

УДК 615.326:612.117

О.В. Бурцев

ДЗ «Луганський державний медичний університет» МОЗ України, м. Рубіжне

ВПЛИВ СЕЛЕН-АКТИВУ НА КИСЛОТНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ, ЯКІ ЗНАХОДИЛИСЯ ПІД ДІЄЮ ТОЛУОЛУ *IN VITRO*

Досліджено вплив селен-активу на кислотну резистентність еритроцитів, які знаходилися під дією толуолу *in vitro*. Встановлено, що попередня інкубація еритроцитів крові людини в розчині селен-активу при подальшій дії толуолу підвищує кислотну резистентність еритроцитів.

Ключові слова: еритроцити, толуол, кислотна резистентність, антиоксиданти.

В процесі гемолізу утворюється широкий спектр хімічних сполук – ефір, хлороформ, бензин, бензол, толуол тощо [1, 2]. Такі речовини, як бензол, толуол, динітробензол, хлороформ, діють безпосередньо на мембрану еритроцитів, руйнуючи її. Інші утворюють метгемоглобін, і гемоліз, що розвивається при інтоксикації ними, є вторинним явищем [3, 4].

В останнє десятиріччя для оптимізації функціонування внутрішньоклітинної про-оксидантно-антиоксидантної системи використовуються фармакологічні препарати антиоксидантної дії [5]. До їх числа відноситься і препарат «Селен-актив», вплив якого на морфологічний і метаболічний стан еритроцитів крові, які знаходилися під дією толуолу, раніше не вивчався.

Метою роботи було вивчення впливу селен-активу на кислотну резистентність еритроцитів, які в подальшому зазнавали впливу толуолу *in vitro*.

Матеріал і методи. Використано 189 культур еритроцитів, які були отримані від 63 осіб чоловічої статі віком 19–25 років, середній вік – (22,5±1,2) року. Всі донори еритроцитів були умовно здоровими особами, не хворіли ніякими інфекційними хворобами протягом 6 місяців до взяття у них крові, а також протягом 30 днів не вживали алкоголю, нікотину, медикаментів, допінгів та інших речовин, здатних вплинути на еритроцити.

Робота виконувалась у відповідності до загальноприйнятих біоетичних норм. Кров забирали вранці, натще, з пальця і вени ліктьового згину. Робоча концентрація селен-активу при обробці еритроцитів складала 3,57 мг/л, термін обробки – 1 год. Надалі 3 мл розчину селен-активу змішували з 3 мл крові донора і витримували в термостаті при 37 °С протягом 1 год, після чого суспензію еритроцитів тричі

відмивали в ізотонічному розчині натрію хлориду центрифугуванням по 5 хв при 16 с⁻¹ обертів на 1 хв на центрифугі ОПН-3 і залишали з 3 мл суспензії еритроцитів. Надалі оброблені селен-активом еритроцити піддавали дії толуолу. Середня робоча концентрація толуолу, з якою взаємодіяли еритроцити, складала (300±30) мг/л. Експозиція еритроцитів з толуолом тривала 1, 2 та 3 год.

Кислотну резистентність еритроцитів визначали за методом [6]. При цьому враховували час сферуляції (точка початку гемолізу), час появи максимуму (на якій хвилині), тривалість гемолізу – час від початку до закінчення гемолізу (у хвилинах і секундах), висоту максимуму (у відсотках еритроцитів, які розпались), кількість максимумів. Референтною нормою служили показники кислотної резистентності еритроцитів, які контакту з толуолом і селен-активом не мали.

Статистична обробка отриманих даних проводилась з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати. Встановлено, що безпосередній контакт *in vitro* еритроцитів крові людини з толуолом негативно впливає на кислотну резистентність цих клітин: зменшується час сферуляції, час появи максимуму гемолізу, тривалості гемолізу, збільшується висота максимуму гемолізу і кількості максимумів.

Попередня інкубація еритроцитів в розчині селен-активу при подальшому 1-годинному їх контакті з толуолом суттєво поліпшувала кислотну резистентність еритроцитів.

Обробка еритроцитів селен-активом при подальшому 1-годинному впливі на них толуолом (таблиця) сприяла збільшенню часу сферуляції еритроцитів в 1,16 раза (p<0,05),

© О.В. Бурцев, 2016

часу появи максимуму гемолізу еритроцитів при обчисленні в хвиликах – в 1,1 рази ($p > 0,05$), в секундах – в 1,17 рази ($p < 0,05$), тривалості гемолізу еритроцитів – в 1,14 рази ($p < 0,05$). В культурах еритроцитів, які пройшли інкубацію з селен-активом, в кінці 1-годинного контакту з толуолом висота максимуму гемолізу і кількість таких максимумів були в 1,05 рази менше ($p > 0,05$), ніж у культурах еритроцитів, які обробку селен-активом не проходили. В останніх в кінці 1-годинного контакту з толуолом мала місце тенденція до зниження переважної кількості досліджуваних показників кислотної резистентності при статистично достовірному зменшенні в 1,19 рази тривалості гемолізу еритроцитів, обчисленої в секундах (таблиця).

Позитивний вплив на кислотну резистентність еритроцитів попередньої 1-годинної обробки селен-активом простежувався і в експерименті з подальшим 2-годинним впливом на ці клітини толуолу (таблиця).

Обробка еритроцитів селен-активом при подальшому 2-годинному впливі на них толуолом сприяла збільшенню часу сферуляції еритроцитів у 1,17 рази ($p < 0,01$), часу появи максимуму гемолізу еритроцитів, обчисленому в хвиликах, в 1,08 рази ($p < 0,05$), а обчисленому в секундах в 1,13 рази ($p < 0,001$), тривалості гемолізу еритроцитів в 1,11 рази при обчисленні як у хвиликах, так і в секундах ($p < 0,05$ в обох порівняннях). У еритроцитів, які пройшли інкубацію з селен-активом, в кінці 2-годинного контакту з толуолом висота максимуму гемолізу і кількість таких максимумів були відповідно в 1,10 і 1,40 рази менше ($p < 0,01$ і $p < 0,001$), ніж у культурах еритроцитів, які обробку селен-активом не проходили.

Виключення в культурах еритроцитів, які проходили обробку селен-активом попередньо до 2-годинної дії толуолом, склала тривалість гемолізу, обчислена в секундах. Цей показник був знижений відносно референтної

Вплив селен-активу на кислотну резистентність еритроцитів, які в подальшому мали безпосередній контакт з толуолом терміном 1, 2 та 3 год, ($M \pm m$) %

Показник	Референтна норма	Еритроцити без обробки селен-активом	Еритроцити, оброблені селен-активом
<i>1-годинний контакт</i>			
Час сферуляції, хв	3,02±0,09	2,78±0,10	3,23±0,13 [#]
Час появи максимуму, хв	4,33±0,10	4,06±0,14	4,45±0,14
Час появи максимуму, с	273±6	243,6±7,8	285±11 [#]
Тривалість гемолізу, хв	3,60±0,11	3,36±0,14	3,82±0,15 [#]
Тривалість гемолізу, с	240±6,7	201,6±8,5**	229,2±9,2 [#]
Висота максимуму гемолізу, %	17,5±0,4	18,66±0,57	17,8±0,4
Кількість максимумів, ум. од.	1,00±0,01	1,05±0,02	1,00±0,009
<i>2-годинний контакт</i>			
Час сферуляції, хв	3,02±0,09	2,66±0,10	3,11±0,09 [#]
Час появи максимуму, хв	4,33±0,10	3,98±0,09	4,31±0,09 [#]
Час появи максимуму, с	273±6	239,4±5,5	271±6 [#]
Тривалість гемолізу, хв	3,60±0,11	3,21±0,08	3,56±0,10 [#]
Тривалість гемолізу, с	240±6,7	192,6±5,4**	213,60±6,10 ^{###}
Висота максимуму гемолізу, %	17,5±0,4	19,70±0,65	17,9±0,4 ^{##}
Кількість максимумів, ум. од.	1,00±0,01	1,40±0,04	1,0±0,01 ^{###}
<i>3-годинний контакт</i>			
Час сферуляції, хв	3,02±0,09	2,27±0,07**	2,87±0,08 ^{###}
Час появи максимуму, хв	4,33±0,10	3,66±0,12**	4,11±0,09 ^{##}
Час появи максимуму, с	273±6	219,6±8,9***	246,6±10 ^{##}
Тривалість гемолізу, хв	3,60±0,11	2,87±0,09***	3,42±0,12 ^{###}
Тривалість гемолізу, с	240±6,7	172,2±6,4****	205,2±6,2 ^{#####}
Висота максимуму гемолізу, %	17,5±0,4	21,70±0,83****	18,3±0,6 ^{##}
Кількість максимумів, ум. од.	1,00±0,01	1,52±0,05****	1,00±0,01 ^{###}

Примітка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ порівняно з показниками референтної норми. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ порівняно з еритроцитами без обробки селен-активом.

норми в 1,12 раза ($p < 0,05$) і в середньому складав ($213,6 \pm 6,1$) с проти ($192,6 \pm 5,5$) с для еритроцитів, які селен-активом не оброблялися (ступінь відмінності – 1,11 раза, $p < 0,05$). В останніх в кінці 1-годинного контакту з толуолом мало місце статистично істотне зниження всіх досліджуваних показників кислотної резистентності.

Позитивний вплив на кислотної резистентність еритроцитів попередньої 1-годинної обробки селен-активом простежувався і в експерименті з подальшим 3-годинним впливом на ці клітини толуолу (таблиця).

Обробка еритроцитів селен-активом при подальшому 3-годинному впливі на них толуолом сприяла збільшенню часу сферуляції еритроцитів у 1,26 раза ($p < 0,001$), часу появи максимуму гемолізу еритроцитів (в хвиликах і секундах) в 1,12 раза ($p < 0,01$ і $p < 0,05$), тривалості гемолізу еритроцитів в 1,19 раза (у хвиликах і секундах), $p < 0,001$ в обох порівняннях. У еритроцитів, які пройшли інкубацію з селен-активом і 3-годинний контакт з толуолом, висота максимуму гемолізу і кількість таких максимумів були відповідно в 1,19 та 1,52 раза менше ($p < 0,01$ і $p < 0,001$), ніж у культурах еритроцитів, які обробку селен-активом не проходили. В останніх в кінці 3-годинного контакту з толуолом мало місце статистично істотне зниження всіх досліджуваних показників кислотної резистентності (таблиця).

Обговорення результатів. Важливе значення для оптимізації оксигенації організму має структурно-функціональний стан еритроцитів, який визначає їх форму, розмір, здатність до деформації, ступінь агрегації [2]. Толуольна інтоксикація і гіпоксія призводять до порушення гомеостатичної рівноваги та виникнення функціональних змін еритроцитів і з боку киснево-транспортної системи [7].

Незалежно від хімічної природи першою патогенною ланкою впливу хімічних чинників є мембраноруйнівний ефект, який супроводжується порушенням функції мітохондріальних і мікосомальних ферментів – оксигеназ, гідролаз, які беруть участь у детоксикації та елімінації патогенного початку [1, 3, 7]. Токсичні агенти впливають на клітинні мембрани, сприяючи окисненню і денатурації білків, порушуючи розташування молекул ліпідів, що веде до утворення пір [8]. Активні форми O_2 , H_2O_2 , органічні перекиси взаємодіють з ліпідами мембран, утворюють перекиси ліпідів, що призводить до структурних порушень і зміни проникності [9]. Отже, стійкість клітинних мембран еритро-

цитів порушується. Структурні та функціональні зміни мембран еритроцитів було виявлено при дії толуолу, і виражалися вони насамперед в ослабленні зв'язків між ліпідними і білковими компонентами [10]. На сьогоднішній день накопичена значна кількість відомостей, які свідчать про те, що підвищення ефективності функціонування системи антиокислювального захисту (АОЗ) в організмі здатне перешкоджати негативним ефектам, викликаним надмірною активністю процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у клітинах, і тим самим підвищувати їх стійкість [1, 4, 5].

В останнє десятиріччя для оптимізації функціонування внутрішньоклітинної прооксидантно-антиоксидантної системи використовуються фармакологічні препарати антиоксидантної дії [5]. До їх числа відноситься і препарат селен-актив.

Попередня 1-годинна інкубація еритроцитів крові людини в розчині селен-активу при подальшому впливі розчином толуолу протягом 1, 2 і 3 годин сприяла поліпшенню стану кислотної резистентності еритроцитів. Це мало прояв у збільшенні часу сферуляції еритроцитів, часу появи максимуму гемолізу, тривалості гемолізу та зменшенні висоти і кількості максимумів гемолізу.

З даних літератури відомо про важливу роль сполук селену в організмі тварин і людини [1, 3]. Селен має антигістамінний, антимутагенний і антиканцерогенний ефект, здатен підвищувати репродуктивність тварин і пригнічувати процеси ПОЛ, запобігає розвитку окислювального стресу. Антиоксидантний вплив селену реалізується переважно ферментативним шляхом, оскільки цей мікроелемент є кофактором глутатіонпероксидази [8]. В літературі є дані про сприятливий вплив селену на процеси кровотворення і захисного впливу на гемвісні білки [1]. Отримані дані про захисний вплив селену на активність ЛДГ і каталази еритроцитів у експериментах на білих щурах, який, у свою чергу, стабілізує метаболічні процеси в еритроциті, запобігає розвитку окислювального стресу і гіпоксичних станів [5, 7, 10].

Отримані нами дані щодо позитивного впливу на еритроцити селен-активу узгоджуються з даними інших дослідників, які з метою поліпшення стану червоної крові теж використовували фармакологічні препарати з антиоксидантною дією.

Висновки

1. Контакт еритроцитів крові людини з толуолом *in vitro* негативно впливає на кис-

лотну резистентність еритроцитів, а саме знижує її. Це має прояв у скороченні часу сфєруляції еритроцитів, часу появи максимуму гемолізу і тривалості останнього, у збільшенні висоти максимуму і кількості цих максимумів. Ступінь виразності негативного впливу толуолу на кислотну резистентність еритроцитів збільшується по мірі збільшення тривалості контакту еритроцитів з толуолом. Найменш значні негативні зміни кислотної резистентності еритроцитів розвиваються при впливі на них толуолу протягом однієї години,

найбільш значні – при тривалості впливу толуолу на еритроцити протягом трьох годин.

2. Обробка еритроцитів розчином селен-активу перед наступним їх контактом з толуолом збільшує кислотну резистентність еритроцитів. Позитивний вплив селен-активу на еритроцити зростає зі зменшенням терміну взаємодії еритроцитів з толуолом.

Перспективність дослідження: планується вивчення ефективності дії селен-активу на еритроцити крові людини, які контактують з толуолом.

Список літератури

1. Лановенко І.І. Пошкодження кисневотранспортної системи та генез гіпоксії при гемолізі еритроцитів // Труды Крымского гос. мед. ун-та им. С.И. Георгиевского. – Симферополь, 2006. – Т. 142, Ч. 3. – С. 228–229.
2. Рабаданова А.И. Кислотная и осмотическая устойчивость эритроцитов периферической крови человека при действии стрессовых факторов различного генеза / А.И. Рабаданова, Д.М. Бамматмурзаева, Р.М. Гасасаева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 43–47.
3. Боровска М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровска, Э.Э. Кузнецов, В.Г. Горохова // Бюллетень ВСНЦ. – 2010. – Т. 73, № 3. – С. 334–354.
4. Stimulation of suicidal erythrocyte death by benzethonium / E. Lang, K. Jilani, C. Zelenak et al. // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2011. – Vol. 28. – P. 347–354.
5. Вплив амізону на кислотну резистентність еритроцитів *in vitro* / І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, І.О. Лаврінчук та ін. // Український хіміотерапевтичний журнал. – 2001. – № 2. – С. 21–24.
6. Гительзон И.И. Эритрограммы как метод клинического исследования крови / И.И. Гительзон, И.А. Терсков. – Красноярск, 1959. – 249 с.
7. Erythrocyte-dependent regulation of human skeletal muscle blood flow: role of varied oxyhemoglobin and exercise on nitrite, S-nitrosohemoglobin, and ATP / S.P. Dufour, R.P. Patel, A. Brandon et al. // Am. J. Physiology. Heart and Circulatory Physiology. – 2010. – Vol. 299, № 6. – P. 1936–1946.
8. Janus kinase 3 is expressed in erythrocyte, phosphorylated upon energy depletion and involved in the regulation of suicidal erythrocyte death / S.K. Bhavsar, S. Gu, D. Bobbala et al. // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2011. – № 27. – P. 547–556.
9. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis / P. Bartolucci, C. Brugnara, A. Teixeira-Pinto et al. // Blood. – 2012. – Vol. 120, № 15. – P. 3136–3141.
10. Merz A.J. What are the roles of V-ATPases in membrane fusion? / A.J. Merz // Proceeding of the National Academy Sciences USA. – 2015. – Vol. 112, № 1. – P. 8–9.

А.В. Бурицев

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕН-АКТИВА НА КИСЛОТНУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ, НАХОДИВШИХСЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТОЛУОЛА *IN VITRO*

Исследовано влияние селен-актива на кислотную резистентность эритроцитов, которые находились под действием толуола *in vitro*. Установлено, что предварительная инкубация эритроцитов крови человека в растворе селен-актива при последующем действии толуола повышает кислотную резистентность эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, толуол, кислотная резистентность, антиоксиданты.

A.V. Burcev

INFLUENCE OF SELENIUM-ASSET ON THE ACID RESISTANCE OF ERYTHROCYTES, WHICH WERE UNDER THE ACTION OF TOLUENE *IN VITRO*

The article is devoted to studying of influence Selenium-asset on the acid resistance of erythrocytes, which were under the influence of toluene *in vitro*. Found that pre-incubation of human blood cell in a solution of Selenium-asset, the subsequent action of toluene, increases the acid resistance of erythrocytes.

Key words: erythrocytes, toluene, acid resistance, antioxidants.

Поступила 13.05.15