

На правах рукописи

**КЛЕНОВА НАТАЛЬЯ АНАТОЛЬЕВНА**

**БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ  
ЧЕЛОВЕКА В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ**

**03.00.04 –биохимия**

**Автореферат диссертации на  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**Тюмень –2003**

Работа выполнена в Самарском государственном университете (кафедра биохимии), Самарском государственном медицинском университете (кафедра пропедтерапии и ЦНИЛ)

Научные консультанты

доктор медицинских наук, профессор  
Камилов Феликс Хусаинович  
доктор медицинских наук, профессор  
Фатенков Вениамин Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор  
Бышевский Анатолий Шулимович  
доктор медицинских наук, профессор  
Соловьев Сергей Владимирович  
доктор биологических наук, профессор  
Башкатов Сергей Александрович

Ведущая организация: Челябинская государственная медицинская академия

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2003 г. в \_\_\_\_ часов на заседании

диссертационного совета ДМ 212.274.07 при Тюменском государственном университете по адресу: 625043, г. Тюмень, ул. Пирогова, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тюменского государственного университета

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2003 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук,  
профессор

Е.А. Чирятьев

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность.** Согласно данным и мнению ряда ученых (Скулачев В.П., 1999; Зенков Н.К., 1999; Самуилов В.Д. и др., 2000), в основе многих тяжелых патологических состояний (инфаркт, инсульт, злокачественные опухоли, сепсис) лежит гибель большого количества клеток жизненно важных органов и тканей. Гибель клеток происходит не только в зоне повреждения, но и далеко за ее пределами за счет включения программы апоптоза факторами некроза опухолей и медиаторами воспаления. Исследование механизмов включения апоптозной гибели является в настоящее время одной из самых актуальных и практически важных задач. Согласно некоторым данным литературы, эритроциты представляют собой уникальные клетки, включающие программу апоптоза уже в ходе формирования (Самуилов В.Д. др., 2000). В молодых клетках можно наблюдать высокую степень интеграции мембранных структур и метаболических процессов в клетке, обеспечивающую оптимальное осуществление функций. Поступив в систему кровообращения, эритроцит постепенно дезинтегрируется в ходе функционирования. Скорость и механизмы дестабилизации клеток существенно влияют на выполнение эритроцитами важнейших для организма функций: транспорта кислорода, адаптивной и, возможно, эндокринной.

Скорость процессов дезинтеграции эритроцитарных клеток, обладающих определенным запасом функциональных белков и структурных компонентов, связана с условиями функционирования. Увеличение скорости повреждения популяции циркулирующих клеток в условиях гипоксии, лактоацидоза, действия лекарственных препаратов и ксенобиотиков, может привести к напряжению систем эритропоэза и срыву адаптационных процессов, декомпенсации. Изучение скорости и механизмов дезинтеграции эритроцитов позволяет разработать более эффективные способы защиты клеток и корректировать возникающие повреждения с помощью направленно действующих регуляторов и лекарств. Очень важным является также изучение сочетанного воздействия различных повреждающих факторов на такие чувствительные клетки, как эритроциты. Многие патологические состояния такие, например, как сердечно-сосудистые заболевания характеризуются развитием хронической гипоксии и лактоацидоза (Волосюк С.В., Щулипенко И.Н., 1980; Григорьянц Т.М. и др., 1980; Льюис Д.Х., 1988), активацией свободно-радикального окисления в плазме крови и функционально важных клетках (Голиков А.П. и др., 1997). Часто это сочетается с гипергликемией, действием избытка катехоламинов и большого количества лекарственных препаратов.

**Целью настоящего исследования** является изучение механизмов и скорости дезинтеграции эритроцитов человека в условиях гипоксии, лактоацидоза, гипо- и гипергликемии и их сочетания, окислительного стресса и действия лекарственных препаратов, а также химических соединений *in vivo* и *in vitro*.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить влияние на состояние гемоглобина, мембраны и метаболических процессов в эритроцитарных клетках лактоацидоза различной степени выраженности и установить взаимосвязь и направленность биохимических процессов, ведущих к ускорению дезинтеграции эритроцитов человека.

2. Оценить повреждающее влияние на эритроциты, находящиеся в условиях лактоацидоза, гипо- и гипергликемии, действия нитропрепаратов; а также исследовать механизмы действия бета-блокаторов, антагонистов кальция, доноров сульфгидрильных групп в условиях лактоацидоза и присутствия нитритов, гипердреналинемии.
3. Выявить возможность коррекции возникающих повреждений в различных условиях функционирования с помощью цистеина, унитиола, триметазида, N-2(оксиэтил) амида цис-9-октадеценовой кислоты.
3. Исследовать состояние популяций эритроцитов в условиях гипоксии и лактоацидоза *in vivo*: в ходе физических нагрузок, у больных ИБС, ССН II-III функциональных классов и постгеморрагической анемии. Сопоставить результаты с данными *in vitro* и описать возможные механизмы дезинтеграции эритроцитов в организме.
4. В условиях окислительного стресса *in vitro* и при реоксигенации, наступающей после операции аортокоронарного шунтирования, определить механизмы дезинтеграции эритроцитов и изучить возможность коррекции повреждений с помощью триметазида и N-2(оксиэтил) амида цис-9-октадеценовой кислоты.
5. Провести сравнение спектров генерируемых эритроцитами коротких пептидов в условиях энергодефицита и окислительного стресса и установить возможность течения дезинтеграционных процессов по определенной программе с участием информационных молекул в ее реализации.
6. Проанализировать полученные результаты и выявить закономерности развития процессов дестабилизации эритроцитов, оценить степень их общности и конкретные различия в зависимости от условий функционирования.

**Научная новизна.** Впервые проведено изучение биохимических закономерностей реализации взаимосвязанных и направленных процессов дезинтеграции эритроцитов человека в условиях действия различных лекарственных препаратов и химических соединений на фоне лактоацидоза, гипо- и гипергликемии, гипердреналинемии, окислительного стресса. Установлено, что в основе ускорения дезинтеграционных процессов при лактоацидозе лежит развитие состояния энергодефицита за счет уменьшения сродства гемоглобина к кислороду и уменьшения производства АТФ. Избыток и недостаток глюкозы, гипердреналинемия, действие инициаторов окисления по разным механизмам способствуют усугублению повреждений, вызванных лактоацидозом. Связующим звеном всех механизмов является ускорение аутоокисления гемоглобина и дезинтеграция белок-белковых и белок-липидных взаимодействий в мембране эритроцита.

Впервые исследовано мембраностабилизирующее и регулирующее влияние на процессы дестабилизации эритроцитов триметазида, N-2(оксиэтил) амида цис-9-октадеценовой кислоты. Показано, что триметазидин замедляет процессы дезинтеграции за счет улучшения метаболизма глюкозы в эритроцитах и снижения скорости процессов свободно-радикального окисления в плазме крови. Этаноламидное производное цис-9-октадеценовой кислоты оптимизирует работу кальциевых каналов клетки и снижает скорость дезинтеграции мембранных структур.

Впервые представлены результаты изучения и описаны механизмы формирования повреждений популяций эритроцитов в условиях физических нагрузок различной мощности у практически здоровых людей и больных ИБС II-III функциональных классов стенокардии после традиционного стационарного и амбулаторного лечения. Определены

наиболее информативные показатели, а также направление их изменений, позволяющее объективно оценить состояние эритроцитарной популяции у больных ИБС после лечения. Проведены исследования эритроцитарных популяций у больных с постгеморрагической анемией и предложены критерии оценки степени тяжести гипоксии и нарушения кислородтранспортной функции эритроцитов. Проанализирована возможность коррекции повреждений популяций эритроцитов в условиях реоксигенации после операции аортокоронарного шунтирования с помощью триметазида. Полученные данные позволяют сделать вывод о снижении скорости повреждения популяции эритроцитов после коронарного шунтирования у больных, принимавших триметазидин.

Впервые проведено сравнение спектров генерации коротких пептидов в условиях энергодифицита и окислительного стресса, обнаружены и идентифицированы ряд коротких пептидов, являющихся продуктами деградации гемоглобина и обладающих биологической активностью. Показана активация производства и изменение спектра генерируемых пептидных соединений в зависимости от состояния эритроцитарных клеток.

На основе полученных данных выявлены общие закономерности процессов дезинтеграции эритроцитов как реализации определенной программы апоптозной гибели и высказаны предположения об их модификации в конкретных условиях функционирования.

**Научно-практическая значимость.** Полученные данные имеют фундаментальное значение, так как позволяют установить биохимические закономерности изменений эритроцитарных клеток и оценить влияние различных факторов на реализацию программы функционирования и старения эритроцитов. Обнаруженное мембраностабилизирующее действие N-2(оксиэтил) амида цис-9-октадеценовой кислоты в условиях лактоацидоза и окислительного стресса открывает новые регулирующие свойства амидных производных моноеновых жирных кислот. Исследование генерации коротких пептидов эритроцитами, находящимися на разной стадии выраженности дезинтеграционных процессов, позволяют установить механизмы активации комплекса мембранных протеаз, осуществляющих специфическую деградацию гемоглобина.

Полученные данные о состоянии эритроцитарных популяций в ходе физических нагрузок, у больных ИБС, осложненной и не осложненной сахарным диабетом, до проведения и после проведения операции аортокоронарного шунтирования, у больных постгеморрагической анемией, позволяет оценить степень повреждения клеток. Ряд интегральных показателей (электродиффузионный потенциал пробоя мембраны, деформируемость, антиокислительная активность, доля неактивного гемоглобина) могут быть использованы как критерии оценки степени нарушения кислородтранспортной и адаптивной функции эритроцитов.

Результаты исследований механизмов дезинтеграции эритроцитов в присутствии лекарственных препаратов, а также данные о протекторном воздействии обзидана на адренорецепторы клетки в условиях гипердреналинемии, позволяют более точно оценить влияние их на организм человека и предположить возможный лечебных эффект и побочное действие. Проведенные исследования состояния эритроцитов после операции аортокоронарного шунтирования дают возможность оценить степень повреждения клеток в условиях реоксигенации и оценить уровень их коррекции с помощью триметазида. На основе полученных данных были предложены методы оценки функционального состояния эритроцитарных популяций у больных ИБС, разработаны и внедрены в клинику

биохимические критерии определения эффективности лечения и возможности компенсаторных реакций эритрона.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Пусковым механизмом серии взаимосвязанных и направленных процессов, ведущих к дезинтеграции эритроцитов является нарастающий энергодефицит, возникающий за счет уменьшения сродства гемоглобина к кислороду и разобщения процесса окисления глюкозы и субстратного фосфорилирования.

2. Скорость развития процессов дезинтеграции зависит от условий функционирования. Лактоацидоз, гипоксия, гипо- и гипергликемия, присутствие нитританионов и аминокпроизводных адамантана увеличивают скорость дестабилизации эритроцитов.

3. Доноры сульфгидрильных групп в условиях лактоацидоза снижают скорость процессов дезинтеграции, а нитрозотиолы увеличивают степень повреждения популяции клеток. Триметазидин в терапевтической дозе снижает уровень ПОЛ в мембране эритроцита и уменьшает степень повреждения популяции клеток в условиях лактоацидоза различной степени выраженности.

4. Антагонисты кальция и бета-блокаторы в условиях лактоацидоза уменьшают скорость дезинтеграции эритроцитов. Обзидан эффективно конкурирует с адреналином за бета-адренорецепторы на мембране эритроцитов и снижает скорость десенситизации рецепторов, улучшая адаптивную функцию клеток в условиях гипердреналинемии.

5. Регулятор кальциевых каналов - N-2(оксиэтил) амид цис-9-октадеценовой кислоты оказывает положительное действие и снижает скорость дезинтеграции эритроцитов в условиях лактоацидоза и окислительного стресса.

6. В условиях гипоксии и лактоацидоза *in vivo* (физическая нагрузка, ИБС, постгеморрагическая анемия) в популяциях эритроцитов растет скорость процессов дезинтеграции и увеличивается процент поврежденных «старых» эритроцитов.

7. Условия окислительного стресса и реоксигенации значительно увеличивают скорость процессов дезинтеграции как *in vivo*, так и *in vitro*. Доноры сульфгидрильных групп, а также триметазидин оказывают протекторное действие и снижают процент поврежденных клеток в популяции эритроцитов.

8. Ускорение процессов дезинтеграции в условиях энергодефицита и окислительного стресса сопровождается изменением спектров генерируемых эритроцитами пептидов, обладающих широким спектром биологической активности.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Результаты исследований были представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Новые технологии в кардиологии», Самара 2000, . на научно-практических конференциях ЦНИЛ Самарского государственного медуниверситета в 1998-1999 гг., на научно-практической конференции «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины» (Пенза, 2000, на юбилейной конференции, посвященной 100-летию кафедры факультативной терапии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2000). А также по материалам диссертационной работы были сделаны доклады на IV межрегиональном кардиологическом форуме «Кардиология на пороге XXI века» (Нижний Новгород, 2000), на Всероссийской конференции «Биоразнообразие и биоресурсы Среднего Поволжья и сопредельных территорий» (Казань, 2002), на Всероссийской научно-практической конференции «Медико-

биологические и психолого-педагогические аспекты адаптации и социализации человека» (Волгоград, 2002).

**ПУБЛИКАЦИИ.** По материалам диссертации опубликовано 21 работа.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследований, трех глав данных собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложений, содержащих абсолютные величины полученных данных. Работа изложена на 271 страницах машинописного текста, иллюстрирована 137 рисунками, содержит 15 таблиц и 35 приложений. В работе использовано 314 источника, из них 270 отечественных и 44 зарубежных авторов.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.**

1. Объектом исследований служила цельная донорская кровь (Самарская областная станция переливания крови), кровь практически здоровых людей, кровь больных ИБС, стабильной стенокардией напряжения (ССН) II и III функциональных классов (Алмазов В.А. и соавт., 1993), имевших в анамнезе инфаркт миокарда, кровь больных с инфарктом миокарда (трансмуральный, 1-2 сутки), кровь больных ИБС, осложненной сахарным диабетом I типа, кровь больных с язвенной болезнью желудка и/или двенадцатиперстной кишки, осложненной гастродуоденальным кровотечением. Фракцию чистых эритроцитов получали с помощью трехкратной отмывки 0,154 М раствором хлористого натрия (рН 7,2,  $t^0 +4^0\text{C}$ ) с режимом центрифугирования и упаковки 600 g, 10 минут.

2. Характеристика обследованных групп людей

А). Доноры (150 человек) Средний возраст –  $38,45 \pm 3,75$  лет. Большая часть сдавали кровь впервые или с годовым перерывом.

Б). Практически здоровые люди. 42 человека, средний возраст  $47,20 \pm 3,15$  лет. Из них у 29 человек забирали также капиллярную кровь в ходе велоэргометрических проб (ВЭП). На момент исследования осмотр терапевта не выявлял наличие заболеваний. Диагноз: здоров подтверждался электрокардиографически и велоэргометрически.

В). Больные ИБС, ССН II и III функциональных классов, постинфарктный кардиосклероз  $\text{H}_0\text{-H}_1$  (112 человек). Возраст от 45 до 60 лет. Диагноз верифицирован клинически, электрокардиографически, коронарографически и по данным велоэргометрии. Обследованные больные находились на лечении или амбулаторном наблюдении в клинике пропедевтической терапии Самарского государственного медицинского университета, Самарском кардиологическом центре, мсч №9 г. Тольятти. Десять больных имели в анамнезе сахарный диабет I типа средней тяжести (средний возраст  $43,50 \pm 3,70$  лет, среднее содержание глюкозы в крови –  $7,4 \pm 2,5$  мм/л).

Условия проведения велоэргометрических проб (ВЭП). ВЭП проводили (велоэргометр «Siemens Elema») в положении сидя, утром (10-11 час) после легкого завтрака и осмотра терапевта. Схема проведения ВЭП ступенчато-возрастающая. Капиллярную кровь забирали до нагрузки, на субмаксимальном уровне и через 10 минут после нагрузки. Причины прекращения пробы соответствовали критериям комитета экспертов ВОЗ (1970). ВЭП проводили для больных, находящихся на амбулаторном (20) наблюдении и стационарном лечении (41).

Больным ИБС, ССН III функциональный класс  $\text{H}_1$ , находящимся на лечении в кардиологическом центре проводилась операция аортокоронарного шунтирования (АКШ) (25 человек). Исследования эритроцитов из венозной крови и плазмы крови проводили до операции, в первые сутки, 7-е сутки и 14-е сутки после операции. Часть больных получала

традиционное антиангинальное лечение (15), другая часть(10) – антиангинальную терапию + триметазидин (предуктал) 60 мг/сутки.

Г). Больные с диагнозом : язва желудка и/или 12-ти перстной кишки, гастродуоденальное кровотечение (12 человек) находились на лечении в реанимационном отделении клиник Самарского государственного медицинского университета. Исследование эритроцитов из венозной крови проводили в 1-е сутки после операции.

### 3. Модельные исследования in vitro

А). Лактатная модель гипоксического состояния (Boning D.et.al., 1989). Цельная кровь или фракция чистых эритроцитов в среде Рингера-Локка (1:1) инкубировали при 37<sup>0</sup>С в течение 20-30 минут с добавками молочной кислоты в концентрациях, имитирующих умеренный и сильный ацидоз: 7,5 мМ/л; 10 мм/л; 20 мМ/л.

#### Б). Лактоацидоз в сочетании с действием других факторов

1. Гипо- и гипергликемия Фракцию чистых эритроцитов в среде Рингера-Локка инкубировали при 37<sup>0</sup>С, 30 минут с добавками молочной кислоты 7,5 мМ/л, глюкозы –2,5 мМ/л; 5 мМ/л; 7,5 мМ/л; 10 мМ/л; 15 мМ/л; 25 мМ/л.

2. Нитриты и L-аргинин. Фракция чистых эритроцитов – лактат (7,5 мМ/л), нитрит натрия и L-аргинин по 2 мм/л. Цельная кровь – лактат (7,5 мМ/л и 10 мМ/л), нитрит натрия и L-аргинин – по 2 мМ/л. Инкубация – 30 минут, 37<sup>0</sup>С. Условиях лактоацидоза (7,5 и 10 мМ/л) также частично корректировали действием 0,4 М гидрокарбоната натрия.

3. Действие доноров сульфгидрильных групп (цистеина, унитиола). Действие изучали на цельной свежезабранной и храненной 3 суток донорской крови. Концентрация унитиола 0,024 мМ/л, 0,05 мМ (на мембраны эритроцитов), концентрация лактата – 7,5 мМ/л.

Действие цистеина изучали в эквимольных с нитритом концентрациях (2 мМ/л), содержание лактата 7,5 мМ/л.

4. Действие антагонистов кальция и бета-блокаторов. Изучали влияние лекарственных препаратов: нифедипина, талинолола, обзидана в разовых терапевтических дозах. Условия лактоацидоза –7,5 мМ/л, гипердреналинемии (в сочетании с обзиданом) – 10 и 20-тикратно физиологическому содержанию адреналина (1 нг/мл).

5. Действие N-(2-оксиэтил) амида-цис-октадеценовой кислоты (олеоилэтанолamina). Синтез олеоилэтанолamina (ОЭА) осуществлен на кафедре органической химии СамГУ к.х.н., доцентом Белоусовой З.П. Чистота и структура полученного соединения подтверждена данными ИК- и ПМР-спектра. Воздействующая концентрация 6 мкг/мл. Уровень лактоацидоза 7,5 мм/л.

6. Действие производных адамантана. Адамантансодержащие аминокислоты синтезированы на кафедре органической химии СамГУ к.х.н. Данилиным А.А. Чистота и структура использованных соединений подтверждена ИК- и ПМР-спектрами. Концентрации воздействия соответствовали разовой терапевтической дозе ремантадина.

7. Действие триметазида (предуктала). Проводили исследования действия разовой терапевтической дозы триметазида на эритроциты донорской крови и крови больных ИБС, ССН III функционального класса. Уровень лактоацидоза -7,5, 10 и 20 мМ/л.

#### В). Модели состояния окислительного стресса

1. Окислительный стресс вызывали добавлением 25 мМ раствора FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O (Rise-Erans C.et al., 1987). Модель 1.

2. Окислительный стресс вызывали добавлением смеси 25 мМ раствора FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O и желточных липопротеидов (Клебанов Г.И. и соавт., 1988). Модель 2.

Фракцию чистых эритроцитов в среде Хенкса (1:1) инкубировали с добавками инициаторов окисления при 37<sup>0</sup>С в течение 20-30 минут.



### Г). Методы определения показателей состояния эритроцитов

#### 1. Состояние гемоглобина

Определяли соотношение форм гемоглобина (Заводник И.В., Лапшина Е.А., 1992; Атауллаханов Ф. И. и соавт., 1984; Winterbourn Ch., 1990), фракцию мембраносвязанного гемоглобина (Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х., 1990), скорость химического окисления гемоглобина (Мышкин А.Е., Богданова Л.Д., 1990), метгемоглобинредуктазную активность ( НАДН-цитохром-b<sub>5</sub>-редуктаза) (Board P.G., 1981; Козлов Н.М., Черницкий Е.А., 1991).

#### 2. Показатели состояния мембраны эритроцитов

Определяли мембранную проницаемость клеток для мочевины (Кадывкина З.М. и соавт., 1987); осмотическую резистентность эритроцитов (Петров В.К., 1985); степень механического гемолиза (Юрков Ю.А. и соавт. 1984); степень гликозилированности мембран (Фелькорен Б.И. и соавт., 1991); индекс фильтруемости эритроцитов (Tannert T.C. et al., 1981); активность ацетилхолинэстеразы (Igusu H. et al., 1980); активность 5'-нуклеотидазы (Рожковский Я.В., Кресюн В.И., 1991); электродиффузионный потенциал пробоя мембраны (Пучкова Т.В. и др. 1983); активность фосфолипазы А<sub>2</sub> (Безруков Г.А., Рубин В.И., 1989).

#### 3. Показатели состояния антирадикальной защиты клеток

Определяли активность супероксиддисмутазы (Дубинина Е.Е. и соавт., 1983), каталазы (Королюк М.А. и соавт., 1988), содержание диеновых конъюгатов и кетонов (Костюк В.А., 1991); малонового диальдегида (Андреева Л.И. и соавт., 1988); антиокислительную активность гемолизатов (Семенов В.А., Ярош А.М., 1991).

4. Показатели состояния метаболических процессов. Определяли активность лактатдегидрогеназы (Beutler E., 1971); глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Beutler E., 1963); скорость поглощения глюкозы, содержание АТФ; скорость поглощения кальция, используя стандартные наборы фирмы Boeringer Weithelm.

5. Содержание субстратов и среднемолекулярных соединений. Определяли содержание молочной кислоты (Bergmeier H., 1975); среднемолекулярных соединений по спектру поглощения в УФ-области хлорных и ТХУ-экстрактов (Горанчук В.В. и др., 1999). Хроматографический анализ проводили, используя метод тонкослойной хроматографии на силикагеле (Шлянкевич А.М. и др., 1986) и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (Mant C.T., Hodges R.S., 1995).

В работе применялись следующие приборы: фотоэлектроколориметр КФК-3; спектрофотометры Uvispek (Англия) и СФ-26, иономер ЭВ-74; центрифуги ОПН-8. ЦЛР-1, Micro 17M<sup>+</sup> (Korea); ультратермостат УТ-15; жидкостные хроматографы «Мелихром», Waters 600S (Korea). Реактивы фирм: Chema, Serva, Sigma, Aldrich, Boeringer.

Статистическая обработка проведена общепринятыми методами с использованием нормального распределения Фишера и критерия Стьюдента-Фишера. Обработка результатов хроматографического анализа пептидов проводилась с использованием компьютерной программы Millenium (Waters).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Вопросы механизмов дезинтеграции и гибели клеток представляют в настоящее время значительный интерес. Детальное изучение их позволило бы продвинуться вперед в решении проблем лечения и профилактики таких распространенных и опасных заболеваний человека как инфаркт миокарда, инсульт, злокачественные опухоли. Данные патологические процессы сопровождаются развитием гипоксии и ишемии тканей, гибелью клеток путем некроза и апоптоза. Последующая

реоксигенация вызывает «взрыв» активных форм кислорода (АФК), окислительный стресс и последующий апоптоз как клеток-продуцентов АФК, так и их соседей.

Весьма интересной моделью изучения механизмов постепенной дезинтеграции и гибели клетки является эритроцит человека. Эритроцит, поступивший в кровяное русло, уже как бы включает программу собственной дезинтеграции и гибели в процессе функционирования. Очевидно, что скорость дезинтеграции эритроцитарных клеток, имеющих определенный количественный запас функциональных белков, тесно связана с условиями их существования. Стабильность клеток определяется степенью нативности мембранных структур, состоянием гемоглобина, скоростью метаболических процессов. Стабилизировать мембрану и метаболические процессы в эритроцитах могут плазменные белки, липиды. Способствует этому и устойчивость параметров гомеостаза, гормональный баланс. Наоборот, гипоксия и гипероксия, закисление среды, изменение соотношения информационных молекул, действие ксенобиотиков и лекарственных препаратов могут значительно ускорить процессы дезинтеграции и гибели эритроцитарных клеток. Поврежденная популяция клеток утрачивает необходимую функциональную активность, усугубляя развивающиеся патологические изменения в организме.

### **1. Механизмы дезинтеграции эритроцитов в условиях гипоксии и лактоацидоза.**

Были изучены механизмы развития процессов дезинтеграции в условиях лактоацидоза различной степени выраженности (7,5; 10; 20 мМ/л). А также сочетание лактоацидоза с действием лекарственных и химических соединений.

Лактоацидоз дозозависимо приводит к ускорению метгемоглобинообразования, увеличению фракции мембраносвязанного гемоглобина, росту скорости химического окисления гемоглобина феррицианидом калия. Наблюдается нарастание степени дезинтеграции мембранных структур: увеличивается мембранная проницаемость для мочевины, процент перекисного гемолиза, снижается способность клеток к деформации мембраны и цитоскелета. О дезинтеграции фосфолипидного слоя и изменении белок-белковых взаимодействий свидетельствует также увеличение активности 5'-нуклеотидазы (Рожсковский Я.В., Кресюн В.И., 1991) и снижение АТФ-ной активности (Казеннов А.М. и др., 1999; Шалабодов А.Д., 2001). Метгемоглобинредуктазная активность как механизм компенсации растет до условий лактоацидоза 10 мМ/л, концентрация 20 мМ/л сопровождается снижением НАДН-цитохром- $b_5$ -редуктазной (НАДН-ФЦР) активности. В условиях лактоацидоза преимущественно также дозозависимо наблюдается снижение активных концентраций ферментов АОЗ : каталазы, СОД (табл.1).

Полученные нами данные свидетельствуют о чрезвычайно важном значении в сохранении стабильности эритроцитарных клеток изменений концентрации протонов в инкубационной среде. Сдвиг рН в кислую сторону ведет к снятию ингибирования с 2,3-дифосфоглицератмутазы (2,3-ДФГМ) и образованию комплекса 2,3-ДФГМ с 3-глицеральдегид-фосфатдегидрогеназой (3-ГАФДГ) (Фокина К.Б., и др. 2000). Ускорение производства 2,3-ДФГ уменьшает уровень выхода АТФ в гликолизе.

Длительное снижение рН, таким образом, ведет к постепенному нарастанию энергодефицита и ускорению дезинтеграционных процессов в клетке. Кроме того, уменьшение сродства гемоглобина к кислороду будет сопровождаться потерей кислорода в более крупных сосудах еще до входа эритроцитов в капилляры. Так как лактоацидоз – прямое следствие гипоксии, можно предположить, что ускорение дезинтеграционных

процессов из-за развития энергодефицита, характерно для эритроцитов, находящихся в условиях гипоксии.

Изучение состояния популяции клеток *in vivo*, находящихся в условиях временной или относительно постоянной гипоксии и лактоацидоза, позволяет обнаружить повреждения эритроцитов подобные тем, которые мы наблюдали *in vitro*. Временное состояние гипоксии и лактоацидоза воспроизводятся в условиях дозированных физических нагрузок (ФН). У нетренированных практически здоровых людей (ПЗЛ) с толерантностью 150 Вт на высоте нагрузочного теста содержание молочной кислоты возрастает в три раза от исходной и через 10 минут после окончания нагрузки еще на 50% выше, чем до нагрузки.

Таблица 1

Состояние эритроцитов в условиях лактоацидоза различной степени выраженности

Показатели	Контроль	Содержание молочной кислоты в мМ/л		
		7,5	10	20
1. Дезоксигемоглобин, %	47,78±0,15	48,06±0,30	47,67±0,24	47,28±0,25
2. Оксигемоглобин, %	49,50±0,25	49,49±0,17	48,99±0,19	48,62±0,23 P<0,01
3. Метгемоглобин, %	1,66±0,18	2,68±0,17 P<0,01	3,33±0,17 P<0,01	3,99±0,25 P<0,01
4. Скорость хим.окисл. гемоглобина, мкМ/мин	0,68±0,04	1,08±0,02 P<0,01	1,44±0,05 P<0,05	1,88±0,08 P<0,01
5. Мембранная проницаемость, % гемолиза	48,54±2,68	74,81±2,59 P<0,01	76,96±4,95 P<0,01	78,40±2,82 P<0,01
6. Деформируемость, у.е.	1,22±0,11	0,85±0,10 P<0,01	0,66±0,08 P<0,01	0,52±0,10 P<0,01
7. Степень пере-кисного гемолиза, %	17,65±0,02	20,43±0,30 P<0,01	21,72±0,41 P<0,01	25,42±0,47 P<0,01
8. Активность НАДН-цитохром-b <sub>5</sub> -редуктазы, мМ/мин	9,90±1,12	24,68±1,49 P<0,01	34,04±2,14 P<0,01	21,11±1,73 P<0,01
9. Активность 5'-нуклеотидазы, мкМ/мин	0,225±0,04	0,417±0,05 P<0,01	0,602±0,03 P<0,01	0,769±0,08 P<0,01
10. Активность K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> АТФ-зы, мкМ/мин	0,553±0,05	0,349±0,04 P<0,01	0,338±0,05 P<0,01	0,248±0,07 P<0,01

Таким образом, эритроциты попадают в условия временного лактоацидоза. Исследование показателей состояния эритроцитов на субмаксимальном уровне выявляет изменения, свидетельствующие о появлении в популяции клеток с высокой скоростью метгемоглобинообразования (табл.2). Возможно, что это связано также с малой эффективностью перераспределительного эритроцитоза, когда из депо выходят уже частично поврежденные клетки в различной стадии развития дезинтеграционных процессов.

Отсутствие достоверных изменений каталитической активности ряда ферментов (НАДН-ФЦР, ЛДГ, АХЭ) свидетельствует о присутствии в популяции достаточного количества функционально полноценных клеток. К тому же мы наблюдали повышение

уровня оксиформы и снижение дезоксигемоглобина в капиллярной крови в период отдыха, что с одной стороны уменьшает эффективность отдачи кислорода, а с другой – увеличивает производство АТФ в клетках и способствует замедлению дестабилизации клеток (табл.2).

Таблица 2

Изменение популяции эритроцитов в ходе дозированных физических нагрузок у практически здоровых людей

Показатели	До нагрузки	Нагрузка 150 Вт	Через 10 минут
1. Молочная к-та в плазме, мм/л	1,06±0,07	3,87±0,15 P<0,0)	2,19±0,14 P<0,01
2. Дезокси Нв,%	54,53±0,13	54,74±0,16	52,80±0,09 P<0,01
3. Окси Нв,%	43,61±0,11	43,03±0,17	44,94±0,15
4. Мет Нв,5	1,06±0,27	2,23±0,31	2.26±0,43 P<0,01
5. Мембрано-связанный Нв, %	5,89±0,81	6,84±0,72	5,72±0,68
6. НАДН-ФЦР, мМ/мин	8,34±0,34	7,39±0,35	8,44±0,33
7. АХЭ, мкМ/мин	209,03±5,51	225,68±5,60	209,33±4,71
8. ЛДГ, мкМ/мин	243,65±3,97	242,86±4,07	234,51±3,91

Ускорение метгемоглобинообразования и выброс из депо уже в некоторой степени поврежденных клеток приводит к временному ухудшению популяции циркулирующих клеток у нетренированных людей. Однако, более быстрое старение и разрушение эритроцитов в этом случае может оказаться полезным для обновления популяции, так как стимулирует эритропоэз ( Шашкин А.В., Терехов И.А., 1986; Ненашев А.А. и др.,1993).

Условия хронической гипоксии и лактоацидоза могут сопровождать такое заболевание как ишемическая болезнь сердца (ИБС). Исследование большого контингента больных ИБС, стабильной стенокардией напряжения II и III функциональных классов, мы наблюдали более или менее выраженные признаки повреждения эритроцитарных популяций как в венозной, так и в капиллярной крови. Анализ полученных данных позволяет рассматривать изменения показателей как результат действия хронической гипоксии и избытка молочной кислоты в плазме. Практически у 80-90% больных ИБС обнаруживается повышенный уровень метгемоглобинообразования, снижение фоновой активности большинства исследованных ферментов, кроме 5-нуклеотидазы и фосфолипазы А<sub>2</sub>. Если процент метгемоглобина обычно четко зависит от функционального класса стенокардии, то процент изменения активных концентраций ферментов значительно варьирует. Это хорошо объясняется различием состава популяций эритроцитов в момент исследования, состоянием процессов эритропоэза, тяжестью и длительностью заболевания, принимаемыми лекарственными препаратами и их количеством, уровнем компенсации сдвигов гомеостаза. Достоверные различия между показателями достигаются усреднением большого количества полученных данных. Кроме скорости метгемоглобинообразования, нами были обнаружена зависимость от функционального класса стенокардии ряда интегральных показателей, характеризующих в основном мембрану эритроцитов (табл.3). Хорошо отражают состав циркулирующей популяции эритроцитов и позволяют в каждом конкретном случае оценить степень повреждения и, соответственно, функциональной активности клеток, такие параметры

как: значение электродиффузионного потенциала пробоя мембраны, процент мембраносвязанного гемоглобина, деформируемость.

Определить степень повреждения и возможности обновления популяции клеток, эффективность лечения и перераспределительного эритроцитоза у больных ИБС, можно также, изучая изменения популяции эритроцитов в ходе ВЭП.

Нами были изучены показатели состояния эритроцитов в ходе ВЭП у больных ИБС, ССН II и III функциональных классов, получавших курсы традиционного амбулаторного или стационарного лечения. После проведения курса амбулаторного лечения больным ИБС, ССН II функционального класса толерантность к ФН составила 90 Вт. Исследование капиллярной крови до нагрузки выявляет наличие повреждений клеток, характерный для условий значительного лактоацидоза. Содержание молочной кислоты в плазме превышает таковой у ПЗЛ в среднем на 40%, на высоте нагрузочного теста наблюдается отсутствие эффективности перераспределительного эритроцитоза, т.е. из депо выходят уже дезинтегрированные клетки.

Таблица 3.

Состояние эритроцитарных популяций у больных ИБС, ССН II и III функционального класса (венозная кровь)

Показатели	ПЗЛ, n=20	ИБС, ССН II ф.к. n=18	ИБС, ССН III ф.к. , n=15
1. Молочная к-та в плазме, мМ/л	1,23±0,17	1,99±0,15 P<0,01	2,06±0,18 P<0,01
2. Мет Нв, %	1,15±0,10	2,51±0,18 P<0,01	2,98±0,15* P<0,01
3. Мембрано-связанный Нв,%	5,85±0,12	7,98±1,25 P<0,05	10,54±0,84* P<0,01
4. НАДН-ФЦР, мМ/мин	8,165±0,412	6,140±0,261 P<0,01	5,437±0,235* P<0,01
5. АХЭ, мкМ/мин	194,53±3,86	194,28±3,33	201,35±3,98
6. ЛДГ, мкМ/мин	241,93±4,12	193,45±3,57 P<0,01	167,50±3,03* P<0,01
7. СОД, у.е.	4,93±0,51	3,58±0,25 P<0,05	3,01±0,12* P<0,05
8. Деформируемость, у.е.	0,956±0,024	0,733±0,050 P<0,01	0,673±0,060* P<0,01
9. Элект.дифф. потенциал пробоя, мВ	60,56±1,25	52,66±0,90 P<0,01	48,50±1,45* P<0,01
10. 5`-нуклеотидаза, мкМ/мин	0,999±0,089	1,772±0,146 P<0,01	1,958±0,048 P<0,01

Примечание \*P<0,01 по отношению к больным ССН II функционального класса

Степень повреждения популяции можно оценить по скорости метгемоглобинообразования и доли мембраносвязанного гемоглобина, так как возможность заглупления триптофановых остатков гемоглобина определяется уровнем дезинтеграции фосфолипидного слоя мембраны (Ушакова И.П. и др., 1981). Проведение курса лечения в условиях стационара приводит к повышению толерантности к ФН до 115 Вт. Однако изучение состояния популяции эритроцитов показало, что большая часть

клеток отличается высокой скоростью метгемоглобинообразования, истощением ресурсов метгемоглобинредуктазных систем, дезинтеграцией мембран, снижением фоновой активности ферментов (табл.4).

Таблица 4.

Изменение эритроцитарных популяций в ходе физических нагрузок у больных ИБС, ССН II функционального класса

Больные ИБС, ССН II функциональный класс, амбулаторное лечение			
Показатели	До нагрузки	Нагрузка 90 Вт	Через 10 минут
1. Молочн. к-та в плазме, мМ/л	1,53±0,19 *P<0,05	4,09±0,26 P<0,01	6,17±0,26** P<0,01
2. Дезокси Нв, %	57,50±0,28 *P<0,05	57,04±0,27	56,02±0,42
3. Окси Нв, %	40,05±0,17 *P<0,05	39,85±0,23 *P<0,01	39,02±0,35 P<0,01
4. Мет Нв, %	2,42±0,19 *P<0,05	3,11±0,25 P<0,01	5,78±0,41** P<0,01
5. Мембраносв. Нв, %	4,16±0,81	11,42±0,75 P<0,01	17,32±0,67** P<0,01
6. НАДН-ФЦР, мМ/л	5,69±0,24 *P<0,05	4,55±0,22 P<0,01	4,54±0,23 P<0,01
7. АХЭ, мкМ/мин	209,86±3,28	211,58±3,57	197,95±3,29 P<0,01
8. ЛДГ, мкМ/мин	177,25±3,58 *P<0,01	192,10±3,47 P<0,01	208,45±3,43 P<0,01
Больные ИБС, ССН II функциональный класс, стационарное лечение			
1. Мол. к-та в плазме, мМ/л	1,54±0,18 *P<0,01	4,34±0,24 P<0,01	5,63±0,29 P<0,01
2. Дезокси Нв, %	59,48±0,41 *P<0,01	57,75±0,37 P<0,01	56,90±0,28 P<0,01
3. Окси Нв, %	36,88±0,18 *P<0,01	36,57±0,21 P<0,01	36,94±0,25 P<0,01
4. Мет Нв, %	2,78±0,73 *P<0,01	5,66±0,46 P<0,01	6,16±0,87 P<0,01
5. Мембраносв. Нв, %	6,55±0,51	8,35±0,62	12,15±0,80** P<0,01
6. НАДН-ФЦР, мМ/л	7,08±0,26	5,67±0,22 P<0,01	5,74±0,24 P<0,01
7. АХЭ, мкМ/мин	200,67±3,46	194,23±2,75	185,05±3,86 P<0,01
8. ЛДГ, мкМ/мин	190,76±3,72	177,25±3,67 P<0,01	176,66±3,56 P<0,01

Примечание \*P<0,01 по отношению к ПЗЛ; \*\*P<0,01 по отношению к субмаксимальной нагрузке

Больным ИБС, ССН III функционального класса физическая нагрузка проводилась после курса традиционного стационарного лечения. Исходная популяция эритроцитов в капиллярной крови отличалась высокой степенью повреждений, которая увеличивалась в ходе ВЭП, несмотря на невысокую мощность (70 Вт). Мы наблюдали значительный рост количества клеток с высокой скоростью метгемоглобинообразования, увеличение фракции мембраносвязанного гемоглобина, что свидетельствует о дезинтеграции фосфолипидного слоя мембраны.

Таким образом, исследование эритроцитов из капиллярной крови в ходе физических нагрузок позволяет оценить степень повреждения популяции эритроцитов как в циркулирующей крови, так и находящихся в кровяных депо и подтвердить, что основным повреждающим фактором является закисление среды функционирования клеток. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что определение уровня лактоацидоза у больных ИБС является очень важным, так как от него зависит скорость дезинтеграции эритроцитов и ухудшение их функциональной активности.

Индивидуальный (для конкретного больного) анализ показателей скорости дезинтеграционных процессов и процента повреждения популяции эритроцитов может быть использован для оценки и прогнозирования возможностей компенсаторных механизмов поддержания кислородтранспортных, адаптационных и регуляторных функций данных клеток, что в свою очередь является весьма важным и для организма в целом.

Для оценки состояния эритроцитов и анализа механизмов повреждения эритроцитарных популяций в условиях гипоксии *in vivo* мы также исследовали эритроциты больных, прооперированных по поводу язвы желудка и/или 12-ти перстной кишки, осложненной гастродуоденальным кровотечением. В первые сутки после операции эритроциты из венозной крови характеризовались повышением скорости процессов аутоокисления гемоглобина и снижением возможностей метгемоглобинредуктазных систем. Увеличивается также фракция мембраносвязанного гемоглобина, что свидетельствует об ускорении дезинтеграционных изменений в мембране, что в свою очередь приведет к снижению резистентности клеток и усилению спонтанного гемолиза.

Таким образом, у больных с постгеморрагической анемией в кровяном русле увеличивается доля неактивного гемоглобина, что усугубляет явления гипоксии. Для оценки степени повреждения популяции эритроцитов и их функциональной полноценности нами предложен простой и информативный метод определения доли неактивного гемоглобина. Он представляет собой расчет коэффициента отношения мембраносвязанного гемоглобина к общему содержанию гемоглобина. В первые сутки после операции по поводу язвы желудка и/или 12-ти перстной кишки, осложненной гастродуоденальным кровотечением доля неактивного гемоглобина у больных в 2 раза в среднем превышала таковую у доноров.

## **2. Механизмы повреждения эритроцитов в условиях действия лекарственных и химических препаратов**

Традиционным лечением ИБС является лечение с применением нитропрепаратов, оказывающих значительный вазодилатирующий эффект за счет образования окиси азота. Однако, нитританионы, поступая в кровь, оказывают повреждающее воздействие на эритроцитарные клетки. Нами было изучено действие нитрита натрия и L-аргинина (L-арг), который является субстратом для производства эндогенного NO (Ванин А.Ф. и др., 1991). Добавление нитрита натрия и L-арг в эквимольной концентрации (2 мМ/л)

сопровождалось ингибированием фосфолипазы A<sub>2</sub>, процент ингибирования был выше у нитрита натрия. Подобный эффект наблюдается и в случае использования эритроцитов, полученных из крови больных инфарктом миокарда. Однако, ингибирование фосфолипазы A<sub>2</sub> является непродолжительным и через 15 минут инкубации наблюдается рост активности фермента, то есть регулирующее действие нитританионов непродолжительно. Так как нитриты являются традиционным лекарственным средством для лечения ИБС, нами было изучено действие нитританионов и L-аргинина на эритроциты и цельную кровь в условиях лактоацидоза (7,5 мМ и 10 мМ).

Действие нитританионов на фоне лактоацидоза характеризуются более высокой скоростью дезинтеграции, о чем свидетельствует больший процент метгемоглобина, активация НАДН-цитохром-b<sub>5</sub>-редуктазы. Хотя следует отметить, что в начальный период нитриты замедляют процессы дезинтеграции, вероятно, за счет угнетения активности фосфолипаз в условиях активации гуанилатциклазной системы (Северина И.С., 1995). Мы наблюдали снижение активности 5'-нуклеотидазы, улучшение деформируемости клеток. Однако продолжается снижение активности АТФ-зы, уменьшается скорость поступления глюкозы в клетку. Все это в конечном итоге будет способствовать ускорению повреждения эритроцитов в условиях лактоацидоза.

Повреждающее действие NO<sup>•</sup> во многом связано с генерацией ONOO<sup>-</sup>, который сам и продукты его распада разрушают биологические структуры путем нитрозолирования (Padmaja S., Huie R., 1993).

Протекторным действием обладают доноры SH-групп, способные взаимодействовать с ONOO<sup>-</sup> с образованием нитрозотиолов. Найден защитный эффект цистенина, унитиола (Гамалей И.А., Ключин И.В., 2000).

Таблица 5.

Действие нитрозотиолов на фоне лактоацидоза на эритроциты

Показатели	Деформируемость, у.е.	Активность 5'-нуклеотидазы, мкМ/мин	Активность Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> АТФ-зы, мкМ/мин	Скорость поглощения глюкозы, мкМ/мин
Контроль	1,22±0,11	0,225±0,043	0,553±0,052	20,00±0,31
Молочная к-та, 7,5 мМ	0,85±0,10 P<0,05	0,417±0,05 P<0,01	0,349±0,051 P<0,01	12,66±0,31 P<0,01
Молочная к-та, 10 мМ	0,66±0,08 P<0,01	0,602±0,120 P<0,01	0,338±0,050 P<0,01	10,42±0,45 P<0,01
Молочная к-та 7,5 мМ+нитрит 2 мМ	0,84±0,04 P<0,05	0,292±0,022*	0,290±0,080 P<0,01	9,33±0,19 P<0,01
Молочная к-та, 10 мМ+нитрит 2 мМ	0,69±0,04 P<0,01	0,394±0,061*	0,244±0,038 P<0,01	6,66±0,22 P<0,01

Примечание \*P<0,01 по отношению к пробам с лактатом

Нами было изучено действие нитрозотиолов на эритроциты человека в условиях лактоацидоза и без него. Действие цистенина и унитиола в сочетании с эквимоллярной концентрацией нитританиона снижает уровень повреждений и скорость метгемоглобинообразования по сравнению с воздействием только нитританионов. Протекторное действие доноров SH-групп обнаруживается и в условиях лактоацидоза.



Совместное влияние нитританионов, доноров SH-групп на фоне лактоацидоза характеризуется потерей защитного воздействия цистеина и скорость процессов дезинтеграции остается высокой и по некоторым показателям даже выше, чем в условиях действия нитританионов в сочетании с лактоацидозом (табл. 5). Доноры SH-групп теряют протекторные свойства и, возможно, приобретают прооксидантные. Кроме того, известно ингибирующее влияние нитрозотиолов на глицероальдегидфосфатдегидрогеназу и ЛДГ (Языкова М.Ю., 2000).

### 3. Механизмы дезинтеграции эритроцитов в условиях гипо- и гипергликемии

Глюкоза является основным энергетическим метаболитом в эритроцитах. Она утилизируется в 2-х процессах: гликолизе и пентозофосфатном пути окисления (Атауллаханов Ф.И., 1981). Избыток глюкозы приводит к активации неферментативного взаимодействия с  $\epsilon$ -аминогруппами лизина в белковых молекулах (гликирование) (Голубев А.Г., 1996). В эритроцитах прежде всего гликированию подвергается гемоглобин. В норме содержание гликированного гемоглобина колеблется в пределах 4-6%, у больных сахарным диабетом в зависимости от уровня глюкозы в крови содержание гликированного гемоглобина увеличивается до 7-12% (Торосян Л.Г., 1988). Гликированию подвергаются и другие белки и фосфолипидный слой, что ведет к нарушению кислородтранспортной функции эритроцитов. Наши исследования показали, что гипергликемия дозозависимо ускоряет процессы дезинтеграции эритроцитов. Основным механизмом здесь является повреждение функциональных белков за счет процессов гликирования. В условиях действия 25 мМ/л глюкозы мы наблюдали почти 4-х кратное увеличение степени гликозилированности мембранных белков клетки (рис.1), снижение активности каталазы за счет, вероятно, гликирования по лизину, расположенному вблизи геминовой группировки, определяющей ферментативную активность каталазы. Гликирование белков ведет к повышению вероятности неспецифической агрегации белков, снижая возможность образования эффективных белок-белковых комплексов и увеличивает мембранную проницаемость клеток (рис.1) и скорость процессов денатурации белков.

Сахарный диабет часто является заболеванием, сопутствующим ИБС и, наоборот, ишемическая болезнь развивается на фоне сахарного диабета. У больных ИБС, осложненной сахарным диабетом, состояние гипергликемии может сопровождаться гипоксией и лактоацидозом, поэтому нами было изучено сочетание действия условий гипергликемии и лактоацидоза (7,5 мМ/л).

Гипергликемия в сочетании с лактоацидозом приводит к ускорению аутоокисления гемоглобина как в эритроцитах доноров, так и в эритроцитах больных ИБС, осложненной сахарным диабетом. Наблюдается увеличение фракции мембраносвязанного гемоглобина, снижение активных концентраций каталазы, причем степень угнетения ферментативной активности оказалась больше в эритроцитах, выделенных из крови больных.

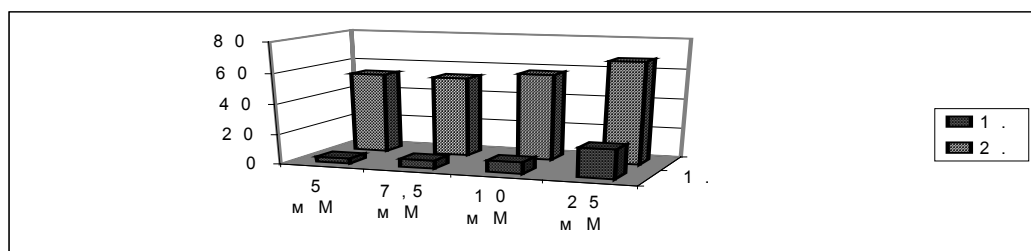


Рис.1. Степень гликозилированности мембран, у.е. (1) и мембранная проницаемость для мочевины, % (2) в условиях гипергликемии (эритроциты доноров).

Условия даже небольшой гипогликемии (2,5 мМ) в сочетании с лактоацидозом оказывает большее повреждающее воздействие, чем небольшой избыток глюкозы. Основной причиной этого является усугубление и ускорение развития энергодефицита при недостатке глюкозы. Однако скорость метгемоглинообразования выше в условиях гипергликемии в сочетании с лактоацидозом. Это обстоятельство объясняется непосредственным влиянием гликирования гемоглобина на скорость его окисления. Процент содержания метгемоглобина увеличивается при сочетании лактоацидоза с гипогликемией в 1,35 раза, при сочетании с гипергликемией (10 мМ) в 2,2 раза.

В эритроцитах больных ИБС, осложненной сахарным диабетом, наблюдается иное направление изменений содержания метгемоглобина при сочетании гипо- и гипергликемии с лактоацидозом. Процент роста метгемоглобина в условиях гипогликемия+лактоацидоз выше, чем в условиях гипергликемия+лактоацидоз. Таким образом, для больных ИБС, осложненной сахарным диабетом увеличение содержания молочной кислоты в плазме крови окажет наиболее повреждающее воздействие в условиях гипогликемии, чем гипергликемии.

В качестве модели для изучения механизмов дезинтеграции эритроцитов в условиях энергодефицита и лактоацидоза нами было использовано хранение крови в холодильной камере при  $10^0-12^0\text{C}$ . Эти условия позволяют (за счет замедления процессов метаболизма) получить популяцию клеток с постепенным развитием дезинтеграционных процессов. Определение содержания глюкозы и молочной кислоты в плазме храненной крови показало на третьи сутки хранения, что количество глюкозы уменьшилось в 3,75 раз, а молочной кислоты – увеличилось в 2,25 раза.

Популяция эритроцитов, полученных из храненной в течение 3-х дней крови, характеризуется изменениями, аналогичными для сочетания гипогликемии и лактоацидоза: наблюдалось снижение сродства гемоглобина к кислороду, увеличение процента метгемоглобина и мембраносвязанного гемоглобина, рост скорости химического окисления гемоглобина, уменьшение антиокислительной активности (АОА) эритроцитарных гемолизатов, увеличение мембранной проницаемости для мочевины, снижение активных концентраций каталазы. Все изменения являются непосредственным результатом снижения количества АТФ за счет уменьшения темпов синтеза.

Об этом свидетельствует уменьшение уровня поглощения хлорными экстрактами эритроцитов в области 254-258 нм (область максимального поглощения адениловых нуклеозидфосфатов)(рис.2). Уменьшение количества АТФ при хранении крови подтверждается данными Слобожаниной Е.И. и др.(1982).

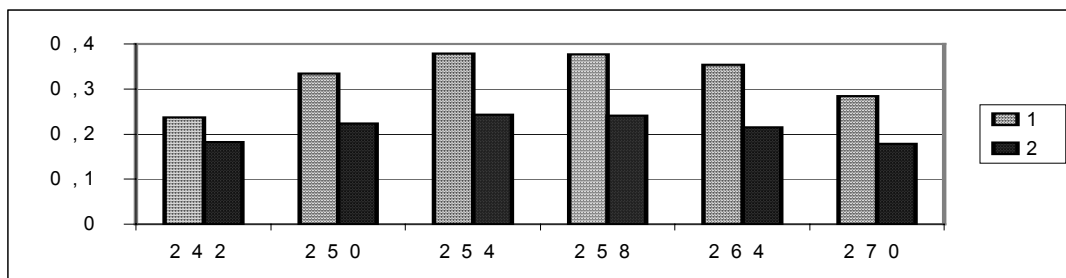


Рис.2. Спектры поглощения среднемолекулярных соединений хлорных экстрактов свежей (1) и храненной крови (3-е суток), у.е.

Таким образом, эритроциты из храненной крови могут служить моделью популяции клеток, поврежденных условиями энергодефицита и лактоацидоза. Эта модель

была использована нами для изучения влияния доноров SH-групп на скорость процессов дезинтеграции эритроцитов и спектров коротких пептидов в ТХУ-экстрактах клеток. Добавление в храненную кровь унитиола (0,24 мМ) сопровождается при последующей инкубации при 37<sup>0</sup>С уменьшением скорости метгемоглобинообразования, снижением фракции мембраносвязанного гемоглобина. Это связано с использованием SH-групп для стабилизации работы метгемоглобинредуктазных систем, снижением скорости ПОЛ в мембране. Унитиол в разовой терапевтической дозе повышает АОА эритроцитарных гемолизатов, снижает мембранную проницаемость для мочевины и приводит к уменьшению скорости дезинтеграции мембран.

Изучение спектров коротких пептидов из ТХУ-экстрактов свежей и храненной крови показало, что они имеют существенные отличия (табл.6). Например, 11-членный пептид, являющийся фрагментом  $\alpha$ -цепи гемоглобина и обладающий гемопоэтической активностью, обнаруживается и в свежей и храненной крови, но площадь пика данного пептида возрастает по мере увеличения сроков хранения, а, следовательно, и нарастания процента поврежденных клеток в популяции.

Обнаружение пептидов, обладающих гемопоэтической активностью в экстрактах из свежей крови обусловлено изначальной гетерогенностью популяции клеток, в которой всегда присутствует определенный процент эритроцитов с высокой скоростью процессов дезинтеграции (старые клетки).

Таблица 6.

Факторы удерживания (k), аминокислотная последовательность и биологические свойства идентифицированных пептидов, выделенных из экстрактов свежей и храненной крови

Время хранения, дни	k	Аминокислотная последовательность	Биологическая активность
3 5 7	0,27 0,26 0,26	Thr-Ser-Leu-Tyr-Arg	Фрагмент $\alpha$ -цепи гемоглобина, неизвестна
3 5 7	0,71 0,71 0,72	Val-His-Leu-Thr-Arg-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala-Val	Рилизинг-фактор соматотропного гормона
3 7	1,21 1,21	Val-His-Leu-Thr-Pro-Gly-Gly-Glu-Lys-Ser-Ala-Val	неизвестна
Свежая кровь 3 7	6,62 6,62 6,63	Ala-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-Asn-Val	Фрагмент $\beta$ -цепи гемоглобина, неизвестна
3 7	1,68 1,69	Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-His-Arg-Arg-Tyr-His	Гемопоэтическая активность?
Свежая кровь 3 5 7	1,06 1,05 1,05 1,05	Val-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr-Asn-Val	Гемопоэтическая активность

Мы предположили, что причиной активации мембранных протеаз могут стать определенное состояние белок-белковых и белок-липидных взаимодействий в мембране, что в свою очередь определяется степенью дезинтегрированности клеток. Избыток протонов, развивающийся энергодефицит, ускорение аутоокисления гемоглобина, его углубление в мембрану и, наконец, формирование кластеров гемихрома, могут способствовать активации высокоспецифических протеаз и существенно изменять спектр производимых клеткой пептидных соединений.

#### 4. Дестабилизация эритроцитов при действии бета-блокаторов и антагонистов кальция в условиях гипоксии, лактоацидоза, энергодефицита и гипердреналинемии

Действие антагонистов кальция (финаптин, нифегексал) и бета-блокаторов (талинолол, обзидан) в условиях лактоацидоза характеризуется уменьшением скорости метгемоглобинообразования, снижением доли мембраносвязанного гемоглобина, наблюдается улучшение мембранной проницаемости и механической резистентности мембран клеток, увеличение активных концентраций каталазы. Таким образом, антагонисты кальция и бета-блокаторы в разовых терапевтических дозах оказывают благоприятное действие на эритроцитарные клетки в условиях лактоацидоза (7,5 мМ). Механизм данного явления, возможно, состоит в оптимизации кальций-зависимых процессов, что стабилизирует работу основных систем клетки.

Для более детального выявления механизма стабилизирующего действия бета-блокаторов на эритроцитарные клетки, нами было изучено действие обзидана на фоне гипердреналинемии. Мы использовали 20-ти кратную физиологической концентрации адреналина и разовую терапевтическую дозу обзидана. Инкубация эритроцитов у этих условиях сопровождается увеличением количества лиганда, адсорбированного на мембране эритроцитов (рис.3). Это дает возможность предположить, что в начальный период времени обзидан эффективно связывается бета-адренорецепторами эритроцитарной мембраны, а затем постепенно вытесняется лигандом. Десенситизация рецепторов в присутствии обзидана идет более медленно за счет связывания антагониста, а высокая скорость разрушения адреналина по сравнению с временем полувыведения обзидана дает возможность для стабилизации мембраны, приводит к уменьшению подвижности аннулярного слоя липидов вокруг бета-блокатора (Дворянин Г.Ф. и др, 1980) и затруднению интернализации рецептора. Уменьшение скорости интернализации рецепторов с одной стороны, создает возможность связывания с ними лиганда и уменьшения интенсивности действия адреналина на бета-рецепторы сосудов, с другой стороны, снижает скорость повреждения эритроцитарной мембраны.

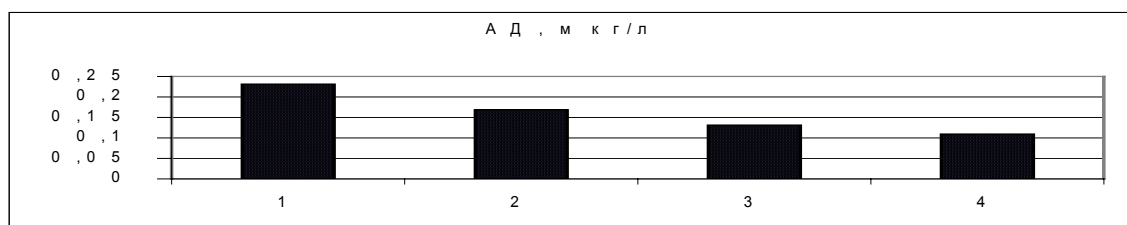


Рис.3. Количество адреналина в экстрактах эритроцитов и плазмы. 1- Адреналин+обзидан, эритроциты; 2- адреналин, эритроциты; 3- адреналин, плазма; 4. Адреналин+обзидан, плазма.

Увеличение концентрации адреналина в плазме крови у больных ИБС обычно происходит на фоне хронической гипоксии и лактоацидоза. Многолетние исследования,

проводимые нами, выявили у больных ИБС превышение уровня содержания молочной кислоты в плазме крови до 2,5-3 мМ/л против 1,0-1,5 мМ/л у ПЗЛ.

Инкубация эритроцитов в среде, содержащей 10-ти кратную физиологической концентрации адреналина и 7,5 мМ молочной кислоты сопровождается ростом скорости метгемоглобинообразования и доли мембраносвязанной фракции белка, увеличением активности фосфолипазы А<sub>2</sub> и 5'-нуклеотидазы в мембранах клеток, снижением сродства гемоглобина к кислороду. Добавление обзидана в инкубационную среду приводит к уменьшению процента метгемоглобина и мембраносвязанного гемоглобина. Понижаются активные концентрации фосфолипазы А<sub>2</sub> и 5'-нуклеотидазы, что свидетельствует об уменьшении степени деградации мембранных фосфолипидов (Рожковский Я.В., Кресюн В.И., 1991). В целом действие обзидана на эритроциты в условиях гипердреналинемии и лактоацидоза можно оценить как благоприятное, уменьшающее повреждающее воздействие избытка адреналина и молочной кислоты. Однако, при этом наблюдается значительное снижение сродства гемоглобина к кислороду, что может привести к массовой его потери по пути к капиллярам и будет способствовать усугублению гипоксии.

### **5. Влияние триметазидина и N-(2-оксиэтил)-амида-цис-9-октадеценовой кислоты на скорость дестабилизации эритроцитарных клеток в условиях гипоксии и лактоацидоза**

В условиях гипоксии и лактоацидоза в эритроцитах значительно снижается сродство гемоглобина к кислороду, ускоряется процесс метгемоглобинообразования, снижаются темпы производства АТФ, что приводит к ускорению процессов дестабилизации мембраны и развитию ПОЛ. Оптимизация обменных процессов и регуляция ионной проницаемости клеток может способствовать замедлению развития дезинтеграции мембран и нарушению функциональной активности клеток.

В качестве соединений, обладающих возможным протекторным действием, нами были выбраны триметазидин (предуктал), улучшающий метаболизм глюкозы (William C.S., 1999) и уже применяемый как лекарственный препарат, и N-(2-оксиэтил)-амид-цис-9-октадеценовая кислота (олеоилэтаноламин), регулятор работы кальциевых каналов, исследованный только в эксперименте на кардиомиоцитах морских свинок (Erps D.E., 1983).

Действие триметазидина в разовой терапевтической дозе изучали в условиях лактоацидоза различной степени выраженности 7,5; 10; 20 мМ/л. Как в условиях умеренного (7,5 мМ), так и в условиях сильного ацидоза, триметазидин снижал скорость метгемоглобинообразования, наблюдалось уменьшение активной концентрации НАДН-цитохром-b<sub>5</sub>-редуктазы, основным субстратом которой служат перекиси жирных кислот, снижение доли мембраносвязанного гемоглобина (табл.7).

Подобные изменения мы наблюдали и при действии триметазидина на храненную в течение 3-х суток кровь, где эритроцитарные популяции повреждены не только действием лактоацидоза, но и состоянием энергодифицита.

Проведение исследований состояния эритроцитов у больных ИБС, ССН III функционального класса, получавших кроме традиционной антиангинальной терапии триметазидин (предуктал, 60 мг/сутки) показало, что количество поврежденных клеток у данной группы больных уменьшалось: отмечается снижение процента метгемоглобина, мембраносвязанного гемоглобина, повышается ферментативная активность гемолизатов, уменьшается скорость химического окисления гемоглобина.

Следует также отметить увеличение АОА плазмы у данной группы больных по сравнению с больными, не получавшими предуктал (табл.8). Уменьшение свободно-

радикального окисления в плазме будет способствовать снижению скорости дезинтеграции эритроцитарных клеток и улучшению их функциональной активности.

Таблица 7.

Действие сильного ацидоза на донорскую кровь в присутствии разовой дозы триметазида

Показатели	Контроль	Молочная к-та, 20 мМ/л	Молочная к-та + триметазидин 4мг/л
1. ДОК Нв,%, n=21	47,78±0,15	47,28±0,25	49,11±0,10
2. ОК Нв,%, n=21	49,50±0,25	48,62±0,23*	48,11±0,13*
3. Мет Нв,%, n=44	2,06±0,18	3,99±0,25*	2,78±0,09**
4. МС Нв,%, n=33	5,57±0,78	9,22±0,39*	7,52±0,43**
5. НАДН-ЦХ-b <sub>5</sub> -редуктаза, мМ/мин, n=21	12,90±1,72	21,11±1,73*	20,77±1,44*
6. СХО Нв, мкМ/мин, n=21	0,68±0,04	1,88±0,08*	1,27±0,05**

Примечание \*P<0,01 по отношению к контролю; \*\*P<0,01 по отношению к пробе с молочной кислотой

Таблица 8.

Показатели состояния эритроцитарных популяций и АОА плазмы крови у больных ИБС, ССН III функционального класса, леченных традиционно и с применением предуктала

Показатели	Больные ИБС, традиционная терапия, n=15	Больные ИБС, традиционная терапия +предуктал, n=10
1. ДОК Нв,%	50,44±0,20	50,31±0,13
2. ОК Нв,%	46,91±0,30	47,71±0,10*
3. МС Нв,%	8,30±0,12	6,64±0,49*
4. Мет Нв,%	2,68±0,17	1,95±0,12*
5. НАДН-ЦХ-b <sub>5</sub> -редуктаза, мМ/мин	10,54±0,34	16,18±0,65*
6. СХО Нв, мкМ/мин	4,44±0,20	2,18±0,09*
7. АОА плазмы, у.е.	0,314±0,020	0,425±0,010*
8. Сод мол.к-ты в плазме, мМ/л	2,47±0,32	2,06±0,13

Примечание \*P<0,01 по отношению к больным, получавшим только традиционное лечение

Учитывая важность оптимизации работы ионных каналов клетки в поддержании интегрированной деятельности всех систем, мы изучили действие N-(2-оксиэтил)-амида-цис-9-октадеценной кислоты (олеоилэтаноламина) на эритроцитарные клетки в условиях

лактоацидоза (7,5 мМ) и без него. Как показали данные тонкослойной хроматографии, олеоилэтаноламид (ОЭА) при добавлении его в цельную кровь, обнаруживался в равной степени в мембране и в цитозоле клеток ( через 30 минут инкубации при 37<sup>0</sup>С). Внедрение ОЭА в мембрану сопровождается увеличением деформируемости, повышением осмотической резистентности и снижением мембранной проницаемости для мочевины (табл.9). Эластичность и вязкостные свойства мембран эритроцитов определяются состоянием спектрин-актиновых комплексов и эффективностью их взаимодействия с белком п.3 и анкирином (п.4.1). Нормальные взаимодействия осуществляются при оптимальном соотношении АТФ, 2,3 ДФГ, ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (Bloch R.J., Pumplin D., 1992).

Можно предположить, что ОЭА улучшает белок-белковые взаимодействия за счет оптимизации работы кальциевых каналов, что приводит к стабилизации мембранных структур. Кроме того, наблюдается низкая скорость аутоокисления гемоглобина, не изменяется сродство гемоглобина к кислороду, эритроцитарная популяция отличается высоким фоном активностей ЛДГ, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, каталазы, что может свидетельствовать об улучшении эффективных белок-белковых и белок-липидных взаимодействий и снижению скорости денатурационных процессов. Однако нами было обнаружено снижение активности СОД эритроцитарных экстрактов. Регуляция активности, а также условия нахождения данного фермента в эритроцитах до настоящего времени изучено недостаточно. Если предположить, что в эритроцитах большая часть фермента находится в неактивной форме, а активация происходит в условиях ускорения производства супероксида, то при низкой скорости аутоокисления гемоглобина большая часть фермента останется латентной.

В условиях лактоацидоза (7,5 мМ) ОЭА в изученной концентрации (6 мкг/мл) снижает повреждающее действие избытка молочной кислоты (табл.9). Мы наблюдали снижение скорости метгемоглобинообразования, улучшение показателей состояния мембраны и цитоскелета : осмотической резистентности, мембранной проницаемости, деформируемости.

Таблица 9.

Показатели состояния эритроцитов при инкубации цельной крови доноров при 37<sup>0</sup>С, 20 минут в присутствии олеоилэтанолamina, n=15

Показатели	Контроль, 6 мкл этанола	ОЭА, 6 мкг/мл в этаноле	Молочная к-та, 7,5 мМ	Мол.к-та+ ОЭА
1. Скорость поглощения глюкозы, мкМ/мин	16,07±0,44	17,07±0,29	5,71±0,28*	10,02±0,12**
2. Содержание АТФ, мкМ/л	10,16±0,09	10,15±0,12	-----	-----
3. ДОК Нв,%	51,80±0,05	52,27±0,02*	51,63±0,03	52,17± 0,04**
4. ОК Нв,%	45,57±0,05	46,03±0,05*	45,33±0,04	45,81±0,05
5. Мет Нв,%	2,12±0,08	1,76±0,07*	2,43±0,08	1,97± 0,03**
6. МС Нв,%	13,66±0,16	9,36±0,39*	14,01±0,55	9,91± 0,53**
7. Деформируемость. У.е.	0,76±0,03	1,20±0,06*	0,47±0,03*	0,65± 0,03**

*Примечание* \*P<0,01 по отношению к контролю; \*\*P<0,01 по отношению к пробе с молочной кислотой

Возможно, ОЭА увеличивает подвижность белка п.3, что сопровождается повышением эластичности мембраны. Об улучшении белок-белковых взаимодействий в присутствии ОЭА свидетельствует повышение активных концентраций ферментов: ЛДГ, каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; увеличение скорости поглощения глюкозы эритроцитами.

Таким образом, этаноламидное производное олеиновой кислоты, проникая в фосфолипидный слой мембраны, действует стабилизирующе на белок-белковые и белок-липидные взаимодействия и снижает скорость процессов повреждения клеток в условиях избытка молочной кислоты.

## **6. Механизмы дезинтеграции эритроцитов в условиях окислительного стресса и реоксигенации**

Повреждающее, а также регулирующая роль активных форм кислорода (АФК) в настоящее время привлекает активное внимание многих исследователей. Уровень производства АФК в клетках определяет их метаболическую активность, скорость старения, гибели или пролиферации (Зенков Н.К. и др.,1999; Скулачев В.П., 1999; Гамалей И.А., 2000; Самуилов В.Д., 2000; Лю Б.Н., 2002). АФК производятся как в процессах оксигенации, так и в условиях гипоксии, когда этот процесс вторичен и обусловлен избытком восстановленных эквивалентов при участии  $Fe^{2+}$ . Но наиболее значительным производство АФК становится в условиях перехода от состояния гипоксии к нормооксии и гипероксии – при реоксигенации (Скулачев В.П., 1999).

Эритроциты представляют собой клетку, где производство АФК происходит постоянно и в большом количестве, так как с этим связано выполнение одной из главных функций – отдача кислорода. Это объясняет хорошо отлаженную систему антирадикальной защиты клеток: большое количество каталазы и СОД, наличие глутатионредуктазной и глутатионпероксидазной систем, антиокислительная активность самого гемоглобина (Заводник И.Б. и др.,1992,1996; Ворожцова Е.Е. и др.,1999).

Нами были изучены механизмы повреждения эритроцитов, инкубированных в условиях окислительного стресса, имитирующего гипоксию, при которой возникает избыток  $Fe^{2+}$  (Rise-Erns C., Bay-Sal E., 1987)(модель 1), а также сочетание избытка  $Fe^{2+}$  с желточными липопротеидами (Клебанов Г.И. и др., 1988)(модель 2). Инкубация эритроцитов с инициаторами окисления приводила к ускорению метгемоглобинообразования, снижению сродства гемоглобина к кислороду, о чем свидетельствовали рост процента метгемоглобина, увеличение производства 2,3 ДФГ и уменьшение доли оксигемоглобина. Повышается уровень молочной кислоты в эритроцитах на фоне снижения активных концентраций глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (табл.10). В мембранах ускоряются процессы производства перекисленных продуктов жирных кислот и холестерина, наблюдается снижение АОА и каталазной активности эритроцитарных гемолизатов. Присутствие желточных липопротеидов низкой плотности (модель 2) приводит к возрастанию процента поврежденных клеток в популяции, поскольку выявляется большее содержание метгемоглобина, мембраносвязанного гемоглобина, в большей степени снижается сродство гемоглобина к кислороду.

Содержание первичных продуктов ПОЛ в меньшей степени зависит от добавления желточных липопротеидов. Это может объясняться возможностью обменных процессов



между фосфолипидами мембран и фосфолипидами внешних липопротеидов. Однако, повреждения клеток во 2-й модели развиваются быстрее, о чем свидетельствует значительное увеличение количества гемолизированных клеток под действием изомолярного раствора мочевины, снижение осмотической резистентности эритроцитов.

Таблица 10

Показатели состояния эритроцитов в условиях окислительного стресса (чистые эритроциты), n=22

Показатели	Контроль	Модель 1	Модель 2
1 ОК Нв, %	48,33±0,07	44,46±0,08*	38,43±0,09**
2. Мет Нв, %	1,46±0,14	2,60±0,13*	2,93±0,12**
3. МС Нв, %	5,89±0,35	10,91±0,52*	13,47±0,72**
4. НАДН –ФЦР, мМ/мин	4,62±0,09	9,41±0,12*	11,44±0,21**
5. Молочная к-та, мМ/л	0,41±0,06	1,25±0,20*	1,68±0,25*
6. 2,3 ДФГ, мМ/л	2,42±0,58	4,81±0,22	5,92±0,17**
7. Г6-ФДГ, мкМ/мин	11,01±0,52	9,20±0,43*	7,80±0,36**
8. Диен. конъюгаты (холестерин), у.е.	0,469±0,004	0,532±0,009*	0,523±0,008*
9. Диен. кетоны (холестерин), у.е.	0,188±0,004	0,261±0,005*	0,244±0,006*
10. Диен. конъюгаты (фосфолипиды), у.е.	0,473±0,006	0,568±0,008*	0,601±0,012**
11. Диен. кетоны (фосфолипиды), у.е.	0,231±0,005	0,279±0,006*	0,315±0,008**
12. Мембранная проницаемость, %	47,80±0,25	58,50±0,78*	77,10±0,66**
13. Осмотическая резистентность, %	30,41±0,71	38,30±0,42	62,90±0,56**

Примечание \*P<0,01 по отношению к контрольной пробе; \*\*P<0,01 по отношению к модели 1.

Окисление липидов приводит к резкому нарушению физико-химической структуры мембраны, усилению миграции трансмембранных белков за счет появления гидрофильных включений в гидрофобном слое (Микаелян Э.М. и др., 1984; Андреюк Г.М., Кисель М.А., 1989). Появление в бислое фосфолипидов гидроксильных и полярных продуктов ПОЛ может приводить к образованию водных пор, резко нарушающих стабильность мембраны и увеличивающих вероятность ее разрыва.

Метаболические изменения характеризуются, вероятно, сначала усилением гликолитических процессов, так как удается обнаружить увеличение производства 2,3 ДФГ и молочной кислоты в эритроцитах. Снижение сродства гемоглобина к кислороду на фоне уменьшения производства АТФ усиливает генерацию АФК. Дезинтеграция мембран увеличивает вход  $Ca^{2+}$  и сопровождается нарастанием денатурационных процессов. Снижается активная концентрация ряда ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), ЛДГ, каталазы. В то же время обнаруживается более высокая активность СОД и НАДН-цитохром-b<sub>5</sub>-

редуктазы (НАДН-ФЦР), что может быть обусловлено переходом части латентных форм в активные.

Дальнейшее усиление генерации АФК способствует превращению части гемоглобина, углубленного в мембрану, в кластеры гемихрома. Гемихром обладает высоким сродством к цитоплазматическому домену белка п.3 (Петренко Ю.М., Владимиров Ю.А., 1987), что изменяет белок-белковые и белок-липидные взаимодействия, ускоряет сферизацию и элиминацию клеток.

Наличие протекторного действия N-2(оксиэтил)-амида цис-9-октадеценовой кислоты (ОЭА) в условиях лактоацидоза делает возможным благоприятное влияние данного соединения при окислительном стрессе. Однако, известно, что жирные кислоты и некоторые их производные, являясь субстратами окисления, стимулируют ПОЛ (Андреюк Г.М., Кисель М.А., 1997). Этими же учеными получены данные о том, что этаноламидные производные жирных кислот теряют способность к поддержанию цепного характера реакций ПОЛ и, служа ловушками свободных радикалов, обрывают цепи окисления (Андреюк Г.М., Кисель М.А., 1999). Исходя из противоречивости данных, а также опираясь на сходство механизмов развития ПОЛ в условиях гипоксии и гипероксии, мы изучили влияние ОЭА на процессы дезинтеграции эритроцитов в условиях действия инициаторов окисления.

Для воспроизводства окислительного стресса использовали модель 2 (Клебанов Г.И. др., 1987), которая позволяет имитировать ускорение производства АФК и гидроперекисей липидов в плазме крови человека при таких патологических состояниях как тяжелые формы ИБС, атеросклероз.

Действие ОЭА на фоне окислительного стресса показало его замедляющее влияние на развитие дезинтеграционных процессов в эритроцитах. В пробах, содержащих ОЭА, мы наблюдали меньший процент метгемоглобинообразования, уменьшение фракции мембраносвязанного гемоглобина, улучшение АОА эритроцитов, снижение скорости химического окисления гемоглобина (табл.11). Эритроцитарные популяции характеризуются пониженным фоном активностей НАДН-цитохром-b<sub>5</sub>-редуктазы и СОД, при увеличении активных концентраций каталазы, Г-6-ФДГ, ЛДГ, увеличением скорости поглощения глюкозы (табл.11).

Причиной данного явления с одной стороны могут стать регуляторные свойства ОЭА (Безуглов В.В. и др., 1998). Его внедрение в липидную фазу и эффективное взаимодействие с интегральными белками оптимизирует работу ионных каналов и может способствовать более продолжительному сохранению гомеостаза клетки. С другой стороны, ОЭА может тормозить распространение ПОЛ в мембране, становясь субстратом окисления, не поддерживающим цепной характер процесса.

Об уменьшении интенсивности ПОЛ свидетельствует не только снижение скорости аутоокисления гемоглобина, но и конечного продукта ПОЛ – МДА. Оптимизация ионных каналов (Erps D.E. et al., 1983), отсутствие прооксидантного действия, улучшение белок-липидных взаимодействий приводит к эффективной защите мембраны эритроцитов от инициаторов окисления. В популяции повышается процент осмотически резистентных клеток, снижается степень гемолиза под действием мочевины, растет способность клеток к деформации (табл.11).

Полученные данные позволяют предполагать наличие регуляторных свойств у ОЭА. Возможными точками приложения могут являться в силу липофильности и более низкой окисляемости (по сравнению с другими жирнокислотными производными), оптимизация работы ионных каналов, угнетение липоксигеназного окисления

ненасыщенных жирных кислот, повышение эффективности белок-липидных взаимодействий, снижение интенсивности ПОЛ.

Таблица 11.

Действие олеилэтаноламина в условиях окислительного стресса на показатели состояния эритроцитарных клеток

Показатели	Контроль	ОЭА, 6мкг/мл	ЖЛП+Fe <sup>2+</sup>	ЖЛП+Fe <sup>2+</sup> ОЭА
1. ДОК Нв, %	52,37±0,05	53,15±0,02**	51,90±0,03*	52,77±0,04**
2. ОК Нв, %	45,33±0,04	46,03±0,05**	45,02±0,04*	45,53±0,05**
3. Мет Нв, %	1,75±0,07	1,57±0,06**	2,12±0,08*	1,89±0,06**
4. МС Нв, %	7,33±0,16	5,52±0,13**	9,36±0,14*	6,44±0,17**
5. СХО Нв, км/мин	1,67±0,03	1,34±0,08**	1,98±0,04*	1,73±0,02**
6. НАДН-ФЦР, мкМ/мин г Нв	65,23±0,17	62,58±0,15**	70,32±0,13*	68,97±0,16**
7. АОА, у.е.	59,35±0,13	68,87±0,15**	52,94±0,11*	57,28±0,12**
8. МДА, мкМ/л	5,12±0,07	4,90±0,08**	6,44±0,11*	5,82±0,09**
9. Каталаза, мкат	345,90±2,12	353,85±2,41*	242,11±1,48*	349,91±2,15
10. СОД, у.е.	2,00±0,11	1,80±0,21*	2,40±0,23*	1,64±0,20**
11. ЛДГ, мкМ/мин	115,44±1,11	145,71±1,54*	99,37±0,98*	118,03±1,23**
12. Г-6-ФДГ, мкМ/мин	11,52±0,21	14,21±0,25*	8,04±0,19*	11,48±0,23**
13. Скорость поглощения глюкозы, мкм/мин	16,52±0,15	17,21±0,22	7,32±0,08*	9,40±0,09**
14. Осм.рез., %	22,42±0,07	21,25±0,05*	27,33±0,06*	25,04±0,06**
15. Мембр. Проницаемость, %	18,22±0,06	17,02±0,05	20,14±0,06*	19,51±0,05**

Примечание \*P<0,01 по отношению к контролю; \*\*P<0,01 по отношению к пробе с инициаторами окисления.

В условиях окислительного стресса нами были также изучены спектры коротких пептидов из ТХУ-экстрактов эритроцитов (табл.12). Прежде всего оказалось, что удаление плазменных факторов и инкубация эритроцитов в растворе Рингера-Локка в течение 20 минут приводит к обнаружению всех идентифицированных нами ранее пептидных соединений. Это может быть объяснено тем, что популяция повреждается после удаления стабилизирующих клетки плазменных факторов и процент клеток, генерирующих короткие пептиды возрастает. Добавление инициаторов окисления в инкубационную среду сопровождается либо исчезновением пиков некоторых пептидов,

либо уменьшением площади пика (табл.12). Причем при действии в качестве инициаторов окисления  $Fe^{2+}$ +ЖЛП, площадь пика является самой низкой.

По нашему мнению, это обусловлено увеличением скорости выхода пептидов из клеток в окружающую среду за счет увеличения дефектов мембран в условиях развития перекисного повреждения фосфолипидного слоя.

Таблица 12.

Времена удерживания ( $t_R$ ) и площади хроматографических пиков пептидов, идентифицированных при изучении экстрактов эритроцитов, инкубированных с инициаторами окисления

Пептид	Модель окисл. стресса	$t_R$ , мин	Площадь пика (В)
Thr-Ser-Leu-Tyr-Arg	Контроль	2,23	21272
	Модель 1	-----	-----
	Модель 2	2,25	38985
Val-His-Leu-Thr-Arg-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala-Val	Контроль	2,52	4700809
	Модель 1	2,52	4526189
	Модель 2	2,52	4028904
Val-His-Leu-Thr-Pro-Gly-Glu-Lys-Ser-Ala-Val	Контроль	3,8	5132
	Модель 1	-----	-----
	Модель 2	-----	-----
Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-His-Arg-Arg-Tyr-His	Контроль	4,78	372763
	Модель 1	4,77	321127
	Модель 2	4,76	180496
Ala-Leu-Thr-Gly-Lys-Val-Asn-Val	Контроль	12,54	1102837
	Модель 1	12,53	663235
	Модель 2	12,54	381432

Особенно опасным избыток  $Fe^{2+}$  и восстановленных эквивалентов, накопившихся в условиях гипоксии, становится при реоксигенации (Скулачев В.П.. 1999). Для изучения влияния условий реоксигенации на процессы дезинтеграции эритроцитов мы исследовали кровь больных ИБС, ССН III функционального класса после проведения операции аортокоронарного шунтирования. После операции АКШ на фоне традиционной антиангинальной терапии в первые сутки у больных наблюдается небольшое изменение популяции клеток соотношение ОК/ДОК Нв приближается к таковому у доноров, но процент метгемоглобина продолжает расти. Ускорение аутоокисления гемоглобина может быть прямым следствием реоксигенации. О стимуляции ПОЛ в мембранах клеток свидетельствует рост НАДН-цитохром-b<sub>5</sub>-редуктазной активности гемолизатов (табл.13).. Продолжающееся ухудшение популяции клеток в первые сутки после операции обусловлено и отсутствием улучшения плазменных показателей. В плазме крови остается высоким содержание молочной кислоты и низкой АОА (табл.13).

В последующие дни после операции популяция постепенно улучшается, однако скорость аутоокисления гемоглобина остается высокой и до 7-х суток достоверно превышает дооперационный уровень, а АОА плазмы даже на 14-й день остается низкой (как и до операции). Все это свидетельствует о значительном повреждающем эффекте реоксигенации и необходимости введения в терапию препарата, который способствовал

Таблица 13.

Показатели состояния эритроцитарных популяций у больных ИБС, ССН III функционального класса после АКШ (традиционное лечение)

Показатели	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
1. ДОК Нв, %	49,49±0,08*	49,18±0,18*	49,61±0,12*
2. ОК Нв, %	47,02±0,25	47,31±0,25	47,74±0,18*
3. МС Нв, %	7,39±0,60	8,68±0,75	7,19±0,82
4. Мет Нв, %	3,38±0,28*	3,50±0,40*	3,02±0,31
5. НАДН-ФЦР, мМ/мин	15,65±0,80*	14,15±0,57*	13,20±0,77*
6. СХО Нв, мкМ/мин	3,27±0,16**	3,07±0,17*	2,08±0,11*
7. АОА плазмы, у.е.	0,289±0,020	0,239±0,027*	0,309±0,020
8. Сод. мол.к-ты в плазме, мМ/л	3,08±0,19*	2,81±0,17	2,76±0,91

Примечание \*P<0,01 по отношению к пробам до операции (табл.8)

защите клеток от АФК. Одним из достаточно новых препаратов, применяемых в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, является предуктал (1-[2,3,4-триметоксибензил]-пиперазиндигидрохлорид) (триметазидин). Предуктал, ингибируя бета-окисление жирных кислот и усиливая обмен фосфолипидов в мембранах, стимулирует процесс гликолиза, улучшает транспорт глюкозы, уменьшает внутриклеточный ацидоз и способствует поддержанию нормального гомеостаза внутри клетки (William C.S., 1990).

Если благоприятное воздействие триметазидина на кардиомиоциты показано, то влияние его на скорость дезинтеграции эритроцитарных клеток до настоящего времени не исследовалось.

Нами был проведен анализ состояния эритроцитарных популяций у больных ИБС, ССН III функционального класса, леченных с применением предуктала. После операции АКШ в этой группе больных наблюдалась меньшая активация процессов аутоокисления гемоглобина в первые сутки после операции, популяция содержала меньший процент поврежденных клеток (табл.14).

Таблица 14.

Показатели состояния эритроцитарных популяций у больных ИБС, ССН III функционального класса после АКШ (традиционное лечение + предуктал)

Показатели	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
1. ДОК Нв, %	49,24±0,14	48,28±0,15	49,26±0,18
2. ОК Нв, %	47,96±0,08*	48,48±0,10*	48,54±0,10*
3. МС Нв, %	7,22±0,56	7,16±0,08	7,01±0,23
4. Мет Нв, %	2,13±0,02*	3,30±0,07#	2,20±0,13
5. НАДН-ФЦР, мМ/мин	15,05±0,91	13,14±0,63	12,33±0,56#
6. СХО Нв, мкМ/мин	1,58±0,10*	1,51±0,12*	1,34±0,09#*
7. АОА плазмы, у.е.	0,412±0,032*	0,337±0,024*#	0,337±0,022*#
8. Сод. мол.к-ты в плазме, мМ/л	2,41±0,11	2,67±0,15	2,25±0,57

*Примечание* \* $P < 0,01$  по отношению к больным, не получавшим предуктал; # $P < 0,01$  по отношению к дооперационному уровню

В последующие дни после операции показатели состояния эритроцитарных популяций также свидетельствовали о снижении скорости повреждения клеток. Возможно, основной причиной улучшения популяции клеток является более высокая АОА плазмы крови. Таким образом, применение триметазидина в условиях лактоацидоза и гипоксии с последующей реоксигенацией снижает скорость протекания дезинтеграционных процессов в эритроцитах.

Полученные данные, их анализ и сопоставление с данными литературы, позволяют высказать несколько обобщенных положений о механизмах дезинтеграции эритроцитов после выхода их в кровяное русло, а также о зависимости этих процессов от условий функционирования клеток. Эффективное функционирование эритроцита зависит от возможности поддержания стабильных белок-белковых и белок-липидных взаимодействий. Это, в свою очередь, определяется многими факторами: с белковыми и липидными компонентами плазмы, стабильностью параметров гомеостаза, нативностью рецепторного аппарата и метаболическим систем клетки. Различные физиологические и патологические состояния сопровождаются временными или постоянными нарушениями гомеостаза: гипоксией, ацидозом, действием лекарственных препаратов, гипо- или гипергликемией, развитием окислительных процессов, нарушением соотношения регуляторов. Изменение условий функционирования эритроцитов, как показали наши исследования, оказывает существенное влияние на скорость реализации программы апоптозной гибели эритроцитов. Лактоацидоз дозозависимо сопровождается уменьшением сродства гемоглобина к кислороду и ускорением процессов метгемоглобинообразования, что способствует нарастанию энергодефицита клетки и более быстрой дестабилизации мембраны и метаболических систем эритроцита. Если условия лактоацидоза становятся хроническими, то это постепенно приводит к возрастанию процента поврежденных клеток в составе циркулирующей *in vivo* популяции, что выявляется у больных ИБС, а также при постгеморрагической анемии. Нарастание процента поврежденных эритроцитов в циркулирующей популяции будет сопровождаться ухудшением кислородтранспортной и адаптивной функций клеток и приведет к усугублению гипоксии. Более быстрая гибель клеток и активация эритропоэза может исчерпать компенсаторные возможности организма и будет наблюдаться обострение заболевания. Повреждения популяции клеток еще быстрее развиваются при сочетании лактоацидоза с гипогликемией, так как это усугубляет энергодефицит и способствует ускорению дезинтеграции мембран. Вместе с тем, избыток глюкозы также дозозависимо ускоряет процессы дезинтеграции эритроцитов за счет неспецифического гликирования белков и, прежде всего, гемоглобина. Лактоацидоз увеличивает процент поврежденных в условиях гипергликемии клеток.

Для лечения тяжелых форм ИБС традиционно используются нитропрепараты. Нами получены данные, что нитропрепараты, стимулируя метгемоглобинообразование ускоряют процессы дезинтеграции, лактоацидоз усугубляет повреждения клеток и степень дезинтегрированности эритроцитов. Нитрозотиолы в условиях избытка молочной кислоты утрачивают протекторное действие и способствуют ускорению дестабилизации эритроцитов. Антагонисты кальция и бета-блокаторы в условиях лактоацидоза оказывают положительное воздействие, уменьшая повреждающее действие избытка протонов. К неблагоприятным последствиям влияния этих препаратов на эритроциты можно отнести стимуляцию снижения сродства гемоглобина к кислороду, что может способствовать как, в конечном счете, развитию энергодефицита, так и значительным

потерям кислорода по пути к капиллярам. Бета-блокаторы (обзидан) в условиях гипердреналинемии и лактоацидоза снижает повреждающее действие избытка молочной кислоты и адреналина, в популяции уменьшается количество клеток с высокой скоростью аутоокисления гемоглобина и процессов дезинтеграции мембраны. Кроме того, при гипердреналинемии обзидан эффективно защищает бета-адренорецепторы от быстрой десенситизации в присутствии лиганда, что способствует сохранению адаптивной функции эритроцитов – ликвидации избытка адреналина.

В условиях гипоксии и реоксигенации возрастает скорость производства АФК и создается возможность развития свободно-радикальных процессов окисления при исчерпании резервов антиокислительной защиты клеток. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что инициаторы окисления, имитирующие состояние липопротеидных мицелл при атеросклерозе и ИБС, значительно ускоряют процессы повреждения эритроцитов за счет активации ПОЛ и дезинтеграции мембранных структур клетки. Присутствие инициаторов окисления в среде инкубации приводит к энергодефициту и значительной активации ПОЛ в мембране в целом по тому же механизму, как и гипоксия и лактоацидоз. В этих условиях эффективное воздействие на клетку могут оказать антиоксиданты и мембранотропные соединения. Нами получены данные о протекторном воздействии унитиола, уменьшающего окислительные повреждения белков в эритроцитах. Мембранотропное и регулирующее влияние на эритроциты в условиях лактоацидоза и окислительного стресса оказывал амид-9-цис-октадеценовой кислоты (олеоилэтаноламин) при использовании его в дозе, соответствующей эффективной концентрации арахидоновой кислоты. Протекторное действие, снижающее скорость повреждения клеток даже в условиях сильного ацидоза, оказывал триметазидин (предуктал), применение которого *in vivo*, для лечения больных ИБС до и после АКШ позволило снизить процент дезинтегрированных клеток в популяции циркулирующих эритроцитов после операции.

Наши исследования позволяют заключить, что реализация программы апоптозной гибели эритроцита самым тесным образом может быть связана с процессами деградации гемоглобина и секрецией биологически активных пептидов эритроцитами. Изменение спектров пептидов в зависимости от степени дезинтегрированности мембран открывает новые возможности для реализации адаптивной функции эритроцитов. Оценка эритроцитарной популяции по степени дезинтеграции и скорости протекания дезинтеграционных процессов в этом случае будет служить отправной точкой для определения возможностей включения компенсаторных механизмов, ликвидирующих патологические изменения гомеостаза.

## **ВЫВОДЫ**

1. Избыток молочной кислоты в инкубационной среде при воздействии на фракцию чистых эритроцитов *in vitro* дозозависимо ускоряет дезинтеграционные процессы из-за развития энергодефицита. Пусковым механизмом служит стойкое снижение сродства гемоглобина к кислороду, уменьшение производства АТФ, что приводит к нарастанию денатурационных изменений, уменьшению фоновой активности ферментов метаболических и метгемоглобинредуктазных систем, при увеличении активности ферментов деградации мембран. Дезинтеграция мембран включает механизм гибели клеток.

2. Действие лактоацидоза на цельную кровь характеризуется ускорением дезинтеграционных процессов по тому же механизму. Процесс взаимосвязанных биохимических реакций замедляется стабилизирующим влиянием факторов плазмы,

способствующим обновлению липидных компонентов. Лактоацидоз значительно ускоряет процессы дезинтеграции в условиях гипогликемии.

3. Гипергликемия (10, 15, 20 мМ/л) ускоряет процессы дезинтеграции эритроцитов по механизму отличному от гипогликемии и лактоацидоза. Основным повреждающим фактором становится гликирование гемоглобина и других функциональных белков и развитие неспецифических агрегационных процессов. Лактоацидоз на фоне гипергликемии усиливает повреждающее действие гликирования за счет снижения сродства к кислороду и ускорения аутоокисления гемоглобина.

4. Нитританионы оказывают сильное повреждающее воздействие на эритроциты. Основной механизм действия реализуется через образование нитрозилпроизводных гемоглобина, активации процессов аутоокисления гемоглобина, стимуляции ПОЛ и нарастанию дезинтеграционных изменений в мембране. Действие L-агринина стимулирует производство эндогенного NO и действует по механизму аналогичному экзогенной окиси азота. В условиях лактоацидоза повреждающее воздействие эндогенного и экзогенного NO усиливается и скорость процессов дезинтеграции эритроцитов возрастает.

5. Ингибирование кальциевых каналов на вход с помощью антагонистов кальция, а также действие бета-блокаторов на адренорецепторы эритроцитов благоприятно влияет в условиях лактоацидоза, снижая скорость дезинтеграционных процессов в мембране и аутоокисления гемоглобина. Однако это сопровождается снижением сродства гемоглобина к кислороду, что может способствовать потере части кислорода по пути к капиллярам.

6. Гиперадреналинемия ускоряет процессы дезинтеграции эритроцитов. Механизм ускорения связан с частичной интернализацией гормонрецепторных комплексов и активацией фосфолипаз, развитием ПОЛ и аутоокисления гемоглобина, увеличением неспецифических белок-белковых и белок-липидных взаимодействий. Бета-блокатор (обзидан) в терапевтической дозе эффективно защищает бета-рецепторы от быстрой десенситизации и снижает скорость повреждений эритроцитов в условиях избытка адреналина.

7. Условия временной гипоксии и лактоацидоза, развивающиеся в ходе физической нагрузки способствуют ускорению процессов дезинтеграции и смене популяции клеток за счет перераспределительного эритроцитоза и активации эритропоэза. У больных ИБС, ССН II-III функциональных классов определение степени повреждения и скорости процессов дезинтеграции в ходе физических нагрузок позволяет оценить уровень компенсации патологических нарушений кислородтранспортной и адаптивной функций эритроцитов. Наиболее неблагоприятными изменениями, отражающими уровень повреждения популяции клеток могут служить скорость метгемоглобинообразования, снижение активности ферментов.

8. Условия хронической гипоксии и лактоацидоза, развивающиеся у больных ИБС с тяжелой формой стенокардии и постоянным приемом нитропрепаратов, а также анемия способствует быстрому повреждению популяции эритроцитов и увеличению процента клеток, характеризующихся ускорением метгемоглобинообразования, высокой степенью дезинтеграции мембран, что может привести к срыву компенсаторных механизмов и ухудшению кислородтранспортной и адаптивной функции эритроцитов.

9. Доноры сульфгидрильных групп, регулятор кальциевых каналов (олеоилэтаноламин), триметазидин оказывают стабилизирующее действие на мембранные белки и уменьшают скорость дезинтеграции эритроцитов в условиях лактоацидоза



окислительного стресса. Нитрозотиолы не оказывают протекторного воздействия и не снижают повреждений, обусловленных избытком молочной кислоты и нитританионами.

10. Введение в курс лечения больных ИБС, ССН III функционального класса триметазида до и после аортокоронарного шунтирования способствует защите эритроцитов от повреждающего действия реоксигенации и снижает скорость дезинтеграции клеток в первые сутки после проведения операции.

11. Условия лактоацидоза, энергодефицита и окислительного стресса сопровождается изменением спектра коротких пептидов, обнаруживаемых внутри эритроцитов, что предполагает вариабельность эндокринной активности клеток в зависимости от условий функционирования и степени дезинтеграции мембраны.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для оценки кислородтранспортной и адаптивной функциональной активности популяции эритроцитов наиболее важным является определение процента поврежденных клеток с высокой скоростью дезинтеграционных процессов. При этом необходимо ориентироваться прежде всего на значения интегральных показателей: уровень метгемоглобинообразования, деформируемость клеток, мембранную проницаемость для мочевины,

механическая и осмотическая резистентность, электродиффузионный потенциал пробоя мембраны, скорость химического окисления гемоглобина. Следует также использовать два или три показателя одновременно, так как изменение одного показателя не может быть интерпретировано однозначно.

2. Использование для характеристики эритроцитарных популяций при различных патологических и физиологических состояниях определения активных концентраций ферментов является менее целесообразным, особенно если это активность одного или двух ферментов. Более неблагоприятным признаком следует считать снижение активных концентраций ферментов основным метаболических систем и антиоксидантной защиты клетки, чем повышенный фон ферментативной активности.

3. У больных постгеморрагической анемией для оценки степени нарушения кислородтранспортной функции эритроцитов рекомендуется определение доли неактивного гемоглобина, как отношения мембраносвязанной фракции гемоглобина к общему содержанию геоглобина.

4. Для больных ИБС, стабильной стенокардией напряжения II-III функциональных классов важным является оценка степени лактоацидоза. При высоком уровне содержания молочной кислоты в плазме крови возрастает повреждающее действие на эритроциты нитропрепаратов, неэффективным может оказаться применение тиоловых препаратов в качестве антиоксидантов и мембранных стабилизаторов.

5. Применение триметазида перед и после проведения операции АКШ больным ИБС, ССН III функционального класса вместе с традиционным лечением позволяет уменьшить повреждения эритроцитов, возникающие в условиях реоксигенации.

6. Эффективными протекторами, снижающими скорость процессов дезинтеграции эритроцитов в условиях гипоксии, лактоацидоза и окислительного стресса могут стать регуляторы проницаемости ионных каналов (антагонисты кальция, олеилэтаноламин) и соединения, защищающие рецепторный аппарат клеток (бета-блокаторы).

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Глутатионредуктазная система и ацетилхолинэстеразная активность эритроцитов при ишемической болезни сердца //Казанский медицинский журнал.1984. Т.45. С.44-46. (Соавторы: В.Н. Фатенков, А.С. Стегунин).
2. Способ диагностики стабильной стенокардии напряжения. Авторское свидетельство на изобретение №1399688 от 1 февраля 1988 г. (Соавторы: В.Н. Фатенков, Р.А. Тимирбулатов, Е.И. Селезнев, О.А. Кленов).
3. Нарушение коагуляционного гомеостаза, реологических свойств и антиокислительных систем эритроцитов у больных, перенесших инфаркт миокарда // Деп. в ВНИИМИ. Д-13333. 1987 г. 8с. (Соавторы: Е.Г. Зарубина, Е.И. Селезнев).
4. Механизм воздействия унитиола на мембраны эритроцитов больных, перенесших инфаркт миокарда / Совершенствование диагностики и оптимизация лечения в кардиологии. Куйбышев, КГМИ, 1989 г. С. 78-84. (Соавтор: Васильева И.Ф.).
5. Перекисное окисление липидов, система антирадикальной защиты эритроцитов в ходе велоэргометрических нагрузок у больных ИБС, нейроциркуляторной дистонией и практически здоровых мужчин // Деп. в ВНИИМИ. Д-24442. 1995. 13с. (Соавторы: В.Н. Фатенков, Е.И. Селезнев, И.Л. Давыдкин, О.В. Капишникова).
6. Изменение метаболических процессов в эритроцитах практически здоровых мужчин в ходе физических нагрузок // Деп. в ВИНТИ. 1997. №2090 В-97. 10с.
7. Особенности метаболизма эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца / Новые технологии в кардиологии. Самара, из-во СамГМУ, 1997. С.49-50.
8. Особенности транспорта кислорода, энергетического обмена и гормонального статуса в условиях физических нагрузок в норме и при сердечно-сосудистых заболеваниях //Российский кардиологический журнал (1998)(4) 46-58.(Соавтор: Фатенков В.Н.).
- 9.Скорость редукции и окисления гемоглобина у оперированных больных с язвенной болезнью желудка //Самарский медицинский архив (1998)(6) 2-5.(Соавторы: Володин О.П.; Зоткин И.В.).
10. Применение лактатной модели физической нагрузки для изучения повреждающего действия лактата на метаболизм эритроцитов / Моделирование и прогнозирование заболеваний, процессов и объектов. Мат.конф.ЦНИЛ СамГМУ, Самара, 1998. С.34-37.
11. Применение лактатной модели гипоксического состояния для изучения влияния лекарственных препаратов на функциональное состояние эритроцитов/ Моделирование в медицинских и биологических исследованиях. СамГУ, Самара, 1999. С.87-90.
- 12.Функциональная активность эритроцитов человека в условиях лактоацидоза и эндо и экзогенной активации гуанилатциклазной системы / Новые технологии в кардиологии. Мат.Всероссийской конф., Самара, 2000. С.49-54.
13. Состояние гемоглобина у больных ишемической болезнью сердца после аортокоронарного шунтирования //Деп. в ВИНТИ. 1999. №249-В00. 03.02.00 г. 5с. (Соавторы: Давыдкин И.Л., Селезнев Е.И., Мочалина О.И., Маркова Ю.О.).
14. Воздействие лекарственных препаратов, применяемых для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, на эритроциты в условиях лактоацидоза / Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины. Мат.региональной науч.-практ.конф. Пенза, 2000. С.326-327.

15. Действие  $\beta$ -блокаторов на функциональное состояние эритроцитов в условиях лактоацидоза / Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины. Мат.региональной науч.-практ.конф. Пенза, 2000, С.327-328.

16. Синтез и мембранотропная активность N-адамантаил и N-адамантиламинокислот //Химико-фармацевтический журнал (1999)(3) 19-20. (Соавторы: Пурыгин П.П., Данилин А.А., Макарова Н.В., Моисеев И.К.).

17. Функциональная активность эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца после аортокоронарного шунтирования / Кардиология на пороге XXI века. Мат.IV Межрегионального форума. Нижний Новгород, 2000. С.52-53. (Соавтор: Фатенков В.Н.).

18. Механизмы дезинтеграции эритроцитов у больных ИБС /В сб. «100 лет научной жизни кафедры, важнейшие достижения и верность традициям», Санкт-Петербургский гос.медуниверситет, Санкт-Петербург, 2000, С.286-288. (Соавтор: Фатенков В.Н.).

19. Оценка функциональной активности эритроцитов при сердечно-сосудистых заболеваниях //Вестник СамГУ, Ест.науч.серия (2001)(22)(2) 191-197.

20. Механизмы дезинтеграции эритроцитов как основа сохранения гомеостаза /В сб. «Философские, технические и социальные аспекты преподавания, научной и производственной деятельности. МГУС, Самара, 2002. Вып.7. С.51-57.

21. Механизмы дезинтеграции эритроцитов в различных условиях функционирования /Биоразнообразие и биоресурсы Среднего Поволжья и сопредельных территорий. Мат.Всероссийской науч.-практ. конф. Казань, 2002. С.227.

22. Механизмы дестабилизации эритроцитарных клеток в условиях лактоацидоза и действия нитрозотиолов // Вестник СамГУ, Ест.науч.серия (2002)(24)(2) С.158-162.

23. Механизмы дезинтеграции эритроцитов человека при воздействии нитропрепаратов в условиях лактоацидоза и хронической гипоксии /В сб. «Медико-биологические и психолого-педагогические аспекты адаптации человека. Мат.Всероссийской науч.-практ.конф. Волгоград, 2002. С.60-61.

24. Мембраностабилизирующие свойства N-(2-оксиэтил) амида-цис-9-октадеценовой кислоты //Химико-фармацевтический журнал (2002)(8) 25-26. (Соавтор: Белоусова З.П.).

25. Состояние мембран и метаболизма эритроцитов / В.Н.Фатенков, О.В.Фатенков «Ишемическая болезнь сердца». Из-во: Самарский государственный медуниверситет, Самара, 2002. С.60-73.

26. Взаимодействие бета-блокаторов (обзидан) с бета-адренорецепторами эритроцитов человека в условиях гиперadreналиемии и лактоацидоза /В сб. «Актуальные проблемы медицины и биологии», Сибирский медуниверситет. Томск, 2003. С.282-283. (Соавтор:Власов Д.Н.).

27. Concerning human erythrocytes disintegration mechanisms // Ecology and life (Science, Education, Culture/ Internacional Journal, Issue 7. P.345.

Автор выражает искреннюю признательность врачам клиники пропедевтической терапии СамГМУ, кардиодиспансера г. Самары и областной станции переливания крови за оказанное содействие в выполнении работы. Огромная благодарность также сотрудникам химического факультета СамГУ: к.х.н. З.П. Белоусовой, к.х.н.А.А.Данилину за синтез биологически активных соединений, использованных в работе; к.х.н. Ю.Л.Поляковой за проведение хроматографических исследований.

КЛЕНОВА НАТАЛЬЯ АНАТОЛЬЕВНА

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В  
РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Подписано в печать \_\_\_\_\_ 2003г. Формат 60×85/16  
Бумага офсетная. Объем 2,0 усл.печ.л.  
Заказ № \_\_\_\_\_ Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии