

© Яніцька Л.В.

УДК: 616.155.1:577.352.4:615.91]-085

Яніцька Л.В.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра біоорганічної та біологічної хімії (просп. Перемоги, 34, м. Київ, Україна, 03057)

## ЗМІНИ ГЕМОЛІТИЧНОЇ СТІЙКОСТІ ТА ПРОНИКНОСТІ ЕРИТРОЦИТАРНИХ МЕМБРАН ПРИ ТОКСИЧНОМУ УРАЖЕННІ 1,2-ДИХЛОРЕТАНОМ ТА КОРЕКЦІЇ НІКОТИНАМІДОМ

**Резюме.** Досліджено суттєву активацію, за умов гострої інтоксикації щурів нейротоксичним ксенобіотиком 1,2-дихлоретаном, процесів пероксидного окислення ліпідів та білків еритроцитів отруєних тварин. Доведено цитопротекторний ефект коферментного вітаміну - нікотинаміду за дії високотоксичних промислових отрут.

**Ключові слова:** 1,2-дихлоретан, ксенобіотик, нікотинамід, еритроцит, гемоліз, перекисне окислення ліпідів.

### Вступ

За даними провідних вітчизняних та зарубіжних токсикологів, отруєння хлоралканами посідають друге - третє місце в структурі гострих інтоксикацій населення різними ксенобіотиками, а серед хлоралканів провідне місце (близько 90% всіх випадків гострих отруєнь) [Губський, 2001]. Фізико-хімічні властивості мембран еритроцитів обумовлюють їх стійкість по відношенню до дії ушкоджуючих факторів [Коломієць, 1998; Сторож, 1996]. Лізис еритроцитів в кислотному середовищі включає три стадії: проникнення іонів водню через плазматичну мембрану, протонування гемоглобіну та осмотичне руйнування еритроцитів. Кінетика їх гемолітичної трансформації описує стадії набухання, сферуляції (набування сферичного стану) та власне лізису [Заводник, 1997; Гроховський, 2003]. Тому показники стійкості еритроцитів широко використовуються в експериментальній медицині з метою характеристики їх функціонального стану [Шакиров, 2003; Сухомлинов]. Активація пероксидного окислення ліпідів та окисна модифікація білків, які відбуваються за отруєння 1,2-ДХЕ ведуть до руйнування біомембран, що проявлялося у посиленні кислотного гемолізу еритроцитів.

**Мета** - дослідити зміни гемолітичної стійкості та проникності еритроцитарних мембран при токсичному ураженні 1,2-дихлоретаном та корекції нікотинамідом.

### Матеріали та методи

Досліди проведені на 50 щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 180-200 г. Одноразово внутрішньошлунково вводили 1,2-ДХЕ - 3,0 мл/кг маси тіла 25% розчину на рослинній олії. Застосовані дози хлоралканів склали близько 1/2 ЛД<sub>50</sub> для відповідних сполук (звіти ІФТ).

Гемоліз еритроцитів проводили шляхом додавання двох об'ємів +40°С дистильованої води та двократного заморожування і відтаювання клітин у рідкому азоті. Гемолізат відділяли від строми та незруйнованих клітин шляхом центрифугування 5 хв. при 3000 [Сизова, 1980].

Принцип методу розділення полягає в розподілі еритроцитів згідно їх щільності [Сибірна, 1997]. Еритроцити розділяють за градієнтом щільності з утворенням, чітко видимих чотирьох фракцій, які відбирають та фотомет-

рують при довжині хвилі 520 нм. Сума екстинкцій всіх фракцій складає 100%.

Функціональний стан плазматичної мембрани еритроцитів оцінювали за кислотною резистентністю, використовуючи кінетичний метод [Заводник, 1997].

Метод дає можливість оцінити внесок різних чинників у кінетику траєкторії протону через плазматичну мембрану еритроцитів та визначити співвідношення між різними за кислотною стійкістю, формами еритроцитів. Підрахунок числа еритроцитів проводили в камері Горяєва.

Проникність еритроцитарної мембрани (еритроцитарного індексу інтоксикації) визначали методом, в основі якого лежить здатність мембрани еритроцитів поглинати деякі барвники, яка значно змінюється при порушеннях структури еритроцитарної мембрани [Фіра, 2003].

### Результати. Обговорення

Проведені дослідження стійкості різновікових популяцій еритроцитів до дії кислотного гемолітика та загальної, неспецифічної проникності еритроцитарної мембрани.

Показано (табл. 1), що за умов інтоксикації 1,2-ДХЕ суттєво зростала швидкість лізису еритроцитів, час максимуму гемолізу не фракціонованих еритроцитів периферичної крові піддослідних щурів зменшувався на 43%. Одночасно скорочувалась на 0,5 хв. тривалість сферуляції - передгемолізного перетворення форми еритроцитів (набування еритроцитом сферичного стану).

Аналіз типових кислотних еритрограм нефракціонованих еритроцитів (рис. 1) засвідчує чітко виражений зсув кривої вліво, який обумовлюється поєднаною дією двох чинників: скороченням тривалості сферуляції та часу досягнення максимуму гемолізу. Нефракціоновані еритроцити периферичної крові є сукупністю клітин різного ступеня зрілості та функціональної активності, час перебування яких у руслі крові є різним. Відповідно, окремі популяції еритроцитів суттєво відрізняються між собою за стійкістю до дії кислотного гемолітика, яка може обумовлюватись як віковими особливостями, так і дією сполук, що ініціюють процеси пероксидного окислення ліпідів та окисної модифікації білків еритроци-

Таблиця 1. Параметри кислотних еритрограм еритроцитів щурів за дії 1,2-дихлоретану та введення нікотинаміду, n = 8-10.

Група тварин	Нефракціоновані еритроцити			Фракції еритроцитів (%)			
	Максимум часу гемолізу (хв.)	Тривалість сферуляції (хв.)	Проникність еритроцитарної мембрани (%)	Низько-стійкі	Середньо-стійкі	Підвищеної стійкості	Високостійкі
Контроль	4,5±0,3	2,5±0,2	61,8±4,2	12,9±0,7	52,5±3,4	26,4±1,8	8,2±0,3
Введення 1,2-ДХЕ	3,0±0,2*	1,9±0,1*	79,3±5,7*	25,3±1,3*	58,7±4,1	11,5±0,6*	4,5±0,2*
Введення 1,2-ДХЕ та нікотинаміду	4,1±0,2**	2,3±0,2	69,6±4,8	16,5±1,1**	53,7±3,9	22,9±1,7**	6,8±0,4**

Примітки: \* - зміни достовірні, порівняно з контролем (p 0,05); \*\* - зміни достовірні, порівняно з групою тварин, яким вводили 1,2-ДХЕ (p 0,05).

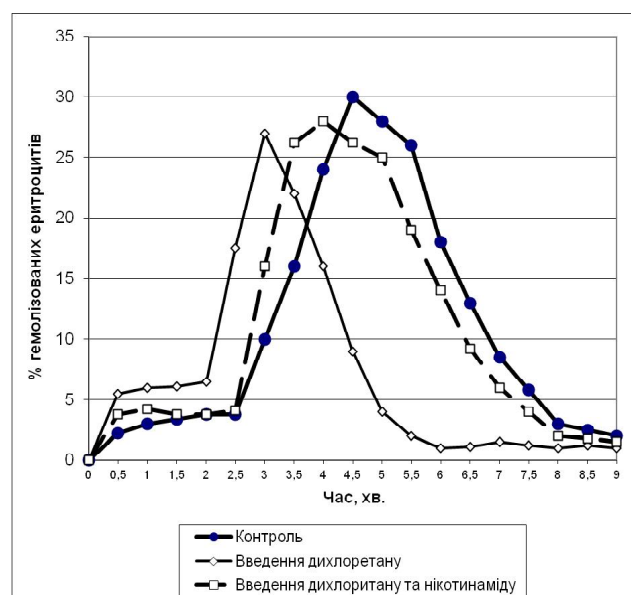


Рис. 1. Аналіз типових кислотних еритрограм нефракціонованих еритроцитів щурів за дії 1,2-дихлоретану та введення нікотинаміду.

тарної мембрани.

При фракціонуванні в градієнті густини сахарози еритроцитів контрольних щурів нами отримано чотири основні фракції, серед яких в середньому 12% складала низькостійкі (умовна назва - "старі"), 52% - середньостійкі ("зрілі"), 26% - підвищеної стійкості та 8% - високостійкі ("молоді") еритроцити. Отруєння 1,2-ДХЕ викликало значний перерозподіл фракційного складу різних популяцій еритроцитів: майже в два рази зростає вміст низькостійких в результаті значного зменшення (на 56%) вмісту еритроцитів підвищеної стійкості та високостійких (зниження вмісту складало 44%). Зростання популяції низькостійких, "старих" еритроцитів, а відтак посилення гемолізу, може обумовлюватись деструктивними змінами еритроцитарної мембрани під дією 1,2-ДХЕ, зокрема посиленням пероксидного окислення ліпідів, окисної модифікації білків та значним пригніченням активності NADPH-метгемоглобінредуктази за

оксидативного стресу.

На пошкодження еритроцитарної мембрани під впливом 1,2-дихлоретану вказує також збільшення її загальної, неспецифічної проникності. Як свідчать дані таблиці 1, ендогенна інтоксикація організму щурів, 1,2-ДХЕ, веде до зростання в середньому (на 34%) неспецифічної проникності мембран еритроцитів (поглинання метиленового синього еритроцитами).

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. Проведені дослідження свідчать про суттєву активацію за умов гострої інтоксикації щурів нейротоксичним ксенобіотиком 1,2-дихлоретаном процесів пероксидного окислення ліпідів та білків еритроцитів отруєних тварин, що можна розглядати як ключовий патологобіохімічний механізм біоцидної дії цього хлоралкану.

2. Виявлено значне посилення окислювальної модифікації білків під впливом 1,2-ДХЕ може бути надійним показником пошкодження тканин за дії токсичних факторів, оскільки продукти окислювальної модифікації білків є стабільними сполуками, що триваліший час утримуються в тканинах і крові, ніж продукти пероксидного окислення ліпідів. Особливо це стосується тканини мозку, яка в результаті високого рівня метаболізму, унікального ліпідного складу та низької швидкості клітинного відновлення, є особливо чутливою до дії активних форм кисню. В еритроцитах окислювальна модифікація білків обумовлює порушення структурно-функціональної організації еритроцитарної мембрани, що проявляється в зниженні стійкості до дії кислотного гемолітика та зростанні неспецифічної проникності еритроцитів і може бути одним з провідних механізмів розвитку гіпоксичних змін в тканинах за отруєння хлоралканами.

3. Проведеними дослідженнями підтверджено цитопротекторний ефект коферментного вітаміну - нікотинаміду за дії високотоксичних промислових отрут.

Отримані результати вказують на перспективність подальшого вивчення нікотинаміду з метою впровадження в фармацевтичну та медичну практику.

### Список література

Гроховський Т. В. Кислотна резистентність еритроцитів дітей, хворих

на крипторхізм, за умов дії монохроматичного червоного світла / Т.

В. Гроховський, Л. О. Дацюк // Експериментальна та клінічна фізіо-

- логія і біохімія. - 2003. - Т. 1, № 21. - С. 98-100.
- Губский Ю. И. Токсическая гибель клетки: свободно-радикальное повреждение ДНК и апоптоз / Ю. И. Губский // Лікування та діагностика. - 2001. - № 4. - С. 8.
- Еритроцит при захворюваннях внутрішніх органів: патогенетична роль морфофункціональних змін, діагностичне та прогностичне значення, шляхи корекції / М. Ю. Коломоєць, М. В. Шаплавський, Г. І. Мардар, Т. Я. Чурсіна. - Чернівці: БДМА, 1998. - 238 с.
- Заводник И. Б. Кислотный лизис эритроцитов человека / И. Б. Заводник, Т. П. Пилецкая // Биофизика. - 1997. - Т. 42. - С. 1106-1112.
- Исследование кислотной и осмотической резистентности эритроцитов у рабочих нефтехимического производства / Д. Ф. Шакиров, В. М. Самсонов, В. П. Кудрявцев, А. Ж. Гильманов // Клиническая лабораторная диагностика. - 2003. - № 7. - С. 21-23.
- Сибірна Н. О. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: метод. посібник / Н. О. Сибірна, М. М. Великий. - Львів: ЛНУ, 1997. - 70 с.
- Сизова Н. А. Безаппаратурный способ фракционирования красных клеток крови в градиенте плотности сахарозы / Н. А. Сизова, В. В. Каминская, В. И. Феденков // Известия Сибирского отделения АН СССР. Сер: биология. - 1980. - Т. 5, № 5. - С. 119-122.
- Сторожок С. А. Молекулярные дефекты мембран эритроцитов / С. А. Сторожок, А. Г. Санников // Вопросы медицинской химии. - 1996. - Т. 42, Вып. 2. - С. 103-110.
- Сухомлинов Б. Ф. Влияние малых доз хронического рентгеновского облучения на гемолитическую стойкость и популяционный состав эритроцитов периферической крови / Б. Ф. Сухомлинов, А. В. Трикуленко, Л. А. Дацюк // Радиобиология. - 1988. - Т. 28, № 6 - С. 829-831.
- Фіра Л. С. Ендогенна інтоксикація в організмі тварин, викликана тетрахлорметаном / Л. С. Фіра // Біологія тварин. - 2003. - Т. 5, № 1. - С. 316-319.

**Яницька Л.В.**

#### ИЗМЕНЕНИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СТОЙКОСТИ И ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ 1,2-ДИХЛОРЕТАНОМ И КОРРЕКЦИИ НИКОТИНАМИДОМ

**Резюме.** Исследовано значительную активацию, при условии острой интоксикации крыс нейротоксическим ксенобиотиком 1,2-дихлоретаном, процессов перекисного окисления липидов и белков эритроцитов отравленных животных. Доведено цитопротекторный эффект коферментного витамина - никотинамида при действии высокотоксическими промышленными ядами.

**Ключевые слова:** 1,2-дихлорэтан, ксенобиотик, никотинамид, эритроцит, гемолиз, перекисное окисление липидов.

**Yanitska L.V.**

#### CHANGES IN HEMOLYTIC RESISTANCE AND PERMEABILITY OF THE ERYTHROCYTIC MEMBRANES IN TOXIC DEFEAT OF 1,2-DICHLOROETHANE AND CORRECTION BY NICOTINAMIDE

**Summary.** It was investigated significant activation under acute intoxication rats by neurotoxic xenobiotic 1,2-dichloroethane, processes of lipid peroxidation and erythrocyte proteins of poisoned animals. It was proved cell protective effect of coenzyme vitamins - nicotinamide for the actions of highly toxic industrial poisons.

**Key words:** 1,2-dichloroethane, xenobiotic, nicotinamide, erythrocytes, hemolysis, lipid peroxidation.

**Рецензент - д.біол.н., проф. Великий М.М.**

Стаття надійшла до редакції 15.05.2015 р.

Яницька Леся Василівна - к.біол.н., доцент кафедри біоорганічної та біологічної хімії Національного медичного університету імені О.О.Богомольця; +38 044 454-49-19; yanitskayalesya@gmail.com