

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕРИТРОЦИТАРНИХ МЕМБРАН ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ ЗА АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ L-АРГІНІНУ ТА L-NAME

Н. В. Єфіменко, К. П. Дудок, Н. І. Климишин, Н. О. Сибірня

Кафедра біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка

Проаналізовано перерозподіл різновікових популяцій еритроцитів і стійкість їхніх мембран до кислотного гемолітика в нормі і за умов алкогольної інтоксикації на фоні введення L-аргініну або L-NAME. Виявлено, що за умов алкогольної інтоксикації еритроцити стають неефективним наслідком інтенсивного гемолізу еритроцитів у руслі крові. Показано позитивний стабілізуючий вплив L-аргініну на мембрани еритроцитів периферичної крові за алкогольної інтоксикації. Введення L-NAME зумовлювало незначне підвищення стійкості еритроцитарних мембран за умов цієї патології, що пов'язано з безпосереднім інгібуванням NO-синтази і, як наслідок, зменшенням мембранотоксичного ефекту утвореного пероксинітриту.

Етанол — речовина, що поєднує в собі властивості природного метаболіту для організму людини — у малих концентраціях і токсичного ксенобіотика — у надмірних.

Винятковий вплив екзогенного етанолу полягає в його високій хімічній активності і реакційній здатності. Він вступає у реакції з природними сполуками, інгібує і змінює напрямок біохімічних процесів, виснажує ферментні системи. Оскільки молекули етанолу не володіють тканинною специфічністю, то негативні наслідки відображаються на фізіологічному стані всього організму [13].

Стан мембран є одним з найважливіших факторів підтримки гомеостазу та правильного протікання біохімічних і фізіологічних процесів в клітинах, бо регуляція метаболізму клітини і його адаптаційна реорганізація у відповідь на різні впливи значною мірою пов'язані з фізико-хімічними процесами, що відбуваються в її мембрані [4, 10].

У випадку хронічного надходження етанолу у високих концентраціях, основні пошкоджувальні ефекти на стан біомембран здійснюють токсичні інтермедіати, що утворюються у процесі біотрансформації алкоголю такі, як гідроксиетил-радикали, супероксидний аніон-радикал, гідроксильний радикал, синглетний кисень та NO, які мають неспарений електрон і є надзвичайно реакційноздатними [13, 17]. Основний цитотоксичний агент — пероксинітрит утворюється внаслідок взаємодії NO з супероксид-аніон-радикалом $O_2^- + NO \rightarrow OONO^-$ [15, 19].

Пероксинітрит — сильний окисник, за дії якого в організмі створюються умови для інтенсивної генерації радикальних продуктів, таким чином підвищуючи окисну деструкцію ліпідів та білків, що, у свою чергу, супроводжується порушенням структури і функції клітинних мембран [10].

А. Wróbel і співавтори [19] вважають, що утворений в організмі пероксинітрит відіграє важливу роль у формуванні осмотичного стресу і гемолізу еритроцитів за умов дії ксенобіотиків-окисників.

Порушення метаболізму еритроцитів, зниження рівня АТФ, відновленого глутатіону, активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які виникають внаслідок вживання алкоголю, призводять до утворення білок-білкових зшивок у мембрані, що, в свою чергу, підвищує її

жорсткість і не здатність до деформації [19]. Такі еритроцити не проходять через фільтр селезінки, застрягають в ньому і гинуть, поглиблюючи тканинну гіпоксію [4, 13, 17].

Фізіологічною нормою вважається наявність в руслі периферичної крові різновікових популяцій еритроцитів, але за умов даної патології відбувається їхній перерозподіл, що відображає руйнівний вплив на мембрани як етанолу, так і його метаболітів. Власне структурні зміни мембран є підґрунтям пришвидшеного зістаріння еритроцитів. Старіючі еритроцити руйнуються усередині судин (внутрішньосудинний гемоліз) або ж стають мішенню для макрофагів, які руйнують їх в селезінці, купферівських клітинах печінки і в кістковому мозку (позасудинний або внутрішньоклітинний гемоліз). Відомо, що за фізіологічної норми внутрішньоклітинним гемолізом за добу руйнується 80–90 % старих еритроцитів, що містять 6-7 г гемоглобіну, тоді як внутрішньосудинним гемолізом — майже 10–20 % еритроцитів.

Вважають, що система L-аргінін/NO бере участь у формуванні киснево-транспортної функції крові, таким чином впливаючи на основну функцію клітин еритроциту. Відомо, що Нв в еритроцитах містить унікальну фракцію β -цис-93-тіолових сполук, які забезпечують транспорт і вивільнення NO [14]. Власне регуляторні ефекти NO опосередковані зміною деформування мембран еритроцитів [15]. Підвищення жорсткості мембрани сприятиме зниженню деформації еритроцитів, що в свою чергу супроводжуватиметься завищеним внутрішньосудинним гемолізом. Тому, якщо не буде забезпечена мембранна цілісність еритроцитів, то відповідно баланс оксигемоглобіну/ метгемоглобіну/ дезоксигемоглобіну буде порушений, а, як наслідок, виникне ускладнення патологічного гіпоксичного стану. Підвищення потужності NO-продукуючих систем сприяє формуванню адаптації різних систем організму [19].

Зважаючи на вищезазначене, метою даного дослідження було виявлення змін перерозподілу різновікових популяцій еритроцитів і стійкості еритроцитарних мембран щурів до кислотного гемолітика, за умов тривалої алкогольної інтоксикації, та корекції цього стану шляхом введення основного субстрату NO-синтази - L-аргініну та інгібітора цього ферменту L-NAME.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на безпородних білих щурах із початковою масою 200–250 г. Експерименти проводили згідно з національними “Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах”, ухваленими Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, Франція, 1985). Всі тварини отримували стандартний раціон віварію [7].

Експериментальну алкогольну інтоксикацію у щурів викликали щоденним введенням етилового спирту протягом 14 днів per os у дозі 6 г/кг маси тіла [1, 2]. Контрольним щурам вводили еквівалентний за калорійністю розчин глюкози у дозі 10,2 г/кг, для збереження енергетичної цінності раціону.

Окремо виділили ще чотири групи тварин: контрольні і алкоголізовані щури, які споживали щоденно впродовж 14 днів із питною водою L-аргінін (“Reanal”, Угорщина) у концентрації 1,25 г/л або L-NAME (“Sigma”, США) у концентрації 70 мг/л.

Резистентність еритроцитів до кислотного гемолізу досліджували за методом Терскова і Гітельсона [9, 12]. Різновікові популяції еритроцитів отримували методом фракціонування клітин у градієнті густини сахарози. У колонку поміщали 0,5 мл еритроцитарної суспензії. Колонку нахилили під кутом 60° і по стінці обережно почергово нашаровували по 2 мл розчину сахарози, починаючи з розчину із найбільшою концентрацією — 30 %, далі, відповідно: 26; 22; 18; 14, 10, 6 %. Колонку знову закріплювали вертикально. Таким чином отримували сім клітинних фракцій. Фракції були об’єднані у три популяції: перша популяція — „фізіологічно старі” еритроцити; друга популяція — „фізіологічно зрілі”; третя популяція — „фізіологічно юні”. Перерозподіл величини різновікових популяцій червоних клітин крові визначали

спектрофотометрично при червоному світлофільтрі та довжині хвилі $\lambda = 630$ нм за процентним вмістом [3].

Результати обробляли методами варіаційної статистики з визначенням вірогідності змін за t-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця при $P < 0,05$.

Результати та обговорення. Стабільний фізіологічний рівень кількості еритроцитів в організмі забезпечується системою еритрону — складним комплексом клітин, до складу якого входять ранні гемопоетичні клітини-попередники; комітовані клітини еритроїдного ряду кісткового мозку, що мають ядра, на різних етапах диференціювання; ретикулоцити кісткового мозку та крові; еритроцити периферичної крові.

Для диференціації отриманих при фракціонуванні у градієнті густини сахарози еритроцитарних популяцій у віковому аспекті проводили цитологічний контроль на вміст ретикулоцитів. Еритроцити кожної досліджуваної групи тварин були об'єднані у три популяції: перша популяція — „фізіологічно старі” еритроцити містила 0–5 % ретикулоцитів; друга популяція — „фізіологічно зрілі” — 12–15 %; третя популяція — „фізіологічно юні” — 20–35 % ретикулоцитів.

За алкогольної інтоксикації встановлено збільшення у 2 рази популяції «фізіологічно старих» еритроцитів, найменш стійких до агресивних чинників, відносно контролю. Це свідчить про скорочення тривалості життя еритроцитів та їх передчасний гемоліз у руслі крові. При цьому кров або суспензія еритроцитів перетворюється на прозору червону рідину («лакова кров»), що часто спостерігається у хворих на хронічний алкоголізм.

За умов алкогольної інтоксикації спостерігається виснаження еритроїдного ростка, проте в організмі лише незначно знижується кількість фізіологічно «зрілих» еритроцитів від $68 \pm 1,65$ % у контролі до $65,5 \pm 0,83$ %. Кількість фізіологічно «юних» еритроцитів зменшується на 5 % відносно контролю. Така кількість фізіологічно «зрілих» еритроцитів необхідна для підтримання певного рівня постачання киснем тканин за даної патології і є результатом виснажливої роботи системи еритрону у кістковому мозку.

При споживанні контрольними щурами L-аргініну спостерігали збільшення лише фізіологічно «зрілих» еритроцитів. Споживання L-NAME контрольними щурами сприяло збільшенню процентного вмісту фізіологічно «старих» та «зрілих» еритроцитів, тоді як популяція «юних» еритроцитів достовірно знижувалася.

Введення L-аргініну щурам з алкогольною інтоксикацією сприяло збільшенню процентного вмісту фізіологічно «зрілих» та «юних» еритроцитів. Подібний ефект спостерігався і при введенні L-NAME при AI (табл. 1).

Таблиця 1

Співвідношення різновікових популяцій еритроцитів в нормі та за умов алкогольної інтоксикації (n=36)

Популяції	К	AI	К + L-аргінін	AI + L-аргінін	К + L-NAME	AI + L-NAME
Фізіологічно «старі», %	$8,32 \pm 0,63$	$16,5 \pm 0,33^*$	$7,21 \pm 0,12$	$10,55 \pm 0,61^{**}$	$10,4 \pm 1,03^*$	$11,6 \pm 0,65^{**}$
Фізіологічно «зрілі», %	$68 \pm 1,65$	$65,5 \pm 0,83$	$71,9 \pm 1,34$	$69,6 \pm 1,32$	$71,1 \pm 1,52^*$	$69,4 \pm 0,65$
Фізіологічно «юні», %	$23,7 \pm 1,1$	$18,3 \pm 0,65^*$	$20,9 \pm 1,22$	$19,9 \pm 1,02^{**}$	$18,4 \pm 1,63^*$	$19,1 \pm 0,63^{**}$

Примітка: у цій і наступній таблиці: * – різниця вірогідна, порівняно з показниками в контролі, $P < 0,05$;
** – різниця вірогідна, порівняно з показниками в досліді, $P < 0,05$

Різне збільшення відсоткового вмісту фізіологічно «старих» та одночасне зменшення «юних» еритроцитів є етіологічною причиною розвитку анемії чи її поглиблення на клітинному рівні за алкогольної інтоксикації.

Стійкість клітини до дії пошкоджувальних факторів може виступати критерієм фізико-хімічного стану її мембрани та стану організму в цілому. Мірою стійкості еритроцита є час, протягом якого він не лізується.

Вважається, що клітинна мембрана є критичною мішенню в механізмах рН-індукованого гемолізу, а за алкогольної інтоксикації порушується кислотно-лужний баланс крові, у бік ацидозу [5, 6]. Лізис еритроцитів у кислотному середовищі включає три основні стадії: проникнення йонів водню через плазматичну мембрану, протонування гемоглобіну, й, як наслідок, осмотичне руйнування червоних клітин [9]. Згідно з експериментальними дослідженнями на завершальній стадії цього процесу суттєвого значення набуває денатурація та наступна агрегація мембранних білків [6, 18]. У результаті досліджень еритроцитів крові щурів методом кислотних еритрограм отримано криві гемолізу, які відображають динаміку змін вікового складу популяції еритроцитів (рис. 1 а, табл. 2).

Проаналізовано, що за умов алкогольної інтоксикації збільшується кількість еритроцитів з пониженою стійкістю до гемолітика. Кількість прогемолізованих еритроцитів збільшується від $31 \pm 1,03$ % у контролі до $36,7 \pm 1,02$ % при АІ, при цьому час максимального гемолізу зменшується в 1,7 рази відносно контролю (табл. 2). Це зумовлено прямою цитотоксичною дією етанолу та його метаболітів на мембрану еритроцитів *in vivo*. Визначальною у стабільності еритроцитарних мембран є дія ацетальдегіду, оскільки саме він утворює комплекси з мембранозв'язаними білками і з цитохромами, які виступають в якості неоантигенів — нових антигенних детермінант, провокуючи таким чином імунні реакції. При введенні L-аргініну кількість прогемолізованих еритроцитів зменшується від 36,7 % за алкогольної інтоксикації до 30 % (табл. 2). Зміщення еритрограми праворуч за умов алкогольної інтоксикації на фоні введення L-аргініну свідчить про появу більш резистентних до дії кислотного гемолітика молодих еритроцитів і вказує на стабілізуючу дію цього чинника на еритроцитарні мембрани (рис.1 б). Тоді як, при введенні L-аргініну контрольним тваринам не спостерігалися достовірні відмінності порівняно з тваринами, яким L-аргінін не вводили і відповідає нормобластичному типу кровотворення.

При споживанні розчину L-NAME контрольними тваринами спостерігали скорочення часу сферуляції, що проявлялося у зміщенні еритрограми вліво порівняно з контролем (рис. 1 б). Пік гемолізу спостерігався на 4,3 хв, вміст прогемолізованих еритроцитів у цей момент становив 37 %. Зниження стійкості популяції еритроцитів до кислотного гемолізу зумовлене пришвидшеним зістаренням цих клітин крові у відповідь на введення L-NAME. Однак, при введенні L-NAME на фоні алкогольної інтоксикації спостерігали незначний зсув еритрограм праворуч, хоч час тотального гемолізу залишався досить низький (рис. 1 в). Часткове зростання резистентності еритроцитів у цій дослідній групі свідчить про цитостатичну дію цієї сполуки на функціональні параметри мембран клітин.

Таблиця 2

Показники стійкості еритроцитів до кислотного гемолітика в нормі та за умов алкогольної інтоксикації (n=36)

Показники	Час максимального гемолізу, хв	Час гемолізу, хв	Максимальна кількість прогемолізованих еритроцитів, %
Контроль (К)	$5,22 \pm 0,23$	$7,0 \pm 0,1$	$31 \pm 1,03$
К + L-arginine	$5,55 \pm 0,15$	$7,9 \pm 0,12$	$33 \pm 1,1$
К + L-NAME	$4,3 \pm 0,60$	$7,3 \pm 0,24$	$37 \pm 1,4^*$
Алкогольна інтоксикація (АІ)	$3,07 \pm 0,04^*$	$5,0 \pm 0,15^*$	$36,7 \pm 1,02^*$
АІ+ L-arginine	$4,37 \pm 0,19^{**}$	$8,3 \pm 0,1^{**}$	$30 \pm 1,25^{**}$
АІ + L-NAME	$4,15 \pm 0,1^{**}$	$6,5 \pm 0,2^{**}$	$33 \pm 2,5^{**}$

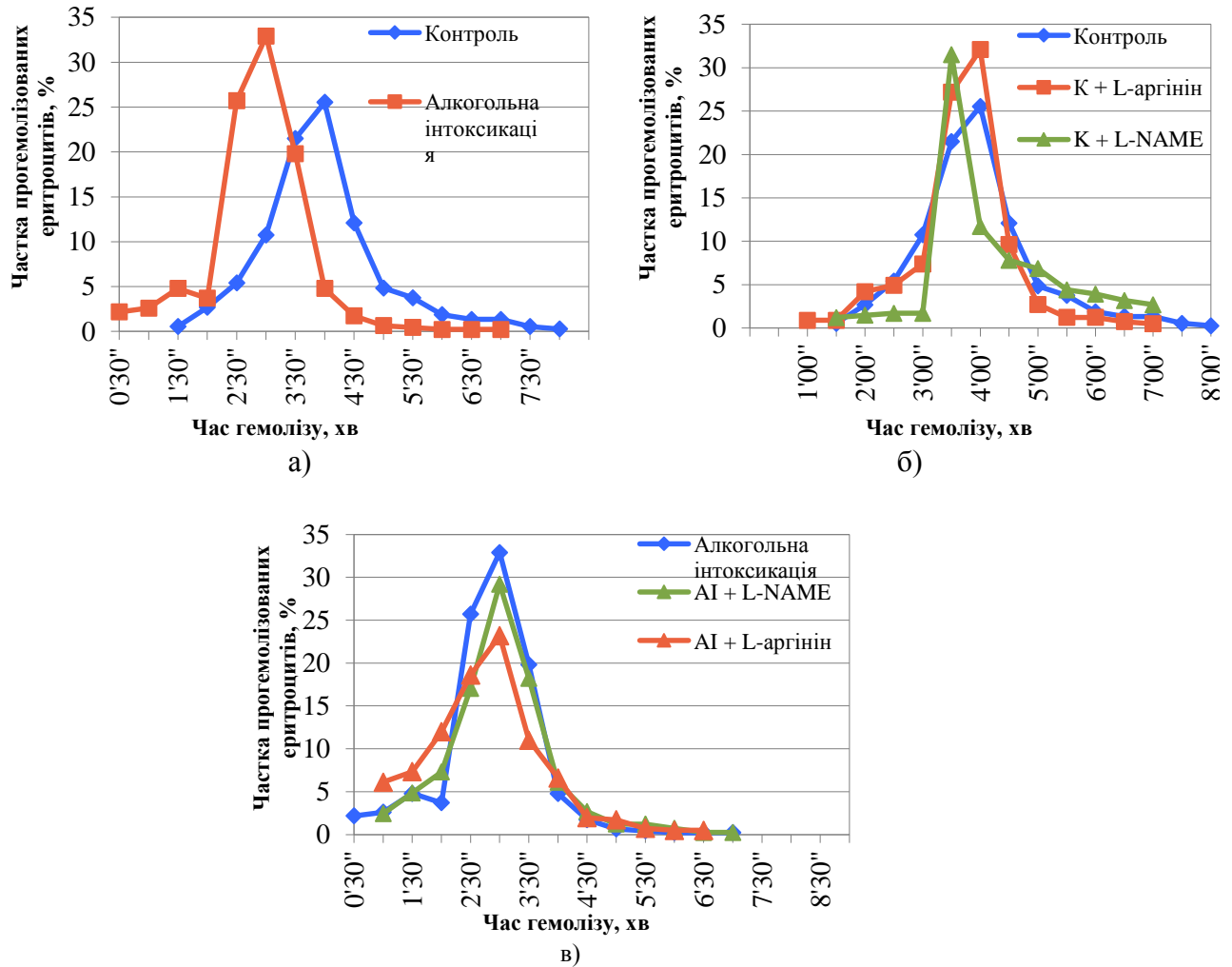


Рис. 1. Типові криві стійкості еритроцитів периферичної крові щурів до кислотного гемолітика за умов введення L-аргініну та L-NAME на фоні алкогольної інтоксикації.

ВИСНОВКИ

Аналізуючи отримані дані встановлено, що якісний склад еритроцитів крові щурів за алкогольної інтоксикації тотально змінюється, посилюються деструктивні зміни у мембранах еритроцитів, відбувається виснаження еритроцитарно-продукуючої здатності кісткового мозку. За цих умов пришвидшене старіння клітин є пусковим механізмом дисбалансу еритроцитарного гомеостазу, що проявляється в зміні перерозподілу популяцій червоних клітин у циркуляторному руслі, фізико-хімічними змінами властивостей мембран еритроцитів, а саме у їхній зниженій опірності до гемолізуючих агресивних чинників, якими є етанол та його метаболіти.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати доцільно використати у клінічній практиці з метою встановлення ступеня ураження компонентів периферичної крові за алкогольної інтоксикації.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN PERIPHERAL BLOOD OF RAT BY ALCOHOLIC INTOXICATION UNDER INTRODUCTION TO L-ARGININE AND L-NAME

N. V. Yefimenko, K. P. Dudok, N. I. Klymyshyn, N. O. Sybirna

Department of Biochemistry, Ivan Franko National University of Lviv

S U M M A R Y

Erythrocyte populations uneven redistribution and their resistance to acid hemolytic membranes in normal and alcohol intoxication under of the introduction of L-arginine or L-NAME has been analyzed. Under alcohol intoxication becomes ineffective erythropoiesis due to intense hemolysis of red blood cells in the bloodstream, it was found. It was shown that L-arginine has positive stabilizing effect on the membrane of red blood cells in peripheral blood under alcohol intoxication. Whereas the introduction of L-NAME exerts testify that a slightly increase in the stability of erythrocyte membranes under the conditions of this disease, which is associated with direct inhibition of NO-synthase and decrease toxic effect formed by peroxynitrite on membranes.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ L-АРГИНИНА И L-NAME

Н. В. Ефименко, К. П. Дудок, Н. И. Климишин, Н. О. Сибирная

Кафедра биохимии Львовского национального университета имени Ивана Франко

А Н Н О Т А Ц И Я

Проанализировано перераспределение различных возрастных популяций эритроцитов и стойкость их мембран к кислотному гемолизу в норме и при алкогольной интоксикации на фоне введения L-аргинина или L-NAME. Выявлено, что при алкогольной интоксикации эритропоэз становится неэффективным вследствие повышенного гемолиза эритроцитов в крови. Показано положительное стабилизирующее влияние L-аргинина на мембраны эритроцитов периферической крови при алкогольной интоксикации. Введение L-NAME приводило к незначительному повышению стойкости эритроцитарных мембран в условиях этой патологии, что видимо связано с непосредственным ингибированием NO-синтазы и как следствие уменьшением мембранно-токсического эффекта образованного пероксинитрита.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Буров Ю. В. Нейрохимия и фармакология алкоголизма / Ю. В. Буров, Н. Н. Ведерникова // М.: Медицина, 1985. — 237 с.
2. Буров Ю. В. Моделирование хронического алкоголизма и пути поиска средств для его лечения // Всесоюзный симпозиум "Новые отечественные препараты, применяемые в психиатрии и наркологии". Тезисы, доклады. — М.: Наука, 1981. — С.17–18.
3. Дудок К. П. Радіобіологія / К. П. Дудок, Л. С. Старикович, Л. О. Дацюк // Навч.-методичн. посібник. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. — 2007. — 118 с.
4. Васильева Е. М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомед. химия. — 2005. — Т.51, вып.2. — С. 118–126.

5. *Иванов И. Т.* Сравнение механизмов кислотного и щелочного гемолиза эритроцитов человека // *Биофизика*. — 2001. — Т. 46, вып. 2. — С. 281–290.
6. *Иванов И. Т.* Агрегация денатурированных мембранных белков – начальный этап кислотного гемолиза / И. Т. Иванов, Ю. Д. Данилова // *Биофизика*. — 1991. — Т. 36, вып. 5. — С. 839–843.
7. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // *Ланималогия*. — 1993. — № 1. — С. 29.
8. *Меерсон Ф. З.* Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшенникова // М.: Медицина, 1988. — 252 с.
9. *Поэтова В. Т.* Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов / В. Т. Поэтова, И. И. Гительзон, И. А. Терсков // М., 1967. — С. 81–85.
10. *Семко Г. А.* Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе / Г. А. Семко // *Укр. биохим. журн.* — 1998. — 70, № 3. — Р. 113–118.
11. *Сторожок С. А.* Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу / С. А. Сторожок, Л. Ф. Панченко, Ю. Д. Филиппович, В. С. Глушков // *Вопр. мед. химии*. — 2001. — № 2. — С. 42–51.
12. *Терсков И. А.* Эритрограммы как метод клинического исследования крови / И. А. Терсков, М. И. Гительзон // Красноярск: Изд-во Сиб. отд. АН СССР, 1959. — 246 с.
13. *Bizzaro N.* Alcohol induced burrcell (echinocytic) haemolytic anaemia and haemochromatosis / N. Bizzaro, I. Piazza, G. Baldo, A. Baritussio // *Clin. Lab. Haematol.* — 1993. — V. 15. — P. 93–102.
14. *Low P. S., Waugh S. M., Zince K.* The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging // *Science*. — 1985. — V. 227. — P. 531–533.
15. *Reiter C. D., Wang X., Tanus Santos J. E.* Cell free hemoglobin limits nitric oxide biavailability in sicklecell disease // *Cell. Mol. Biol. Lett.* — 2003. — № 8 (2). — P. 455–460.
16. *Resat O.* N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in the rat / O. Resat, T. Veysel // *World J. Gastroenterol.* — 2003. — Vol.9, №1 — P. 125–128.
17. *Sato Y.* Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator / Y. Sato, S. Kamo, T. Takahashi, Y. Suzuki // *Biochemistry*. — 1995. — V. 34. — P. 8940–8949.
18. *Weight L. M.* Haemolytic effects of exercise / L. M. Weight, M. J. Byrne, P. Jacobs // *Clin. Sci. (London)*. — 1991. — Vol. 81. — P. 147–152.
19. *Wrobel A., Lukaszynska B., Kedzierska G.* The effect of peroxynitrite and some antioxidants on the rate osmotic hemolysis of bovine erythrocytes / A. Wrobel, B. Lukaszynska, G. Kedzierska // *Nath. Med.* — 2003. — V. 9(5). — P. 481–483.