

УДК 577.121:547.963

ИЗМЕНЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ГЕНЕРИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА IN VITRO

Ёлкина Н.М.

Процессы свободнорадикального окисления в норме осуществляются непрерывно во всех тканях и клетках живого организма. Свободнорадикальные реакции поддерживаются специальными регуляторными системами на низком стационарном уровне и принимают участие в нормальных метаболических процессах и регуляторных механизмах клетки [1].

Вместе с этим известно, что большинство заболеваний характеризуется усилением реакций перекисного окисления липидов, инициируемых активными формами кислорода (АФК) [2-4]. Активирование процессов пероксидации в клеточных мембранах ведёт к нарушению их структурной организации и нормального функционирования [1-4].

Однако, несмотря на имеющиеся в литературе данные, касающиеся изучения роли свободнорадикальных реакций в патогенезе отдельных заболеваний, до сих пор нет ясного представления о влиянии АФК на внутриклеточный метаболизм; в частности, на метаболизм эритроцитов, которые, в связи с их циркуляцией в крови, становятся удобной мишенью для действия радикалов, попадающих в русло крови из различных органов и тканей.

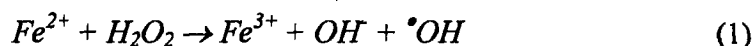
В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение отдельных биохимических показателей в эритроцитах в условиях генерирования активных форм кислорода *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты 25-ти практически здоровых людей (доноров). Эритроциты брали на станции переливания крови г. Симферополя.

Эритроциты выдерживали в среде Фентона, содержащей перекись водорода и сернокислое железо [5], в течение 2-х, 4-х и 24-х часов при температуре 37°C. После инкубации в этих условиях эритроциты отделяли центрифугированием и подвергали гемолизу [6].

Окисление Fe^{2+} в присутствии H_2O_2 составляет сущность реакции Фентона:



Образование радикала ОН запускает цепную реакцию генерирования других АФК, в частности супероксидного анион-радикала – O_2^- .

В гемолизатах эритроцитов определяли содержание гемоглобина [7], метгемоглобина [7], глюкозы [8] и гликозилированного гемоглобина [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали исследования (табл. 1), при инициации окислительных реакций *in vitro* в эритроцитах возрастает содержание гемоглобина: на 8,2 % через 2 часа инкубации в среде Фентона, на 16,7 % - через 4 часа инкубации и на 25,8 % – через 24 часа инкубации по сравнению с контролем (эритроциты доноров без инкубации в среде Фентона).

Поскольку в эритроцитах помимо цитозольной фракции гемоглобина присутствует фракция, связанная с внутренней поверхностью плазматической мембраны [10], можно предположить, что высвобождение части этой фракции белка и является причиной роста процентного содержания гемоглобина в исследуемых гемолизатах. Последнее обстоятельство может быть связано со структурными изменениями в эритроцитарной мембране, обусловленными действием активных форм кислорода [11].

Рост содержания гемоглобина в эритроцитах сопровождался увеличением уровня его окисленной формы – метгемоглобина. Через 2 часа инкубации в среде Фентона содержание мет-формы гемоглобина увеличивалось почти на 22 %, через 4 часа – на 34 % и через 24 часа – в 2,5 раза по сравнению с контролем. При этом динамика роста уровня метгемоглобина была значительно выше увеличения содержания гемоглобина, особенно через 24 часа инкубации эритроцитов, что свидетельствует о нарастающем ходе генерирования активных форм кислорода в самих эритроцитах.

Вместе с этим, в гемолизатах эритроцитов отмечалось закономерное снижение уровня глюкозы и гликозирированного гемоглобина (табл. 2).

Таблица 1.

Содержание гемоглобина и метгемоглобина в эритроцитах в зависимости от времени их инкубации в среде Фентона

Объект исследования	Гемоглобин, г/л	Метгемоглобин, %
Контроль (до инкубации в среде Фентона)	150,20 ± 0,76	2,50 ± 0,03
Инкубация в среде Фентона в течение:		
2-х часов	162,50 ± 1,5*	3,040 ± 0,1034*
4-х часов	175,30 ± 1,4*	3,350 ± 0,044*
24-х часов	188,90 ± 2,9*	6,150 ± 0,10*

Примечание: * - достоверность различий показателей по сравнению с контролем.

ИЗМЕНЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Таблица 2.

Содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина в эритроцитах в зависимости от времени их инкубации в среде Фентона

Объект исследований	Глюкоза, ммоль/л	Гликозилированный гемоглобин, %
Контроль (до инкубации в среде Фентона)	$4,51 \pm 0,03$	$4,05 \pm 0,11$
Инкубация в среде Фентона в течение: 2-х часов	$3,84 \pm 0,20^*$	$3,20 \pm 0,09^*$
4-х часов	$2,71 \pm 0,11^*$	$2,87 \pm 0,07^*$
24-х часов	$0,25 \pm 0,02^*$	$2,31 \pm 0,07^*$

Примечание: обозначения для * те же, что и в табл. 1.

Так, если до инкубации эритроцитов в среде Фентона содержание гликозилированного гемоглобина составляло $4,05 \pm 0,11$ %, то через 24 часа инкубации содержание этой формы гемоглобина снижалось до $2,31 \pm 0,07$ %, что в 1,75 раза меньше по сравнению с исходным показателем.

Изменения уровня глюкозы имели более выраженный характер через 4 часа и, особенно, через 24 часа инкубации эритроцитов.

Этот факт может свидетельствовать либо о распаде молекул глюкозы под действием АФК, либо об усилении процессов утилизации данного субстрата в условиях активизации свободно-радикальных реакций в эритроцитах.

ВЫВОДЫ

1. В условиях генерирования активных форм кислорода в изолированных эритроцитах увеличивается содержание гемоглобина и метгемоглобина, что свидетельствует о возможности высвобождения мембраносвязанной фракции гемопротейна и усилении окислительных реакций.

2. Инкубация эритроцитов в среде Фентона сопровождается снижением уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина. Одной из причин резкого снижения уровня глюкозы через 24 часа инкубации может быть распад основного энергетического субстрата эритроцитов под действием АФК. Не исключается также возможность усиления процессов метаболизации глюкозы, направленных на поддержание целостности эритроцитарных клеток и сохранение их функциональной активности.

Список литературы

1. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Т. Перекисное окисление липидов мембран // Успехи химии. – 1985. – Т. 54, № 9. – С. 1540-1580.
2. Блюгер А.Ф., Дубник А.Б., Майорев А.Я., Ноздрукова Н.А., Миезе Н.Э. Интенсивность перекисного окисления липидов и его связь с изменениями состава и антиокислительных свойств липидов при остром вирусном гепатите // Вопр. мед. химии. – 1985. – Т. 31, № 5. – С. 35-38.
3. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 1. – С. 25-30.

4. Кулагин Ю.И., Левачёв М.М., Сюрин А.А., Лупанович В.Л. Перекисное окисление и особенности жирнокислотного состава липидов клеточных мембран у больных гипертонической болезнью // *Вопр. мед. химии.* – 1989. – Т. 35, № 3. – С. 129-132.
5. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порогов И.Т. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // *Вопр. мед. химии.* – 1995. – Т. 41, № 5. – С. 35-38.
6. Drabkin D. A simplified technique for large crystallization of haemoglobin in the crystalline // *Ann. N. S. Acad. Sci.* – 1964. – V. 121, № 11. – P. 404-407.
7. Кушаковский М.С. Метгломобинемин // *Справочник по функциональной диагностике.* – М.: Медицина. – 1970. – С. 423-427.
8. Колб В.Т., Камышников В.С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. – 311 с.
9. Данилова Л.А., Лопатина Н.И. Колориметрический метод определения гликозилированных гемоглобинов // *Лаб. дело.* – 1986, № 5. – С. 281-283.
10. Козаков В.А., Коробов В.Н. Молекулярные механизмы адаптации транспортной системы кислорода к условиям кислородной недостаточности. – Киев, УТК ВО. – 1990. – 62 с.
11. Єраносян Х.В., Коношеико С.В., Касперова Т.О. Ліпідний спектр мембран еритроцитів за умов ініціації оксидативного стресу // *Матер. Установчого з'їзду Укр. товариства клітинної біології (м. Львів).* – 2004. – С. 54.

Поступила в редакцію 21.11.2005 г.