

МЕХАНИЗМЫ ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ЛАКТОАЦИДОЗА И ДЕЙСТВИЯ НИТРОЗОТИОЛОВ¹

© 2002 Н.А. Кленова²

Изучены механизмы дестабилизации эритроцитарных клеток при действии нитрозотиолов в условиях лактоацидоза. Действие молочной кислоты (7,5 мМ/л) и нитритов (2 мМ/л) сопровождается значительной активацией процессов аутоокисления гемоглобина, дезинтеграцией мембраны и повреждением клеток. Добавление цистеина гидрохлорида (2 мМ/л) в инкубационную смесь не сопровождается улучшением показателей. Таким образом, введение тиолов на фоне действия нитритов и лактоацидоза не оказывает выраженного протекторного действия на эритроцитарные клетки.

Введение

Стабильность популяции эритроцитарных клеток, от которой зависит кислород-транспортная, адаптивная и другие функции этих клеток, во многом определяется условиями их функционирования. Согласно полученным нами ранее данным, а также данным других исследователей, избыток протонов и развивающийся при этом энергодефицит, действие нитрит-анионов ускоряют процессы аутоокисления гемоглобина, деструктивные процессы в мембранах клеток [1,2] и значительно уменьшают срок эффективной метаболической жизни эритроцитов.

Гипоксия, лактоацидоз, снижение энергетического потенциала клеток сопровождают многие патологические процессы и, в частности, сердечно-сосудистые заболевания. Основными препаратами, применяемыми для коррекции ишемических состояний, остаются нитропрепараты. Кроме того, в качестве антиоксидантов часто используются доноры SH-групп. Однако действие нитрозотиолов усиливает делатационный эффект нитритов [3], а сохраняется ли при этом антиоксидантное и стабилизирующее действие тиолов на мембраны, остается неясным.

Целью данного исследования стало изучение функционального состояния эритроцитарных клеток при действии нитрозотиолов в условиях лактоацидоза.

¹ Представлена доктором биологических наук профессором В.Г. Подковкиным.

² Кленова Наталья Анатольевна, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Материалы и методы

Для исследований использовалась цельная донорская кровь или фракция чистых эритроцитов (отмывка 0,154 М раствором хлористого натрия, рН 7,2 в режиме центрифугирования 600 g, 10 минут при 4°C). Суспензию чистых эритроцитов помещали в среду Рингера-Локка в отношении 1:1. В цельную кровь или суспензию эритроцитов в среде Рингера-Локка добавляли молочную кислоту в конечной концентрации 7,5 мМ/л; нитрит натрия в конечной концентрации 2 мМ/л; цистеин гидрохлорид (забуференный раствор) в конечной концентрации 2 мМ/л. Объем добавок не превышал 0,2% от общего объема проб с целью сохранения гематокрита. В контрольные пробы добавляли те же объемы 0,154 М хлористого натрия. Инкубацию с добавками проводили при 37°C в ультратермостате в течение 20–30 минут при периодическом встряхивании.

О функциональной активности эритроцитов судили по соотношению форм гемоглобина: дезоксигемоглобина (ДОК Нв); оксигемоглобина (ОК Нв); метгемоглобина (Мет Нв) [4,5], содержанию мембраносвязанного гемоглобина (МС Нв) [6], мембранной проницаемости клеток для мочевины (МП) [7], антиокислительной активности эритроцитарных гемолизатов (АОА) [8], изменению содержания кальция в инкубационной среде. Содержание кальция определяли, используя стандартные наборы фирмы Vital diagnostics (Санкт-Петербург).

Результаты и обсуждение

Действие соединений, имеющих восстановленные тиоловые группировки, связано обычно со стабилизацией эритроцитарной клетки [9]. Нами были получены данные о росте электродиффузионного потенциала мембраны эритроцитов, снижении скорости процессов иницированного ПОЛ при инкубации фракции чистых эритроцитов с разовой терапевтической дозой унитиола [10]. Стабилизирующее действие на эритроциты оказывает и забуференный раствор цистеина гидрохлорида (табл.1). Эффект связан с поддержанием оптимальных соотношений восстановленных и окис-

Таблица 1

Действие цистеина гидрохлорида (2 мМ/л) в условиях лактоацидоза (7,5 мМ/л) на эритроциты

Пробы	ДОК Нв, %	ОК Нв, %	Мет Нв, %	МС Нв, %	АОА, у.е.	МП, % гемолиза	Изм. конц. Ca ²⁺ , мкМ/мин
1. Контроль, n = 42	49,55 ± 0,19	48,56 ± 0,14	1,90 ± 0,09	6,01 ± 0,30	0,092 ± 0,004	45,00 ± 1,55	3,83 ± 0,25
2. Мол. к-та, n = 22	49,51 ± 0,17	47,67 ± 0,14*	2,81 ± 0,06*	8,87 ± 0,31*	0,049 ± 0,003*	60,99 ± 1,95*	7,70 ± 0,38*
3. Мол. к-та+ цис., n = 22	49,62 ± 0,15	48,10 ± 0,13	2,28 ± 0,06	6,91 ± 0,21	0,078 ± 0,004*	53,31 ± 1,44*	5,83 ± 0,26*

Примечание.* $P < 0,01$ по отношению к контролю

ленных сульфгидрильных группировок белков и состояния гемоглобина. Лактоацидоз в концентрации молочной кислоты, соответствующей выходу клеток на анаэробный тип окислительных процессов [11], оказывает значительное повреждающее воздействие на эритроцитарные клетки: наблюдается ускорение процессов метгемоглобинообразования, уменьшение сродства гемоглобина к кислороду и увеличивается доля мембраносвязанного гемоглобина (табл.1). Торможение гликолитических процессов, стимуляция производства 2,3 ДФГ в условиях лактоацидоза приводит к дестабилизации мембран клетки и лавинообразному нарастанию повреждений, ускоряющих ее старение и гибель. Действие цистеина на фоне лактоацидоза уменьшает повреждающее воздействие закисления и энергодефицита, вызванного избытком молочной кислоты (табл.1).

Снижение повреждающего воздействия лактоацидоза обусловлено торможением процессов аутоокисления гемоглобина и ПОЛ за счет стабилизации метгемоглобин-редуктазной системы эритроцитов и восстановления оптимальных каталитических способностей системы супероксиддисмутаза-каталаза, о чем свидетельствует снижение содержания метгемоглобина и мембраносвязанного гемоглобина, а также уменьшение степени гемолиза под действием изомолярной концентрации мочевины. Проницаемость мембран эритроцитов для мочевины определяется наличием пор и дефектов в мембране, обуславливающих ускорение проникновения мочевины в клетку и гемолиз [12].

Таким образом, чем выше нативность мембраны, тем меньше скорость гемолитического процесса в присутствии мочевины. Действие цистеина характеризуется также повышением антиокислительной активности эритроцитарных гемолизатов, которая определялась как константа ингибирования скорости процесса окисления 2,6 дихлорфенолиндифенола двухвалентным железом. Полученные данные позволяют сделать вывод об уменьшении скорости процессов дестабилизации эритроцитарных клеток в условиях лактоацидоза с помощью донора SH-групп цистеингидрохлорида.

Действие цистеина в эквимолярной концентрации с нитритом натрия (нитрозотиолов) характеризуется по сравнению с действием самого цистеина значительным ростом скорости метгемоглобинообразования и увеличением процента жесткосвязанного с мембраной белка (табл.2). При этом растет количество клеток, гемолизированных под действием изомолярной концентрации мочевины, и уменьшается АОА эритроцитарных гемолизатов (табл.2). В условиях действия нитританионов наблюдается заметное снижение скорости поглощения Ca^{2+} эритроцитами, так как концентрация кальция в инкубационной среде изменяется мало, что может быть обусловлено ингибированием фосфолипаз и активацией Ca^{2+} -АТФ-азы мембраны эритроцитов.

Действие нитрозотиолов характеризуется значительным ростом скорости метгемоглобинообразования, увеличением доли мембраносвязанного белка, повышением мембранной проницаемости клеток для мочевины и уменьшением АОА эритроцитов. Наблюдается также снижение скорости поглощения кальция эритроцитами, вероятно, за счет угнетения Ca^{2+} -зависимых процессов нитритами. Уменьшение входа кальция в эритроцит может сопровождаться ухудшением деформируемости клеток из-за нарушения дефосфорилирования спектрина.

В условиях лактоацидоза мы наблюдали в целом потенцирующее повреждения воздействие нитрозотиолов на эритроцитарные клетки. Наблюдается высокое содержание метгемоглобина в клетках, увеличение доли жесткосвязанного гемоглобина (наибольший процент из всех воздействий).

Снижение АОА эритроцитарных гемолизатов, рост мембранной проницаемости

Таблица 2

Действие нитрозотиолов в условиях лактоацидоза (7,5 мМ)

Пробы	ДОК Нв, %	ОК Нв, %	Мет Нв, %	МС Нв, %	АОА, у.е.	МП, % гемолиза	Изм. конц. Ca ²⁺ , мкМ/мин
1. Цис., 2 мМ/л, n = 20	49,54 ± 0,11	49,01 ± 0,13	1,45 ± 0,06	4,37 ± 0,36	0,135 ± 0,004	35,42 ± 1,48	2,29 ± 0,31
2. Цис., 2 мМ/л +NaNO ₂ 2 мМ/л n = 20	48,39 ±0,15*	48,37 ± 0,09*	3,24 ± 0,09*	7,68 ± 0,27*	0,043 ± 0,003*	59,18 ± 2,10*	1,21 ± 0,28*
3. Мол. к-та + NaNO ₂ , n = 22	48,60 ± 0,18	47,65 ± 0,15*	3,75 ± 0,07*	14,05 ± 0,46*	0,020 ± 0,004*	73,44 ± 1,05**	3,71 ± 0,22**
4. Мол. к-та + цис. + NaNO ₂ , n = 20	48,63 ±0,21	47,50 ±0,11**	3,87 ±0,15**	13,42 ±0,36**	0,021 ±0,003**	68,22 ± 2,17**	4,65 ± 0,15**

* $P < 0,01$ по отношению к пробе с цистеином;** $P < 0,01$ по отношению к пробе: цистеин + NaNO₂

также свидетельствует о возрастании повреждающего воздействия лактата в присутствии нитрозотиолов. Причем в этих условиях увеличивается и вход кальция в эритроцит и превышает скорость поглощения его в контроле на 21%. Введение цистеина в инкубационную смесь в условиях действия NaNO₂ и молочной кислоты не сопровождается улучшением изученных показателей: не наблюдается снижения скорости метгемоглобинообразования, значительным остается процент мембраносвязанного гемоглобина, низкой — антиокислительная активность эритроцитарных гемолизатов и высокой — мембранная проницаемость, не улучшается и течение кальцийзависимых процессов.

Таким образом, действие нитрозотиолов на фоне лактоацидоза не ослабляет повреждающее действие избытка протонов и нитританионов на эритроцитарные клетки и может привести к ухудшению циркулирующей популяции клеток. Согласно этому применение тиоловых соединений в качестве антиоксидантов в сочетании с лечением нитропрепаратами может оказать повреждающее воздействие на кислородтранспортную функцию эритроцитов и снизить эффективность лечения.

Литература

- [1] Кленова Н.А. Применение лактатной модели гипоксического состояния для изучения влияния лекарственных препаратов на функциональное состояние эритроцитов// В кн.: Моделирование в медицинских и биологических исследованиях. Самара: Изд-во Сам. гос. мед. ун-та, 1999. С. 87–90.
- [2] Верещагина В.Л., Маевский Е.И. Анализ выхода калия из эритроцитов при физической нагрузке и моделирование лактатного ацидоза// Пат. физиол. и экпер. тер. 1980. № 5. С. 42–52.

- [3] Бусыгина О.Г., Григорьев Н.Б., Северина И.С. Роль SH-групп гуанидинотиолов — новых субстратов NO-синтетазы — в стимуляции активности гуанилатциклазы// Биохимия. 1996. Т. 61. № 1. С. 119–125.
- [4] Заводник И.Б., Лапшина Е.А. Процессы окисления гемоглобина человека// Биохимия. 1996. Т. 61. № 1. С. 42–48.
- [5] Атауллаханов Ф.И., Ветвицкий В.М., Жаботинский А.М. и др. Стационарная зависимость скорости восстановления метгемоглобина от его концентрации в интактных эритроцитах человека// Биохимия. 1984. Т. 49. № 2. С. 193–197.
- [6] Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. О мембраносвязанном гемоглобине// Биофизика. 1990. Т. 35. № 6. С. 1019–1020.
- [7] Кадывкина З.М., Колмаков В.Н., Радченко В.Г. Проницаемость эритроцитарных мембран у больных с хроническими заболеваниями печени// Клиническая медицина. 1987. № 8. С. 157–159.
- [8] Сесенов В.Л., Ярош А.М. Определение антиокислительной активности биологического материала// Укр. биохим. журн. 1985. № 3. С. 50–52.
- [9] Казеннов А.М., Маслова М.Н. Структурно-биохимические свойства мембраны безъядерных эритроцитов// Физиол. журн. им. Сеченова. 1987. Т. 73. № 12. С. 1587–1598.
- [10] Кленова Н.А., Васильева И.Ф. Механизм воздействия унитиола на мембраны эритроцитов больных, перенесших инфаркт миокарда// В кн.: Совершенствование диагностики и оптимизация лечения в кардиологии. Куйбышев: Изд-во Куйб. гос. мед. ин-та, 1989. С. 78–84.
- [11] Флоря В.Г., Марков В.Ю. Анаэробный порог: физиологическое значение и методы определения// Кардиология. 1993. № 5. С. 40–46.
- [12] Пушкарь Н.С. Теория и практика криогенного сублимационного консервирования. Киев: Наукова думка, 1984.

MECHANISMS OF ERYTHROCYTE DESTABILIZATIONS OF LACTACIDOSE AND NITROTHYOLS ACTION³

© 2002 N.A. Klenova⁴

The mechanisms of red blood cells destabilization are investigated under nitrothyols action in conditions of Lactacidose. The action of a dairy acid (7,5 *mM*) and nitrites (2 *mM*) is accompanied by significant activation of hemoglobin autooxidation, membranes desintegration and cells damage. The addition of cestein hydroxychlorid (2 *mM*) in incubative mix is not accompanied by improvement of parameters. Thus, the introduction of thyols does not render expressed protective influence on erythrocytes on a background of nitrites action and Lactacidose.

Поступила в редакцию 25/III/2002;
в окончательном варианте — 25/IV/2002.

³Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. V.G. Podkovkin.

⁴Klenova Nataliya Anatolievna, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.