

УДК 612.111.6:[615-099.092+547.262]

БЕЛКИ И ЛИПИДЫ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Литвинова Е.С., Сорокин А.В., Долгарева С.А., Бушмина О.Н., Харченко А.В.,
Конопля Н.А.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск, e-mail: kat_roma@mail.ru

Цель – изучить содержание белков и липидов мембраны эритроцитов при кратковременном и длительном введении этанола. Опыты проведены на 67 крысах породы Вистар массой 150–200 г, поделенных на 4 группы по 16–17 особей: 1-я группа (контрольная); 2-я получала принудительно внутривенно 20 % раствор этанола 3 мл/кг в течение 5 дней через 24 часа; 3-я и 4-я группы – 30- и 60-дневная алкогольная интоксикация. Результаты. Установлены изменения, пропорциональные длительности поступления этанола, уровня только периферических мембранных белков, ответственных за структурообразование и стабилизацию (α - и β -спектрин, анкирин, паллидин), формообразование и гибкость (актин, тропомиозин) мембраны эритроцитов. Выявлены также изменения содержания и соотношения фракций липидов, составляющих двойной липидный каркас клеточной мембраны и отвечающих за упорядочивание белковых макромолекул и нормальный метаболизм эритроцитов. Установленные расстройства могут привести к значительным нарушениям функциональных свойств красных клеток крови.

Ключевые слова: интоксикация этанолом, белки и липиды мембраны эритроцитов.

PROTEINS AND LIPIDS OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN ACUTE AND CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

Litvinova E.S., Sorokin A.V., Dolgareva S.A., Bushmina O.N., Kharchenko A.V.,
Konoplya N.A.

State budgetary educational institution of higher professional education "Kursk state medical University" Ministry of healthcare of the Russian Federation, Kursk, e-mail: kat_roma@mail.ru

The purpose of the work was to study proteins and lipids of erythrocyte membranes during short and prolonged administration of ethanol. The experiments were performed in 67 rats of Wistar breed weighing 150–200 g, were divided into 4 groups of 16–17 individuals: group 1 - (control); 2 – received the force of intragastric 20 % ethanol 3 ml/kg within 5 days after 24 hours; 3 and 4 group – 30 - and 60-day alcohol intoxication. Results. Changes are proportional to the duration of ethanol intoxication, from the peripheral proteins responsible for structure formation and stabilization of membranes of erythrocytes (α - and β -spectrin – the main proteins of the cytoskeleton, ankyrin, pallidin), shaping and flexibility of the membrane (actin, tropomyosin). Also revealed changes in the content and ratio of fractions of lipids, constituting the lipid double frame of the cell membrane and responsible for the ordering of protein macromolecules and the normal metabolism of erythrocytes. Installed disorders can lead to significant violations of the functional properties of erythrocytes.

Keywords: ethanol intoxication, proteins and lipids of erythrocyte membranes.

Чрезмерное и длительное употребление алкоголя является экономической, социальной и медицинской проблемой всех стран мира, является одной из глобальных причин утраты трудоспособности и лежит прямо или косвенно в возникновении 5 % болезней. Статистически показано, что между злоупотреблением алкоголя и развитием не менее 60 патологий, есть прямая корреляционная связь, а в генезе более чем 200 заболеваний имеется опосредованная. Неумеренное потребление этанолсодержащих напитков, как в количественном отношении, так и во временном, относится к закономерностям увеличения

смертности населения. Во всем мире ежегодно алкоголь является основой летальных исходов в более 3 млн случаев, что составляет до 6 % от общей летальности. Трудно найти органы и ткани организма человека, не затронутого так или иначе острыми и хроническими злоупотреблениями этанола или его суррогатами. Помимо нарушений деятельности центральной и периферической нервной системы к действию алкоголя высокую чувствительность имеет печень. Это связано с тем, что данный орган первый стоит на пути токсиканта и отвечает за метаболизм этанола, при этом образование высокорекреационного промежуточного продукта ацетальдегида и инициирует свободно-радикальные процессы, приводящие к повреждению клеточных мембран гепатоцитов. Алкоголь чувствительными являются также сердечно-сосудистая система, поджелудочная железа, мышцы, иммунная система [1, 6,7, 10].

Ранее экспериментально было установлено, что кратковременное (5 суток), так и длительное введение (30 и 60 дней) этанола приводит к развитию токсического поражения печени, окислительного стресса, нарушению механизмов врожденного иммунитета, при этом кратковременное принудительное введение этанола вызывают изменения реактивного характера, то длительная интоксикация приводит к метаболическим нарушениям, требующим фармакологической коррекции [11].

В последние несколько лет исследованиями различных авторов установлена несомненная роль эритроцитов в регуляции различных метаболических процессов не только в условиях нормы, но, в первую очередь, в условиях патологии [3, 9]. В то же время практически отсутствуют данные о влиянии алкогольной интоксикации на структурные компоненты мембраны эритроцитов.

Целью настоящего исследования стало изучение содержания белков и липидов мембраны эритроцитов при острой и хронической интоксикации этанолом.

Материал и методы исследования. Опыты проведены на 67 здоровых крысах-самцах породы Вистар массой 150–200 г., содержание и забой которых проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных (г. Страсбург, Франция, 1986) и согласно МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. Ежедневное введение 20 % раствора этанола в дозе 3 мл/кг через 24 часа проводили принудительно, внутривентрикулярно. Всех животных делили на 4 группы по 16–17 особей в каждой: 1-я группа (контрольная); 2-й, 3-й и 4-й группам этанол вводили соответственно в течение 5, 30 и 60 дней. Забой осуществляли через 24 часа после последней интоксикации.

Эритроциты выделяли из 5 мл гепаринизированной крови, после ее 30-минутного отстаивания при 37 °С в 10 мМ Na-фосфатном буфере (рН=7,4), содержащем 0,9 % хлорида натрия и 3 % декстрана Т-500. После центрифугирования и удаления надосадочной жидкости

из эритроцитарной массы получали мембраны красных клеток крови [14], в которых определяли тонкослойной хроматографией липиды [4] и методом электрофореза в вертикальных пластинах полиакриламидного геля белки [15].

С помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010, полученный цифровой материал подвергали статистической обработке по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m). Существенность различий оценивали по U-критерию. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. У животных с 5-кратным введением этанола не выявлено изменений в содержании белков мембраны эритроцитов. Введение этанола в течение 30 дней приводило к снижению в эритроцитарной мембране уровня α - и β -спектрина, актина и повышению тропомиозина при нормальном содержании остальных исследованных мембранных белков. Введение этанола в течение 60 дней по сравнению с 30-дневной интоксикацией дополнительно снижало представительство анкирина и актина, повышало содержание паллидина и в еще большей степени тропомиозина (табл. 1).

Таблица 1

Содержание белков в мембране эритроцитов при острой и хронической интоксикации этанолом (M+m)

Показатели	1	2	3	4
	Контроль	Введение этанола		
		5 дней	30 дней	60 дней
α-спектрин	108,3±4,2	109,2±3,1	91,2±2,4 ^{*1,2}	90,5±2,7 ^{*1,2}
β-спектрин	103,1±3,3	105,0±2,8	93,7±2,8 ^{*1,2}	92,5±3,4 ^{*1,2}
Анкирин	89,0±3,0	91,2±2,2	90,4±3,7	74,2±2,7 ^{*1-3}
АТБ	171,6±4,2	172,3±3,8	169,5±4,2	169,8±3,0
4.1	70,4±3,2	68,3±2,4	69,8±2,7	71,2±2,6
Паллидин	92,1±4,1	90,2±3,0	94,1±3,9	99,7±2,1 ^{*1-3}
4.5	79,8±3,1	74,2±2,5	77,1±1,9	78,0±2,5
Дематин	91,2±3,1	89,1±2,4	88,6±3,4	90,1±2,8
Актин	88,1±3,2	89,3±2,2	73,1±2,1 ^{*1,2}	68,3±2,2 ^{*1-3}
Г-3-ФД	54,3±2,0	55,3±2,1	54,0±2,5	56,2±2,3
Тропомиозин	63,7±3,1	61,8±2,7	70,3±1,8 ^{*1,2}	84,5±2,3 ^{*1-3}
Г-S-T	61,2±2,5	63,1±1,9	62,4±2,7	62,8±3,0

Кратковременная интоксикация этанолом снижала уровень в мембране эритроцитов

фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилинозитола (ФИ), сфингомиелина (СМ), повышала содержание лизофосфатидилхолина (ЛФХ), холестерина (Х), триацилглицеролов (ТАГ), суммы моно- и диацилглицеролов (МАГ, ДАГ) и неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), при нормальном содержании фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС), суммы ЛФХ, ФХ, ФЭ, ФС и ФИ (глицерофосфолипиды – ГФЛ), суммы ГФЛ и СМ (фосфолипиды – ФЛ) и эфиров холестерина (ЭХ). Введение этанола в течение 30 дней по сравнению с кратковременной интоксикацией дополнительно снижало представительность ФЭ и ФЛ, в еще большей степени снижало уровень ФИ, СМ и повышало ЛФХ и Х. Интоксикация этанолом в течение 60 дней по сравнению с 30-дневным введением дополнительно снижала представительность ФХ, ФИ, СМ и повышала содержание ЛФХ, ДАГ+МАГ, НЭЖК (табл. 2).

Таблица 2

Содержание липидов в мембране эритроцитов при острой и хронической интоксикации этанолом (M+m)

Показатели	1	2	3	4
	Контроль	Введение этанола		
		5 дней	30 дней	60 дней
ФХ	24,0±0,7	22,6±0,2 ^{*1}	22,8±0,4 ^{*1}	21,2±0,4 ^{*1-3}
ЛФХ	3,9±0,05	4,2±0,1 ^{*1}	5,0±0,05 ^{*1,2}	5,6±0,05 ^{*1-3}
ФЭ	24,6±1,0	24,1±0,2	23,0±0,4 ^{*1,2}	22,0±1,0 ^{*1,2}
ФС	19,7±0,7	18,8±0,4	19,0±0,2	19,2±0,5
ФИ	4,6±0,05	4,4±0,1 ^{*1}	4,1±0,1 ^{*1,2}	3,9±0,05 ^{*1-3}
ГФЛ	76,6±2,2	74,1±2,4	73,9±1,6	72,5±2,0
СМ	12,2±0,5	11,1±0,3 ^{*1}	10,2±0,4 ^{*1,2}	8,9±0,2 ^{*1-3}
ФЛ	88,6±2,0	85,2±2,7	84,1±1,4 ^{*1}	82,9±1,8 ^{*1}
Х	44,8±2,1	47,8±0,3 ^{*1}	52,4±1,2 ^{*1,2}	54,9±1,2 ^{*1,2}
ЭХ	40,0±2,2	39,8±0,5	41,2±1,5	39,3±0,9
ТАГ	14,5±0,7	16,1±0,4 ^{*1}	15,9±0,6 ^{*1}	16,2±1,1 ^{*1}
ДАГ+МАГ	9,6±0,2	10,5±0,1 ^{*1}	10,1±0,2 ^{*1}	11,4±0,3 ^{*1-3}
НЭЖК	2,9±0,05	3,1±0,1 ^{*1}	3,2±0,05 ^{*1}	3,5±0,07 ^{*1-3}

При изучении соотношения фракций мембранных липидов определено, что кратковременное поступление этанола повышает соотношение Х+ЭХ/ФЛ, 30-дневное введение повышает отношение ЛФХ/ФХ, в еще большей степени Х+ЭХ/ФЛ и снижает соотношение СМ/ФХ. Интоксикация этанолом в течение 60 дней снижает отношение

СМ/ГФЛ, ФХ/ФС, ФХ+ФЭ/ФС+ФИ, в еще большей степени повышает соотношение ЛФХ/ФХ (табл. 3).

Таблица 3

Соотношение фракций липидов в мембране эритроцитов при острой и хронической интоксикации этанолом (M+m)

Показатели	1	2	3	4
	Контроль	Введение этанола		
		5 дней	30 дней	60 дней
ЛФХ/ФХ	0,16±0,01	0,19±0,02	0,22±0,02 ^{*1}	0,26±0,01 ^{*1-3}
СМ/ФХ	0,51±0,02	0,49±0,02	0,45±0,01 ^{*1,2}	0,42±0,02 ^{*1,2}
СМ/ГФЛ	0,16±0,02	0,15±0,01	0,14±0,02	0,12±0,01 ^{*1,2}
ФХ/ФС	1,22±0,03	1,2±0,03	1,2±0,04	1,1±0,04 ^{*1-3}
ФХ+ФЭ/ ФС+ФИ	2,0±0,03	2,0±0,04	1,98±0,03	1,87±0,03 ^{*1-3}
Х+ЭХ/ФЛ	0,96±0,03	1,03±0,02 ^{*1}	1,11±0,03 ^{*1,2}	1,14±0,02 ^{*1,2}

Выявленные данные указывают на существенные изменения, пропорциональные длительности поступления в организм этанола, со стороны периферических белков, ответственных за структурообразование и стабилизацию мембраны эритроцитов (α - и β -спектрин, анкирин, паллидин), формообразование и гибкость мембраны (актин, тропомиозин). Следует отметить, что введение алкоголя не влияет на уровень белков, являющихся интегральными и ответственных за внутриклеточный метаболизм (АТБ, Г-3-ФД, Г-S-T, белок полосы 4.5). Установленные изменения содержания и соотношения фракций липидов, составляющих двойной липидный каркас клеточной мембраны, несут ответственность за упорядочивание белковых макромолекул и нормальный метаболизм эритроцитов. Выявленные расстройства могут привести к значительным нарушениям функциональных свойств красных клеток крови [12, 13].

Наиболее вероятной причиной нарушений белково-липидного спектра мембраны эритроцитов при длительном введении этанола является интенсификация свободно-радикальных процессов, результатом чего является возрастание их чувствительности к перекисным процессам. Чрезмерная активация процессов ПОЛ сопровождается существенными изменениями состава, соотношения и степени окисленности мембранных глицерофосфолипидов (в большей степени ФХ и ФЭ), сфингофосфолипидов и гликофинголипидов, что в конечном итоге приводит к изменению физико-химических свойств липидного бислоя клеточных мембран и снижению активности

фосфолипидзависимых энзиматических систем. В условиях гиперактивации свободно-радикальных процессов закономерно и в первую очередь уменьшаются фосфолипиды, содержащие в своем составе полиненасыщенные жирные кислоты. Кроме этого, избирательная делипидизация цитоплазматических мембран эритроцитов вызывает увеличение соотношения между содержанием холестерина и фосфолипидов в бислое клеточных мембран, что в конечном итоге приводит к нарушению функции эритроцитов [2, 8].

Поскольку процессы ПОЛ взаимосвязаны с важнейшими физико-химическими свойствами мембран (проницаемость, вязкость, фазовое состояние), то развитие различных патологий сопровождается молекулярными изменениями плазматических мембран клеток. Одними из наиболее чувствительных являются мембраны эритроцитов, способных достаточно быстро изменять состав и в условиях нормального функционирования организма. Компенсаторные изменения в белково-липидном спектре эритроцитов направлены на поддержание жидкокристаллической структуры мембраны, барьерных, рецепторных, сорбционных, транспортных и других свойств и проницаемости мембраны. Однотипность адаптивных биохимических реакций на уровне белков и липидов является, очевидно, одним из основных путей эволюции живого, обуславливающих отсутствие качественных различий ответа организма на действие внешних факторов. Однако в связи с неодинаковой чувствительностью параметров физико-химической системы регуляции ПОЛ и способностью их к восстановлению масштаб и характер взаимосвязей между тесно скоординированными в норме показателями может существенно различаться не только в зависимости от природы и интенсивности внешнего фактора, но и от исходного физиологического состояния биологической системы, что обуславливает те количественные различия, которые обнаруживаются не только в разных исследованиях, но и зависят от времени начала действия фактора [5, 8, 12].

Заключение. Острая кратковременная интоксикация этанолом не привела к сдвигу от нормы содержания белков мембраны эритроцитов, при этом изменился лишь липидный состав клеточной мембраны в сторону увеличения холестерина и его эфиров. Хроническая интоксикация этанолом изменила белковый и липидный состав мембраны эритроцитов, однако некоторые показатели остались в норме при 30-дневном его поступлении. 60-дневное отравление этанолом привело к значительному отклонению от нормы содержание и соотношение белков и липидов мембраны эритроцитов, требующее проведения фармакологической коррекции.

Список литературы

1. Гребенюк А.Н. Сравнительная оценка эффективности пептидных препаратов при острых тяжелых отравлениях этанолом / А.Н. Гребенюк, А. А. Колобов, В.Л. Рейнюк, Д.А. Халютин // Токсикологический вестник. – 2014. – № 6 (129). – С. 15-21.
2. Ильиных Т.Ю. Влияние комбинированной анестезии на развитие окислительного стресса эритроцитов в зависимости от режима перфузии при операциях аортокоронарного шунтирования / Т.Ю. Ильиных, В.Н. Баранов, С.Л. Галян, Д.Ю. Кадочников // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2014. – № 3(47). – С. 45-48.
3. Конопля А.И. Хроническая ишемия головного мозга: состояние структурно-функциональных свойств эритроцитов / А.И. Конопля, А.А. Шульгинова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 17-22.
4. Крылов В.И. Метод тонкослойной хроматографии липидов мембран эритроцитов / В. И. Крылов, А.Ф. Виноградов, С.И. Ефремова // Лаб. дело. – 1984. – № 4. – С. 205-206.
5. Кушнарченко Н.Н. Клиническое значение нарушений состава жирных кислот мембран эритроцитов и углеводного обмена у больных первичной подагрой с артериальной гипертензией / Н.Н. Кушнарченко, А.В. Говорин, О.А. Щербакова // Клиническая медицина. – 2012. – Т. 90, № 11. – С. 51-53.
6. Сазонтова Т.Г. Коррекция нарушений, вызванных длительной алкоголизацией, с помощью гипоксии-гипероксии / Т.Г. Сазонтова, Н.В. Стряпко, Ю.В. Архипенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162, № 11. – С. 573-577.
7. Сиволап Ю.П. Связанные с употреблением алкоголя расстройства: новые подходы к диагностике и лечению / Ю. П. Сиволап // Журнал невропатологии и психиатрии. – 2015. – № 9. – С. 23-27.
8. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменение при патологиях разного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 3(73). – С. 334-354.
9. Структурно-функциональные свойства эритроцитов при использовании различных методов многокомпонентной общей анестезии при лапароскопической холецистэктомии у больных с желчнокаменной болезнью / С.А. Сумин, Н.Н. Авдеева, Н.А. Быстрова, и др. // Анестезиология и реаниматология. – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 296-300.
10. Терапевтический эффект нейропептидов и гепатопротектора моликсан при острых отравлениях этанолом / Д.А. Халютин, А.А., Ховпачев, А.Н. Гребенюк и др. // Токсикологический вестник. – 2015. – № 2. – С. 10-17.
11. Хроническая интоксикация этанолом: метаболические изменения, коррекция нарушений / А.И. Конопля, А.Л. Локтионов, В.В. Дудка и др. // Токсикологический вестник. – 2015. – № 5 (134). – С. 25-30.

12. Шишкина Л.Н. Липиды эритроцитов крови и их функциональная активность / Л.Н. Шишкина О.Г. Шевченко // Успехи современной биологии. – 2010. – Т. 130, № 6. – С. 587-602.
13. Шульгинова А.А. Фармакологическая коррекция нарушений липидного спектра мембран эритроцитов у пациентов с хронической ишемией мозга на фоне гипертонической болезни / А.А. Шульгинова, В.Б. Ласков, А.И. Конопля, А.В. Караулов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 7. – С. 3-7.
14. Dodge G.T. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes / G.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – № 100. – P. 119-130.
15. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage / U.R. Laemli // T4. Nature. – 1970. – № 227. – P. 680.