

УДК 612.111:612.393

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

Кафедра біохімії (зав. – д. біолог. н. Н.О. Сибірна) Львівського національного університету імені Івана Франка

ВПЛИВ L-АРГІНІНУ ТА L-NAME НА МОРФОЛОГІЮ ЕРИТРОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Резюме. Проаналізовано зміни кількісного складу еритроцитів периферійної крові щурів та поверхневого рельєфу їхніх мембран при введенні L-аргініну або L-NAME за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації. Виявлено позитивний вплив L-аргініну на морфологічний стан червоних клітин крові за алкогольної інтоксикації. Введення L-NAME не впливало на морфологію еритроцитів за умов цієї патології.

Ключові слова: еритроцити, експериментальна хронічна алкогольна інтоксикація, скануюча електронна мікроскопія.

В умовах сьогодення алкогольна залежність набирає загрозливих обертів і стає “пандемією” в усіх країнах світу. Проблемні питання негативного впливу етанолу на нервову систему, печінку, серцево-судинну систему, легені та інші внутрішні органи добре висвітлені в численних публікаціях вітчизняної та зарубіжної літератури [1, 2], однак механізм впливу алкоголю на форменні елементи крові вивчений недостатньо.

Еритроцити є важливою ланкою у забезпеченні вазодилатації, вони відіграють значну роль в мікроциркуляторній системі, а саме в транспортуванні та депонуванні O_2 , CO_2 , у синтезі оксиду азоту (NO).

Спільність будови плазматичних мембран різноманітних клітин дозволяє вважати, що процеси, які проходять в еритроцитарній мембрані за умов патології відображають зміни в мембранах інших органів та тканин. Тому еритроцити є зручною моделлю у дослідженнях структури і функції біологічних мембран за умов впливу метаболітів різного генезу [3-5].

Зловживання алкоголем супроводжується посиленням утворенням вільних радикалів у процесі біотрансформації етанолу за участі мікросомальної етанолокиснювальної системи, альдегідоксидази та ксантинооксидази тканин [6, 7].

За фізіологічних умов оксид азоту має широке коло біологічних властивостей і задіяний у регуляції кровоплину, нейротрансмісії, механізмах антимікробного захисту й імунomodуляції, посттрансляційній модифікації біомолекул. Од-

нак за умов патології молекула NO може виконувати роль “пастки” для супероксид-аніон радикалу (O_2^-) з утворенням пероксинітриту ($ONOO^-$) – надзвичайно цитотоксичної і реакційноздатної сполуки, яка швидко руйнується у кислому середовищі з утворенням нітрат-аніона. Надлишок $ONOO^-$ за умов патології сприяє зсуву антиоксидантної/прооксидантної рівноваги в бік останньої. Як надлишок, так і нестача NO відіграють значну роль у патогенезі багатьох захворювань [8].

Етанол та його метаболіти здатні зв'язуватись із зовнішньою поверхнею мембран клітин, змінюючи процеси реалізації інформації, яка передається в середину клітини різними месенджерами, зокрема NO. Оксид азоту, який утворюється у нормі в еритроцитах функціонально активною ендотеліальною ізоформою NO-синтази (NOS), бере участь у процесах їхньої деформації, у формуванні здатності до адгезії та агрегації [8] поглиблює гіпоксичний стан організму за умов алкогольної інтоксикації.

Мета дослідження: з'ясувати кількісні і морфологічні змін еритроцитів, особливості поверхневого рельєфу еритроцитарних мембран за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації (EXAI) та при введенні субстрату NOS – L-аргініну або неспецифічного інгібітора NOS – *N ω -nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME).

Матеріал і методи. Дослідження проводили на безпородних білих щурах з початковою масою 200,0-250,0 г, попередньо відібраних за допомо-

© Єфіменко Н.В., Дудок К.П., Климишин Н.І., Сибірна Н.О., 2015

гою “двопляшкового методу”, для виявлення їхньої схильності до етанолу. Всі тварини отримували стандартний раціон віварію та вільний доступ до води (1993).

Модель EXAI у щурів створювали щоденним введенням 20% розчину етанолу з розрахунку 6,0 г на 1 кг маси тіла *per os* упродовж 14 днів. У експериментах *in vivo* з моменту індукції алкогольної інтоксикації окремо виділили ще чотири групи тварин: контрольні і алкоголізовані щури, які споживали щоденно з питною водою L-аргінін – (“Reanal”, Угорщина) у концентрації 1,25 г/л (в дозі 250 мг/кг) або L-NAME (“Sigma”, США) у концентрації 70 мг/л (в дозі 14 мг/кг) упродовж 14 днів. Контрольним щурам вводили еквівалентний за калорійністю розчин глюкози у дозі 10,2 г/кг маси тварин, для збереження енергетичної цінності раціону.

Для визначення концентрації етанолу використовували аналітичний набір для ферментативного визначення етанолу в сироватці крові “Алкотест” (Україна). Кількість еритроцитів визначали в 1 мкл крові уніфікованим методом підрахунку в камері Горяєва [9].

Для отримання кількісної характеристики морфологічних форм еритроцитів, клітини тричі відмивали охолодженням фізіологічним розчином та фіксували спочатку 2,5% розчином глутаральдегіду, потім в 1% розчині OsO₄ у 0,15M натрієво-какодилатному буфері (рН 7,2) упродовж 2 год при 4-6°C. Після подвійної промивки фосфатним буфером рН 7,2 еритроцити зневоднювали у зростаючих концентраціях етилового спирту (50% та 70% відповідно). Зразки наносили на алюмінієву пластинку, висушували, проводили наплення ультратонким шаром срібла. Готові препарати вивчали в скануючому електронному мікроскопі (JEOL JSM-T 220 A Scanning microscope). У кожному препараті підраховували 500 клітин [5, 6]. Результати обробляли методами варіаційної статистики з визначенням вірогідності змін за *t*-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця при $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. У периферійній крові контрольних тварин рівень ендогенного етанолу становив 1,89±0,15г/л. При введенні тваринам упродовж 14 днів етанолу рівень його в крові вірогідно зростав відносно контролю в 1,73 раза.

Одночасно, з введенням етанолу, споживання L-NAME контрольними та алкоголізованими тваринами не супроводжувалося вірогідними змінами ендогенної концентрації етанолу відносно груп без введення. Однак, введення L-

аргініну мало двобічну дію, так у контролі вміст етанолу становив 2,24±0,15г/л, тоді як при EXAI – вміст етанолу знижувався від 3,27±0,12г/л у групі без введення до 2,74±0,26г/л.

Ведення L-аргініну тваринам з EXAI обумовлює вірогідне зниження рівня етанолу в крові та сприяє відновленню толерантності клітин до етанолу. Впродовж досліджень концентрація алкоголю в крові була завищена, тому клітини крові підлягали постійній токсичній і руйнівній дії етанолу та інтермедіатам його окиснення. Відомо, що тривале отруєння організму етанолом та його метаболітами сприяє розвитку анемічних станів, основним виявом яких є зниження кількості еритроцитів.

При тривалому введенні етанолу в організм щурів, ми спостерігали значне зниження кількості еритроцитів (від 7,11±0,41*10¹²клітин/л крові у контролі до 5,38±0,43*10¹² клітин/л у щурів за умов EXAI).

Введення L-NAME, призводило до незначного зменшення кількості еритроцитів як в контролі (до 6,28±0,44*10¹²клітин/л), так і за умов алкогольної інтоксикації (до 5,04±0,41*10¹² клітин/л). Показано, що при введенні L-аргініну контрольним тваринам кількість циркулюючих еритроцитів збільшується відносно контролю без введення в 1,2 раза. У разі введення L-аргініну за умов EXAI кількість еритроцитів вірогідно не знижується і зберігається в межах контрольних значень (6,7±0,14*10¹² клітин/л) (таблиця).

Стабільний фізіологічний рівень кількості еритроцитів в організмі забезпечується системою еритроноу. Нашими попередніми дослідженнями показано, що за умов EXAI відбувається перерозподіл різновікових популяцій еритроцитів в руслі периферійної крові, що відображає цитотоксичний вплив як етанолу, так і його метаболітів. У контролі 85,1±1,95% еритроцитарного пулу крові щурів в основному представлений двовігнутими дискоцитами. Клітинна поверхня дискоцита у скануючому мікроскопі виглядає згладженою, без особливих рельєфних утворень. Трансформовані форми еритроцитів виявляються рідко (14,83% від усієї кількості клітин). Важкодиференційовані дегенеративні форми еритроцитів становили всього 2,13±0,81%.

У контрольних щурів, за умов введення субстрату NOS – L-аргініну або L-NAME, не виявлено значних змін у картині поверхневого рельєфу еритроцитів (див. табл.; рисунок, Б, В). Це свідчить про те, що підібрана концентрація L-аргініну та L-NAME не виявляє ознак токсичності на рівні характеристики морфологічного стану

Морфологічна характеристика популяції еритроцитів у контролі, за умов EXAI та на тлі введення тваринам L-аргініну або L-NAME (дані скануючої електронної мікроскопії, $M \pm m$, $n=6-8$, %)

Групи	Загальна кількість еритроцитів * 10^{12} клітин/л	Дискоцити, %	Стоматоцити %	Ехіноцити, %	Дегенеративні форми, %
Контроль	7,11 \pm 0,41	85,1 \pm 1,95	8,8 \pm 2,95	3,9 \pm 2,01	2,13 \pm 0,81
К + L-аргінін	8,51 \pm 0,35*	85,5 \pm 2,19	8,3 \pm 1,09	4,77 \pm 0,64	1,37 \pm 0,83
К + L-NAME	6,28 \pm 0,44	83,2 \pm 2,44	9,57 \pm 0,54	4,7 \pm 0,85	2,5 \pm 0,84
EXAI	5,38 \pm 0,43*	62,4 \pm 1,51*	16,1 \pm 0,72*	13,8 \pm 0,7*	7,62 \pm 0,45*
EXAI + L-аргінін	6,7 \pm 0,24**	77,3 \pm 2,65**	10 \pm 0,85**	9,6 \pm 0,86**	3 \pm 1,24**
EXAI + L-NAME	5,04 \pm 0,41	60,6 \pm 2,68	17,5 \pm 1,12	14,8 \pm 0,99	7,2 \pm 1,97

Примітка. * – різниця вірогідна, порівняно з показниками в контролі, $P < 0,05$;

** – різниця вірогідна, порівняно з показниками в досліді, $P < 0,05$

еритроцитів і може бути використана у подальшому.

Аналіз поверхневого рельєфу еритроцитів щурів при EXAI (рисунок, Г) показав збільшення різноманітності форм еритроцитів. При зменшенні чисельності популяції функціонально повноцінних двовігнутих дисків (до 62,4 \pm 1,51%) спостерігалось збільшення кількості трансформо-

ваних клітин, що знаходяться на різних стадіях дегенерації. Введення L-NAME тваринам з EXAI не покращувало загальної картини морфологічного стану популяції еритроцитів. Введення L-аргініну (рис. 1., табл. 1.), щурам з алкогольною інтоксикацією, обумовлювало підвищення рівня дискоцитів на 15%. Застосування L-аргініну сприяло відновленню рівня дискоцитів до значень норми, адаптувало кисень-транспортну систему до високих доз етанолу і ушкоджуючого впливу гіпоксичного стану, який супроводжує цю патологію.

Висновок. Показано, що за умов EXAI відбувається порушення еритроцитарної ланки системи гемостазу. Введення L-NAME не впливало на морфологію еритроцитів за умов цієї патології. Введення L-аргініну за EXAI на тлі збільшення загальної кількості еритроцитів сприяло відновленню рівня дискоцитів до значень норми. Можливий механізм протекторного впливу L-аргініну за EXAI полягає у його антиоксидантній дії та у його участі в механізмі інгібування процесів еритроцитозису, які за умов цієї патології спровоковані появою цитотоксичних вільних радикалів чи безпосередньою дією алкоголю і його метаболітів.

Перспективи подальших досліджень. Лікування алкоголь-залежних пацієнтів і усунення негативних наслідків впливу етанолу є складною клінічною проблемою. Успіх у лікуванні залежить від правильного вибору протекторів, які зможуть усунути основні види розладів функціонування клітини. Тому, на основі отриманих результатів можна розробити тест-систему з метою встановлення ступеня ураження компонентів периферичної крові за умов алкогольної інтоксикації для цілісної картини симптомокомплексу.

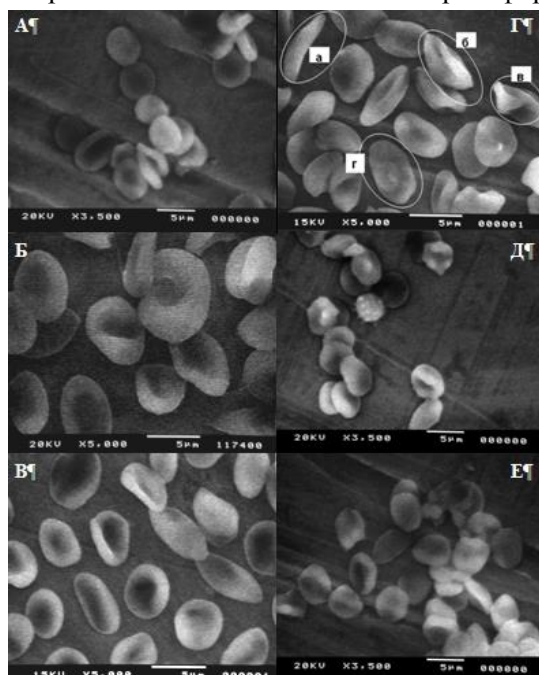


Рисунок. Поліморфізм еритроцитів периферійної крові щурів у контролі та за умов EXAI:

А – контроль; Б – К за умов введення L-аргініну; В – К за умов введення L-NAME; Г – EXAI; Д – EXAI за умов введення L-аргініну; Е – EXAI за умов введення L-NAME, а – еліпсоподібні; б – дзвоно- та куполоподібні; в – еритроцити з гребенями різної форми; г – важко класифіковані дегенеративні форми еритроцитів

Список використаної літератури

1. Буров Ю.В. *Нейрохимия и фармакология алкоголизма* / Ю.В. Буров, Н.Н. Ведерникова. – М.: Медицина, 1985. – 237 с.
2. Fuchs F.D. *Vascular effects of alcoholic beverages* / F.D. Fuchs // *Hypertension*. – 2005. – Vol. 45. – P. 851-852.
3. Васильева Е.М. *Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии* / Е.М. Васильева // *Биомед. химия*. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 118-126.
4. Прокопьева В.Д. *Нарушение морфологии эритроцитов и окислительная модификация белков теней эритроцитов и плазмы крови при алкоголизме* / В.Д. Прокопьева, О.В. Тюлина, Л.П. Пытина // *Вопр. биол. мед. и фармац. химии*. – 2005. – № 2. – С. 13-17.
5. Рязанцева Н.В. *Эритроцит при патологии: размышления у электронного микроскопа* / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Е.А. Степовая, // *Арх. патол.* – 2004. – № 3. – С. 53-61.
6. Сидоров П.И. *Сканирующая электронная микроскопия эритроцитов крыс при хронической алкогольной интоксикации на фоне белково-витаминной недостаточности* / П.И. Сидоров, И.А. Курпич, В.И. Сорокова // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* – 2001. – Т. 132, № 1. – С. 110-113.
7. Сторожок С.А. *Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу* / С.А. Сторожок, Л.Ф. Панченко, Ю.Д. Филиппович // *Вопр. мед. химии*. – 2001. – № 2. – С. 42-51.
8. Сибірна Н.О. *Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах* / Н.О. Сибірна, М.Я. Люта, Н.І. Климишин // *Studia Biologica*. – 2010. – Т. 4, № 1. – С. 143-160.
9. Сибірна Н.О. *Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: Метод. посібник*. / Н.О. Сибірна, М.М. Великий. – Львів: ЛДУ, 1997. – 69 с.

ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И L-NAME НА МОРФОЛОГИЮ ЭРИТРОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Резюме. Проанализированы изменения количественного состава эритроцитов периферической крови крыс и поверхностного рельефа их мембран при введении L-аргинина или L-NAME при экспериментальной хронической алкогольной интоксикации. Выявлено позитивное влияние L-аргинина на морфологическое состояние красных клеток крови при алкогольной интоксикации. Введение L-NAME не влияло на морфологию эритроцитов в условиях данной патологии.

Ключевые слова: эритроциты, экспериментальная хроническая алкогольная интоксикация, сканирующая электронная микроскопия

INFLUENCE OF L-ARGININE AND L-NAME ON MORPHOLOGICAL STATE OF ERYTHROCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF RATS UNDER ALCOHOLIC INTOXICATION

Abstract. The changes of quantitative composition of erythrocytes in rats' peripheral blood and superficial relief membrane of erythrocytes with administration of L-arginine or L-NAME under condition of experimental alcoholic intoxication were analyzed. L-arginine was found to have a positive influence on the morphological state of erythrocytes under alcoholic intoxication. Administration of L-NAME did not influence on the morphological state of red blood cells under conditions of the given pathology.

Key words: erythrocytes, experimental chronic alcohol intoxication, scanning electron microscopy.

Ivana Franko Lviv National University (Lviv)

Надійшла 23.04.2015 р.

Рецензент – проф. Волков К.С. (Тернопіль)