

УДК 615.9

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДИК ОЦЕНКИ ПЕРЕКИСНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ НА ОСНОВЕ ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

Вельш О.А., Филончикова Е.С., Трофимова Е.Е.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: velsh.lelya@mail.ru

Эритроциты, как одни из жизненно важных форменных элементов крови, постоянно подвергаются перекисному окислению, что является стрессовым фактором для мембран. В результате эволюции эритроциты приобрели резистентность к перекиси водорода, которая в свою очередь зависит от возраста форменных элементов и может уменьшаться в ходе их старения. Уменьшение резистентности эритроцитов до минимальных значений приводит к гемолизу. Гемолиз называется процесс разрушения мембран эритроцитов, сопровождающийся выходом гемоглобина в плазму крови. Гемолиз эритроцитов может быть вызван одной из активных форм кислорода – перекисью водорода. Ее образование может наблюдаться при различных процессах, таких как действие гормонов, гипероксия, инфекционные заболевания. С целью оценки перекисной резистентности в настоящем исследовании были рассмотрены две методики и выделены их недостатки и преимущества.

Ключевые слова: перекисная резистентность, эритроцит, перекись водорода, оптическая плотность, азид натрия, гемолиз

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE METHODOLOGY FOR ESTIMATING THE PERXIFICITY OF ERYTHROCYTES BASED ON LITERARY DATA

Velsh O.A., Filonchikova E.S., Trofimova E.E.

Orenburg State University, Orenburg, e-mail: velsh.lelya@mail.ru

Erythrocytes, as one of the vital blood cells, are constantly subjected to peroxidation, which is a stress factor for membranes. As a result of evolution, red blood cells have become resistant to hydrogen peroxide, which in turn depends on the age of the formed elements and may decrease in the course of their aging. Reducing the resistance of red blood cells to minimal values leads to hemolysis. Hemolysis is the process of destruction of erythrocyte membranes, accompanied by the release of hemoglobin in the blood plasma. Hemolysis of red blood cells can be caused by one of the active forms of oxygen – hydrogen peroxide. Its formation can be observed in various processes, such as the action of hormones, hyperoxia, and infectious diseases. In order to assess peroxide resistance in the present study, two methods were considered and their advantages and disadvantages were highlighted.

Keywords: peroxide resistance, erythrocyte, hydrogen peroxide, optical density, sodium azide, hemolysis

При воздействии различных внешних и внутренних факторов могут изменяться морфологические и функциональные характеристики, которые обеспечивают целостность эритроцитов. Существует ряд факторов, таких как осмотические, механические, химические, температурные, к которым нормальный эритроцит способен противостоять до определенного предела. Такая способность кровяных клеток обусловлена понятием резистентности, которая в свою очередь зависит от возраста форменных элементов и может уменьшаться в ходе их старения [1]. Уменьшение резистентности эритроцитов до минимальных значений приводит к гемолизу. Гемолиз – это процесс разрушения мембран эритроцитов, сопровождающийся выходом гемоглобина в плазму крови. Плазма в таком случае будет окрашиваться в красный цвет, по другому ее называют «лаковая кровь». Гемолиз может проходить как *in vivo* так и *in vitro* [2].

Перекись водорода – одна из активных форм кислорода, которая способна вызывать гемолиз эритроцитов. Образование перекиси водорода может наблюдаться при различных процессах, таких как дей-

ствие гормонов, гипероксия, инфекционные заболевания. Главными мишенями клетки являются липиды и белки мембраны эритроцита, а также внутриклеточный белковый компонент. При недостатке витамина Е и внесении перекиси водорода наблюдается перекисное окисление фосфолипидов мембраны и последующий гемолиз по коллоидно-осмотическому типу. Фракцией липидов наиболее чувствительной к окислению является фосфатидилэтаноламин [3].

Против агрессивного действия свободных радикалов перекиси водорода действует специальная антиоксидантная система. Она состоит из ферментов, которые обеспечивают защиту эритроцитарной мембраны при окислении. К таким ферментам относятся: супероксид-дисмутаза (СОД), каталаза, глутатионзависимые пероксидазы и трансферазы, удаляющие органические перекиси.

Продукты перекисного окисления могут быть как «индикаторами», так и «первичными медиаторами» стресса как особого состояния клетки, которое может привести к увеличению ее резистентности [4].

Выработка активных форм кислорода (H_2O_2) увеличивается при высвобождении

из гена ионов трехвалентного железа. Такие активные формы способны приводить к прилипанию клеток крови к стенкам сосудов и вызывать окисление липопротеинов низкой плотности. В результате образуются перекиси липидов и нарушается структура и проницаемость мембраны эритроцитов. Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) играют важную роль в нормальном функционировании клетки и выступают ключевыми звеньями реакции организма на стресс [5].

Из литературных источников известно, что резистентность эритроцитов к воздействию различных факторов имеет информативный характер для оценки функционального состояния организма и его общей устойчивости к интенсивным физическим нагрузкам [2].

Содержание железа в окисленной форме соотносится с риском сердечнососудистых заболеваний, что объясняет постоянный научный интерес к изучению факторов, отвечающих за устойчивость эритроцитов к гемолизу. Особую актуальность приобретает изучение пероксидной резистентности клеток крови, так как повышенное содержание перекиси водорода в кровяном русле отмечается при различных патологических состояниях, в том числе инфекциях и воспалении [4].

Для изучения физико-химических свойств мембран клеток крови применяют метод определения перекисной резистентности эритроцитов.

Таким образом, целью нашего исследования является проведение литературного обзора изучения перекисной резистентности эритроцитов крови человека с использованием различных методик.

Исследование перекисной резистентности эритроцитов крови человека проводилось по двум методикам. Оба метода производят оценку перекисной резистентности эритроцитов на основе расчетов таких показателей как: оптическая плотность пробы, подвергшейся перекисному гемолизу; оптическая плотность, соответствующая 100% гемолизу и оптическая плотность, характеризующая спонтанный (без H_2O_2) гемолиз эритроцитов. Первая методика описанная В.И. Бенисовичем заключается в ингибции эритроцитарной каталазы при помощи азидата натрия для оценки резистентности мембран эритроцитов к перекисному окислению, иницированному H_2O_2 . Данная методика предполагает приготовление суспензии эритроцитов, растворов перекиси водорода и азидата натрия на забуференном физиологическом растворе с уровнем pH равным 7,4. Затем следует приготовление двух опытных проб путем добавления 2 мл 0,068% раствора перекиси водорода к 2 мл

5% суспензии эритроцитов и 0,16 мл 0,2% раствора азидата натрия. Третья проба является контрольной и предназначается для определения спонтанного гемолиза эритроцитов. Данную пробу получают смешиванием тех же объемов суспензии эритроцитов и раствора азидата натрия, которые использовали при приготовлении двух опытных проб, но вместо раствора перекиси водорода берут равный объем забуференного физиологического раствора с pH 7,4. Инкубация проб производится в термостате в течение одного часа при 37°C. Для получения 100% гемолиза эритроцитов к одной из опытных проб добавляют 0,2 мл 4% раствора сапонины. Центрифугирование всех проб происходит после инкубации 10 минут при 2000 об/мин. После центрифугирования происходит осаждение эритроцитов, а надосадочную жидкость используют для определения степени гемолиза. Для этого к 0,3 мл надосадочной жидкости добавляют 2,7 мл трансформирующего раствора, который дает окрашенный комплекс с Fe^{3+} -гемоглобина. После этого на спектрофотокориметре определяют оптическую плотность E541, пропорциональную количеству гемоглобина в пробе [6].

В исследовании перекисной резистентности эритроцитов по второй методике предложенной С.С. Михайловым преследуется цель оценить общую резистентность эритроцитарных мембран, включая действие эритроцитарной каталазы, разлагающей перекись водорода. Величину перекисной резистентности определяют с учетом разбавления суспензии эритроцитов. Эритроциты дважды промывают физиологическим раствором и готовят 4,4% суспензию. В эксперименте используется перекись водорода с исходной рабочей концентрацией 2,2%. Такая концентрация обеспечивает удобную для измерения величину оптической плотности гемолизата (от 0,1 до 0,8). В данном методе также используются опытные и контрольные пробы. Для наиболее точного получения результата используют 10 образцов из одной и той же донорской крови. Оптическую плотность определяют на спектрофотометре при длине волны 536 нм. В кювету объемом 1 мл вносят 0,8 мл забуференного физиологического раствора (pH 7,4), добавляют 0,1 мл суспензии эритроцитов. Содержимое перемешивают [7].

По данной методике также проводится оценка перекисной устойчивости эритроцитов. Для получения результатов используются три параметра каждой пробы («а», «б» и «в»), которые представлены ниже в формуле (1), определяются непосредственно в одной и той же спектрофотометрической кювете.

Сначала вычисляется величина «в», характеризующая спонтанный гемолиз. По данным предварительных опытов было выяснено, что в условиях описываемого определения в течение 60' спонтанный гемолиз практически пропорционален времени инкубации. Сразу же после вышеописанного перемешивания пробу в спектрофотометрической кювете центрифугируют (5', 3000 об/мин) и определяют оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны равной 536 нм. Затем получают E_0 , т.е. нулевую точку на графике. Далее осадок взмучивают и после 30' инкубации при 37°C снова центрифугируют и определяют оптическую плотность E_{30} . Затем по графику с учетом линейной зависимости путем экстраполяции получают E_{60} . В данном случае $E_{60} = 2 E_{30} - E_0$. Для получения значения «а» определяют оптическую плотность опытной пробы после добавления 1 мл 2,2% раствора перекиси водорода и при постоянном покачивании кюветы. После чего содержимого пробы инкубируют в течение 30' при той же температуре. Затем пробу центрифугируют (5', 3000 об./мин) и определяют оптическую плотность.

Далее в кюветы вносят стеклянную палочку, смоченную в растворе сапонина, обеспечивающего 100% гемолиз, затем пробу снова центрифугируют и определяют величину «б» путем фотометрирования.

Обработку данных проводят по формуле

$$A = 100 (a - v) / (b - v),$$

где а – величина оптической плотности опытной пробы E_{541} или E_{536} ; б – величина оптической плотности при полном (100%) гемолизе под влиянием сапонина; в – величина оптической плотности контрольной пробы – характеристика спонтанного гемолиза эритроцитов в условиях опыта.

Данная формула определяет степень гемолиза А (в%) под влиянием перекиси водорода. Рассчитанная таким образом средняя перекисная резистентность эритроцитов для группы здоровых людей $A = 8,9 + 1,13 [7]$.

По итогу проведения литературного обзора были выявлены недостатки первой методики определения перекисной устойчивости эритроцитов. Во-первых, при приготовлении проб количество эритроцитов оказывается различным во всех пробах, особенно при проведении массовых поточных определений. Соответственно оценка степени гемолиза эритроцитов в опытной пробе по отношению к пробе со 100% гемолизом сопровождается существенной ошибкой. Таким образом неадекватность суспензии эритроцитов и необходимость приготовления отдельной пробы для проведения 100% гемолиза негативно сказываются на точно-

сти метода. Во-вторых, по ходу определения устойчивости эритроцитов к перекиси водорода неоднократно приходится манипулировать малыми объемами субстрата и используемых реактивов. При измерении этих объемов создается погрешность, что также негативно сказывается на точности конечного результата. Второй представленный нами метод учитывает недостатки первого, тем самым является наиболее выгодным для применения в оценке перекисной резистентности эритроцитов. В данном способе не применяются азид натрия и трансформирующий раствор. Так как о степени гемолиза можно судить по оптической плотности E_{536} , которая непосредственно отражает концентрацию гемоглобина. Недостатки предыдущего метода были устранены с помощью индивидуализации каждой пробы. Суспензия эритроцитов, помещенная в спектрофотометрическую кювету, уже не покидает ее и используется сначала для определения спонтанного гемолиза, потом для определения гемолиза, вызванного добавлением H_2O_2 , и, наконец, для определения полного гемолиза, обусловленного добавлением сапонина.

Учет и исправление недостатков первого метода обуславливает повышение точности полученных результатов во втором методе. Таким образом методика предложенная С.С. Михайловым является значительно упрощенной в плане использования минимального набора реактивов и экономически выгодной из-за ненужности использования трансформирующего раствора.

Список литературы

1. Бондарев Л.С., Зайцев И.А., Жидких В.Н. Влияние некоторых воздействий на осмотическую стойкость эритроцитов // Лаб. Дело. – 1990. – № 7. – 31 с.
2. Андрийчук А.В., Ткаченко Г.М., Кургалок Н.Н., Ткачева И.В., Грудневская Й., Вартовник М.С. Пероксидная резистентность эритроцитов и содержание маркеров окислительного стресса в крови лошадей украинской верховой породы в динамике физических нагрузок // Известия КГТУ. – 2015. – № 36. – 46 с.
3. Woollard K.J., Sturgeon S., Chin-Dusting J.P., Salem H., Jackson H. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury // The Journal of Biological Chemistry. – 2009. – 284 p.
4. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и окислительные модификации макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – 63 с.
5. Половинкина Е.О., Синицына Ю.В. Окислительный стресс и особенности воздействия слабых стрессоров физической природы на перекисный гомеостаз растительной клетки: учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2010. – 62 с.
6. Бенисович В.И., Идельсон Л.И. Образование перекисей непредельных жирных кислот в оболочке эритроцитов при болезни Маркшафа-Микели // Вопр. мед. химии. – 1973. – № 6. – С. 596–599.
7. Патент 2134420. Российская Федерация МПК G01N33/50 Способ определения перекисной резистентности эритроцитов / Михайлов С.С.; заявитель и патентообладатель Санкт-Петербургская государственная академия физической культуры им. П.Ф. Лесгафта; Михайлов С.С., Романчук Л.А., Фактор Э.А. заявл.: 09.04.97; опубл.: 10.08.99.