. Готову суспензію

еритроцитів розводили в співвідношенні 1:200. В крові визначали параметри гемограм на автоматичному гематологічному аналізаторі MINDRAY BC-3000. Вивчення параметрів гемограми вміщувало визначення кількості еритроцитів (КЕ), гемоглобіну (Hb), гематокритного числа (Ht), виражаючому вміст еритроцитів в загальному об'ємі крові (в нормі гематокритне число дорівнює 0,36 – 0,48 г/л). Середній вміст гемоглобіну у кожному еритроциті визначали за колірним показником, який розраховували шляхом поділу кількості гемоглобіну в одиницях Салі на подвоєнні перших цифр кількості еритроцитів (при їх кількості, яка перевищує один млн) [11]. Еритроцитарні індекси відповідали середньому об'єму еритроцитів ( $OE_{cp}$ ). Морфометрію еритроцитів периферичної крові досліджували для будови гістограми розподілу еритроцитів за вмістом і гемоглобіну, геометричних параметрів еритроцитів та їх статистичних характеристик [12].

Гостру нормобаричну гіпоксію моделювали по Бізенковій М. Н. [13]. Експериментальний гінгівіт моделювали в два етапи: спочатку викликали дисбактеріоз в ротовій порожнині (внутрішньошлунково введення лінкоміцину в дозі 60 мг/кг протягом 5 днів) з наступним локальним пошкодженням ясен та тканин передв'я порожнини рота аплікаціями суспензії бджолиної отрути (1 мг/кг в дозі 2 мл) [7].

Усі експериментальні дослідження проводили із дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Всі маніпуляції, які викликали біль, проводили під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг маси тіла внутрішньоочеревинно) [11] або під ефірним наркозом. Для виключення впливу сезонних та добових коливань (Золотухін С. Є. та ін., 1991) на показники, які вивчали, основні дослідження були проведені в осінньо-зимовий період у ранкові часи.

Статистичну обробку одержаних даних здійснювали за допомогою пакета програм Statistica for Windows 8,0 з використанням t-критерію Стьюдента та кореляційного аналізу. Результати вважали дійсними при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Встановлено, що при гінгівіті за умов дихальної гіпоксії в організмі щурів спостерігається посилення утворення активних форм кисню у всі терміни дослідження. Кількість ТБК-АП збільшувалося в 1,8; 4,2; 3,3 і 2,1 рази через 1, 3, 6 годин та через добу. Вважаємо, що джерелом генерації АФК при цьому є формені елементи крові, а субстратом окиснення – мембранні клітини крові, а також плазміні ліпопротеїди. Дослідження якісного і кількісного складу клітин крові в нашому експерименті встановило суттєві зсуви усіх

показників. Так, кількість еритроцитів периферичної крові в перші 30 хвилин експерименту збільшувалося на 20,9% відносно контролю, а потім знижувалося та залишалося на 8%–10% менше, ніж в контролі до 150 хвилини. В подальшому, через 3 години після початку експерименту, мало місце різке (в 2,2 рази) зменшення кількості еритроцитів, яке через добу незначно збільшилося. Однак, в цілому, концентрація КЕ в цій термін спостереження залишалося достовірно зниженою відносно контролю на 20%. Аналогічну динаміку мали зміни концентрації гемоглобіну (табл. 1).

Таблиця 1

**Динаміка змін гемоглобіну, кількості еритроцитів та гематокриту при гінгівіті за умов дихальної гіпоксії**

| Термін спостереження | Показники               |            |           |
|----------------------|-------------------------|------------|-----------|
|                      | КЕ, 10 <sup>12</sup> /л | Нв, г/л    | Нт, л/л   |
| Контроль             | 6,75±0,12               | 116,0±3,6  | 36,5±1,8  |
| 30 хв.               | 8,23±0,25*              | 125,0±2,9* | 46,0±1,2* |
| 60 хв.               | 6,1±0,18*               | 104,0±2,2* | 33,6±1,7  |
| 90 хв.               | 6,3±0,15*               | 98,0±4,1*  | 33,0±2,0  |
| 120 хв.              | 6,5±0,11*               | 100,0±3,7* | 35,1±2,2  |
| 180 хв.              | 4,1±0,46*               | 81,0±4,0*  | 23,0±3,0* |
| 6 год.               | 4,0±0,51*               | 88,0±3,6*  | 21,0±2,1* |
| 24 год.              | 4,8±0,44*               | 82,0±4,1*  | 28,0±1,1* |

*Примітка:* \* p<0,05 по відношенню до контролю.

Так, рівень Нв через 30 хвилин після початку експерименту збільшувався на 8%, а потім знижувався на 10%–15 % в наступні 120 хв., а на 180 хв. дослідження зменшення кількості еритроцитів досягало 30% відносно контролю. Через 6 годин та через добу концентрація Нв залишалася зниженою на 25% і 30% в порівнянні з контролем відповідно.

Максимальне зниження КЕ і Нв в крові за часом співпадало з піком підвищення ТБК-АП, що, скоріше за все, вказує на активний гемоліз еритроцитів в цій період. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури в тому, що при різноманітних впливах на еритроцити, зокрема, перекису водню, спостерігається окиснення і денатурація гемоглобіну (утворення так званих тілець Гейнца), яка супроводжується вивільненням гема/геміну – ферріпротопорфіна ІХ [14]. При цьому,

екзогенний гемін здатен легко вбудовуватися в мембрану, дестабілізуючи її та викликаючи гемоліз [8]. Можливо, зміни КЕ і Нб обумовлені також і коливаннями гематокритного числа, що вказує на перерозподіл крові та порушення гемодинаміки при гіпоксії. Показник гематокриту у експериментальних тварин різко збільшувався в перші 30 хвилин дослідження (на 26% відносно контролю), що свідчило про згущення крові; к 60 хв. Нт повертався до нормального рівня. Однак, через 3 години Нт різко знижувався, складаючи лише 57% від рівня контролю і, практично не відновлювався до висхідного рівня через добу, залишаючись на рівні 24% в порівнянні з контролем. Середній об'єм еритроцита не протязі доби після початку експерименту достовірно не змінювався. Разом з тим, на 90 хв. і через 180 хв.  $OE_{cp}$  був незначно знижений і тільки через добу відновлювався до рівня контролю.

Середній вміст гемоглобіну в еритроциті ( $HbE_{cp}$ ) змінювався протягом експерименту хвилеподібно: на 30 хв. цей показник знижувався (на 12% відносно контролю) та був подібним до 150 хв. дослідження (на 10%). Через добу середній вміст гемоглобіну в еритроциті практично відновлювався до висхідного рівня. Середня концентрація гемоглобіну в еритроцитах мала аналогічну динаміку, при цьому зміни цього показника були достовірними відносно контролю у всі терміни спостереження. Найменше значення  $KHbE_{cp}$  відмічено через 30 хв. після введення нітриту натрію, найбільше – через 6 годин.

Результати вивчення еритроцитарних індексів показали (табл. 2), що при гінгівіті за умов гіпоксії середній об'єм еритроцита достовірно не змінюється, тоді як середній вміст гемоглобіну в еритроциті –  $HbE_{cp}$  – і середня концентрація гемоглобіну в еритроцитах –  $KHbE_{cp}$  – зменшуються через 30 хв., а потім зростають (через 3 год. і 6 год.). При цьому через 24 години  $HbE_{cp}$  сягає рівня контролю, а  $KHbE_{cp}$  залишається зниженою.

Можливо, незначні зміни об'єму еритроцитів в сторону зменшення їх розмірів, що спостерігалось нами при гінгівіті в перші 6 годин обумовлено частковою дегідратацією та стисненням клітин за рахунок відкриття кальцій-залежних калієвих каналів (Гардос-ефект), яке відбувається під дією окиснювачів – продуктів пероксидації.

Рівень ТБК-АП в крові в ці терміни був підвищеним в 4,2 – 3,3 рази. Наше припущення засноване на даних літератури, де показано, що дія на еритроцити окиснювачів (феназин метосульфат, третбутіловий гідроперекис) призводить до активації кальцій-залежних калієвих каналів.

**Динаміка змін еритроцитарних індексів при гінгівіті за умов дихальної гіпоксії**

| Термін спостереження | Показники         |                    |                     |
|----------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
|                      | ОЕ <sub>ср.</sub> | НбЕ <sub>ср.</sub> | КНбЕ <sub>ср.</sub> |
| Контроль             | 54,1±1,2          | 17,2±0,1           | 317,0±2,7           |
| 30 хв.               | 55,9±1,6          | 15,2±0,3*          | 271,0±6,8*          |
| 60 хв.               | 55,1±1,9          | 17,1±0,4           | 309,0±10,1          |
| 90 хв.               | 52,4±1,5          | 15,5±0,4*          | 297,0±7,9*          |
| 120 хв.              | 53,9±1,5          | 15,4±0,1*          | 285,0±11,0*         |
| 150 хв.              | 55,9±1,2          | 15,0±0,4*          | 268,0±7,9*          |
| 180 хв.              | 56,0±1,3          | 19,8±0,6*          | 352,0±6,6*          |
| 6 год.               | 52,5±1,2          | 22,0±0,2*          | 419,0±6,0*          |
| 24 год.              | 58,0±1,3*         | 17,0±0,1*          | 292,0±6,3*          |

*Примітка:* \*  $p < 0,05$  по відношенню до контролю.

Автори вважають, що активація Гардос-каналів являється загальною властивістю клітинної відповіді при окислювальних впливах [12]. При зменшенні об'єму еритроцитів відбувається збільшення НбЕ<sub>ср.</sub> і КНбЕ<sub>ср.</sub>, тоді як концентрація гемоглобіну в крові знижується. В подальшому зменшення об'єму клітин змінюється його збільшенням, що обумовлено плазмолізом внаслідок глибоких мембранодеструктивних змін. На гемоліз еритроцитів вказує різке зменшення їх кількості та концентрації гемоглобіну, починаючи з 180 хвилини дослідження. Таким чином, ми вважаємо, що подібна динаміка еритроцитарних індексів обумовлена мембранодеструктивними процесами в еритроцитах, змінами їх абсолютного числа внаслідок гемолізу, а також змінами гематокриту за рахунок перерозподілу крові.

**Висновки:**

1. При гінгівіті за умов дихальної нормобаричної гіпоксії розвивається окислювальний стрес та посилення генерації АФК.

2. Зміни кількості еритроцитів, гемоглобіну і еритроцитарних індексів при гінгівіті за умов гіпоксії, обумовлені мембранодеструктивними процесами в еритроцитах, зменшенням їх абсолютного числа внаслідок гемолізу, а також змінами гематокриту за рахунок перерозподілу крові.

### Список літератури:

1. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Соровский образовательный журнал. – 2000. – Т.6, № 12. – С. 13–19.
2. Коркушко О. В. Изменения кислородтранспортной функции крови при артериальной гипоксемии у людей пожилого и старческого возраста / О. В. Коркушко, А. В. Писарук, Э. О. Асанов [и др.] // Буковинський медичний вісник. – 2011. – Т. 15, № 3 (59). – С. 200–204.
3. Романова В. Е. Влияние хронической ишемии на энергетический обмен мозга крыс с различной чувствительностью к кислородной недостаточности / В. Е. Романова, Г. Н. Чернобаев, В. В. Дудченко [и др.] // Гипоксия в медицине. – 1996. – № 3. – С. 58.
4. Чеснокова Н. П. Молекулярно-клеточные механизмы индукции свободорадикального окисления в условиях патологии / Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, М. Н. Бизенко // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 6. – С. 21–26.
5. Camillo D. G. Oxygen and life span: chronic hypoxia as a model for studying HIF-1 $\alpha$ , VEGF and NOS during aging / D. G. Camillo, G. Bianchi, M. Cacchio [et al.] // Respiratory Physiology and Neurobiology. – 2005. – Vol. 147, № 1. – P. 31–33.
6. Dorthe M. Is there a molecular connection between hypoxia and ageing? / M. Dorthe, N. Katschinski // Experimental Gerontology. – 2006. – Vol. 41. – P. 482.
7. Патент 31011 Україна, МПК (2006) А61Р 31/00А 61К35/66А 61С7/00. Спосіб моделювання гінгівіту / Левицький А. П., Селиванська Т. О., Макаренко О. А. Заявник і патентовласник: Інститут стоматології АМН України. – Бюл. 6. – 3 с.
8. Скулачев В. П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В. П. Скулачев // Соровский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 6. – С. 4–10.
9. Козлянин Н. П. Физиологическая антиоксидантная система десны и кости альвеолярного отростка в норме и при патологии / Н. П. Козлянин // Автореф. канд. биол. наук. – Киев, 1990. – 16 с.
10. Рыболовлев Ю. П. Перерасчет константы биологической активности / Ю. П. Рыболовлев, Д. П. Сидяров, Н. И. Афонин // Сб. «Токсикологические аспекты безопасности готовых лекарственных форм». – М. : Мед. книга, 1981. – С. 9.
11. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л. Н. Серов, В. В. Гацура // – М., Медицина, 2000. – 352 с.
12. Ковач І. В. Біохімічні показники сироватки крові щурів при експериментальному гінгівіті та карієсі, які викликали токсичні фактори / І. В. Ковач //



Вісник стоматології. – 2005. – № 2. – С. 11–14.

13. Бизенкова М.Н. Общие закономерности метаболических расстройств при гипоксии различного генеза и патогенетическое обоснование принципов их медикаментозной коррекции / М. Н. Бизенкова // Автореф. канд. мед. наук. – Саратов, 2008. – 25 с.

14. Нікольський І. С. Реакція системи крові на гіпоксичну гіпоксію та циркуляція гемопоетичних стовбурових клітин / І. С. Нікольський // Environment and Health. – 2012. – № 2. – С. 79–80.

### References:

1. Vladimirov Y. A. Free radicals in biological systems / Y. A. Vladimirov // Sarov educational journal. – 2000. – Vol. 6, № 12. – P. 13–19

2. Korkushko O. V. Changes in blood oxygen function in arterial hypoxemia in elderly and senile people / O. V. Korkushko, A. V. Pizaruk, E. O. Asanov [et al.] // Bukovynska medichny News. – 2011. – Vol. 15, № 3 (59). – P. 200–204.

3. Romanov V. E. Effect of chronic ischemia of brain energy exchange rats with different sensitivity to oxygen deficiency / V. E. Romanov, G. N. Chernobaev, V. V. Dudchenko [et al.] // Hypoxia in Medicine. – 1996. – № 3. – P. 58.

4. Chesnokov N. P. Molecular and cellular mechanisms of induction of freedom radical oxidation under pathologists / N. P. Chesnokov, E. Ponukalina, M. N. Bizenko // Modern problems of science and education. – 2006. – № 6. – P. 21–26.

5. Camillo D. G. Oxygen and life span: chronic hypoxia as a model for studying HIF-1 $\alpha$ , VEGF and NOS during aging / D. G. Camillo, G. Bianchi, M. Cacchio [et al.] // Respiratory Physiology and Neurobiology. – 2005. – Vol. 147, № 1. – P. 31–33.

6. Dorthe M. Is there a molecular connection between hypoxia and ageing? / M. Dorthe, N. Katschinski // Experimental Gerontology. – 2006. – Vol. 41. – P. 482.

7. Ukraine Patent 31011, IPC (2006) A61R 31 / 00a 61K35 / 66A 61S7 / 00. Method simulation gingivitis / Levitsky A. P., Selyvanska T., Makarenko O. A. applicant and the patentee: Institute of Dental Sciences of Ukraine. – Bull. 6 – 3 p.

8. Skulachev V. P. Phenomen of programmed death. The mitochondria, cells and organs: the role of reactive oxygen species / V. P. Skulachev // Sarov educational journal. – 2001. – Vol. 7, № 6. – P. 4–10.

9. Kozlyanin N. P. Physiological antioxidant system of the gums and alveolar bone in normal and pathological / N. P. Kozlyanin // Aref. of cand. biol. Sciences. – Kyiv, 1990. – 16

p.

10. Rybolovlev Y. P. Recalculation constant biological activity / Y. P. Rybolovlev, D. P. Sidlyarov, N. I. Afonin // Coll. "Toxicological safety aspects of final dosage forms." – M.: Med. book, 1981. – P. 9.

11. Sernov L. N. Elements Experimental Pharmacology / L. N. Sernov, V. V. Gatsura // – M., Medicine, 2000. – 352 p.

12. Kovach I. V. Biochemical parameters of blood serum of rats with experimental gingivitis and caries, which caused toxic factors / I. V. Kovach // Journal of Dentistry. – 2005. – № 2. – P. 11–14.

13. Bizenkova M. N. Common patterns of metabolic disorders with hypoxia of different genesis and pathogenetic substantiation of principles of their medicamental correction / M. N. Bizenkova // Aref. of cand. med. Sciences. – Saratov, 2008. – 25 p.

14. Nicholskiy I. The reaction of the blood system in hypoxic hypoxia and circulation of hematopoietic stem cells / I. Nicholskiy // Environment and Health. – 2012. – № 2. – P. 79–80.