

УДК 613.81: 612.111.6

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ КАРНОЗИНА И ЕГО N-АЦЕТИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО НА СТАБИЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ В СОСТОЯНИИ АБСТИНЕНЦИИ

В.Д. ПРОКОПЬЕВА*, Н.А. БОХАН*, П. ДЖОНСОН**, А.А. БОЛДЫРЕВ***

*Институт психического здоровья Томского научного центра РАМН, Томск, Россия;

**Кафедра химии Университета штата Огайо, Атенс, 45701 США,

***Международный Биотехнологический Центр при Московском государственном Университете им. М.В. Ломоносова (кафедра биохимии),
119899 Москва (телефон/факс 939-1398).

Исследовано влияние природного дипептида карнозина и его ацетилированного производного N-ацетилкарнозина на стабильность и форму патологических эритроцитов больных алкоголизмом в стадии абстиненции. Оба исследуемых соединения повышают устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу, при этом в микроскопических исследованиях в 12 случаях из 30 с карнозином и в 17 случаях из 30 с N-ацетилкарнозином наблюдали увеличение количества нормальных форм эритроцитов. Делается вывод, что данные соединения оказывают стабилизирующий, а в отдельных случаях и регенерирующий, эффекты на патологические эритроциты больных алкоголизмом.

Ключевые слова: алкоголизм, гемолиз эритроцитов, карнозин.

ВВЕДЕНИЕ. При алкоголизме в различных тканях наблюдается активация свободнорадикального окисления липидов, приводящая к структурно-функциональным нарушениям биологических мембран [1,2]. Повреждение мембран эритроцитов под действием хронической алкоголизации приводит к гемолизу клеток и развитию анемии [3,4]. Природный дипептид карнозин (β -аланил-L-гистидин) способен снижать содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов за счет непосредственного взаимодействия с ними [5]. Это позволяло предполагать возможность его протекторного действия на мембраны клеток больных алкоголизмом. В соответствие с этим нами изучено влияние карнозина и некоторых его производных на стабильность эритроцитов, их размер и форму у больных алкоголизмом в период абстиненции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Для исследования использовали кровь 11 здоровых мужчин, а также 32 мужчин больных алкоголизмом второй стадии до купирования абстинентного синдрома, у которых лишь 10-20% эритроцитов имели нормальную форму. Средний возраст доноров составлял $40,8 \pm 7,5$ лет.

Устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу оценивали в физиологическом растворе (рН 5,5) при температуре $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ через 1 час после забора крови. За

динамикой гемолиза эритроцитов под действием 2 мМ HCl наблюдали по изменению оптической плотности при $\lambda=670$ нм [6]. На кривой распределения эритроцитов (в %) по устойчивости к действию кислоты во времени (эритрограмме) определяли следующие параметры: T_n - время начала гемолиза (мин); T_k - время окончания гемолиза (мин); $T_{\text{макс}}$ - время максимума на эритрограмме (мин); %макс - количество гемолизированных эритроцитов в процентах за время $T_{\text{макс}}$; ИСЭ - интервал стойкости эритроцитов (общая длительность гемолиза, рассчитывали как разность $T_k - T_n$, мин).

Качественную оценку размера и формы эритроцитов проводили микроскопическим методом после окрашивания мазков крови по стандартной методике с красителем Романовского [7]. При изготовлении микрофотографий использовали объектив - 90, гомаль - 6, масляную иммерсию (увеличение в 1400 раз).

Растворы карнозина и родственных соединений готовили на физиологическом растворе (рН 5,5), действующая концентрация в пробе при оценке их влияния на кислотную стабильность эритроцитов составляла 2 мМ, в микроскопических исследованиях - 5 мМ. В качестве препарата сравнения использовали PIPES (пиперазин- N,N' -бис-2-этансульфонат), считая, что буферная емкость данного вещества при рН 5,5 сравнима с таковой для исследуемых соединений.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы «Microsoft Excel», достоверность оценивали по t-критерию Стьюдента.

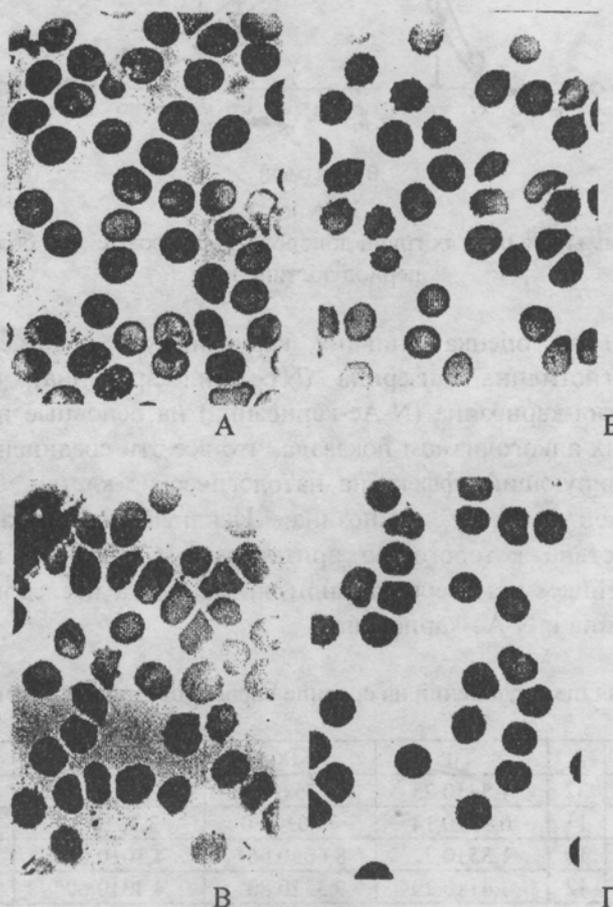


Рисунок 1.

Микрофотографии эритроцитов. Увеличение 1400, иммерсия, гомаль-6. А- эритроциты здорового донора в присутствии физиологического раствора; Б- эритроциты больного алкоголизмом в состоянии абстиненции в присутствии физиологического раствора; В - то же в присутствии 5 мМ PIPESa; Г - то же в присутствии 5 мМ N-Ас-карнозина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Кислотная эритрограмма здоровых доноров хорошо воспроизводима, ее основные параметры: $T_n=1,7\pm 0,2$ мин; $T_k=7,4\pm 0,4$ мин; $T_{\text{макс}} = 3,5\pm 0,1$ мин; % макс = $21,3\pm 2,3\%$; ИСЭ = $5,7 \pm 0,5$ мин. Эритроциты имеют нормальную форму двояковогнутого диска, одинаковый размер (рис. 1А).

У больных алкоголизмом в состоянии абстиненции наблюдается тенденция к сдвигу эритрограммы влево (рис.2). Это свидетельствует о повышении доли эритроцитов со сниженной устойчивостью к гемолизирующему действию кислоты в данной группе доноров, хотя этот сдвиг не является достоверным ($p>0,05$). Как видно на микрофотографии (рис. 1Б), эритроциты у больных с абстинентным синдромом характеризуются анизоцитозом (имеют разный размер), значительно увеличена доля клеток с измененной формой - пойкилоцитов и акантоцитов. В литературе такие изменения клеток связывают с нарушением нормального взаимодействия мембраны с цитоскелетом [8].

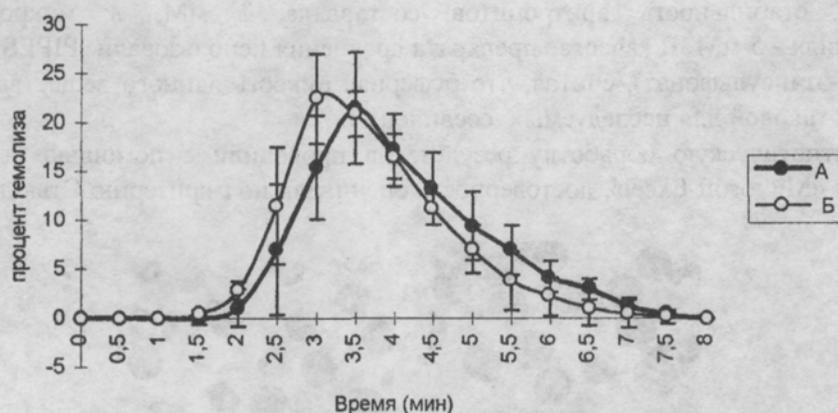


Рисунок 2.

Средние эритрограммы для разных групп доноров. А - здоровые ; Б - больные алкоголизмом в период абстиненции .

Предварительная оценка влияния карнозина и родственных соединений - гистидина, ацетил-гистидина, анзерина (N1-метил-карнозина), офидина (N3-метил-карнозина) и N-ацетил-карнозина (N-Ас-карнозина) на основные параметры кислотных эритрограмм больных алкоголизмом показала, что все эти соединения, кроме гистидина, оказывают стабилизирующий эффект на патологические клетки. Однако этот эффект был менее выражен, чем у карнозина. Исключение составил N-Ас-карнозин, положительное действие которого на эритрограммы больных превышало действие карнозина. В дальнейшем мы сосредоточили внимание на исследовании эффектов двух соединений - карнозина и N-Ас-карнозина.

Таблица 1 Влияние соединений на средние параметры эритрограмм больных алкоголизмом

Соединение,	n	T_n	T_k	$T_{\text{макс}}$	% макс	ИСЭ
контроль	32	$1,34\pm 0,23$	$6,75\pm 0,65$	$3,20\pm 0,27$	$22,4\pm 5,3$	$5,4\pm 0,7$
PIPES	11	$0,95\pm 0,14$	$7,60\pm 0,60$	$3,70\pm 0,30$	$18,3\pm 3,5$	$6,5\pm 0,5$
карнозин	10	$1,35\pm 0,22$	$8,60\pm 0,66^*$	$4,10\pm 0,60^*$	$14,1\pm 4,5$	$7,4\pm 1,1^*$
N-Ас-карнозин	12	$1,41\pm 0,20$	$9,33\pm 0,80^*$	$4,40\pm 0,60^*$	$12,2\pm 2,5^*$	$8,0\pm 0,8^*$

Примечание. * $P < 0,05$ по сравнению с контролем. Концентрация соединений в пробе - 2мМ

Влияние PIPESa, карнозина и N-Ас-карнозина на эритрограммы больных алкоголизмом представлены на рис.3. В таблице 1 даны среднестатистические значения и доверительные интервалы основных параметров кислотных эритрограмм больных в

состоянии абстиненции в присутствии этих соединений и без них. Добавление PIPESa в среду инкубации несколько повышает устойчивость эритроцитов по сравнению с контролем - наблюдается рост Тк, Т макс, ИСЭ, снижается среднее значение % макс. Однако достоверных различий между контрольной эритрограммой (без добавок) и эритрограммой в присутствии буфера PIPESa мы не обнаружили.

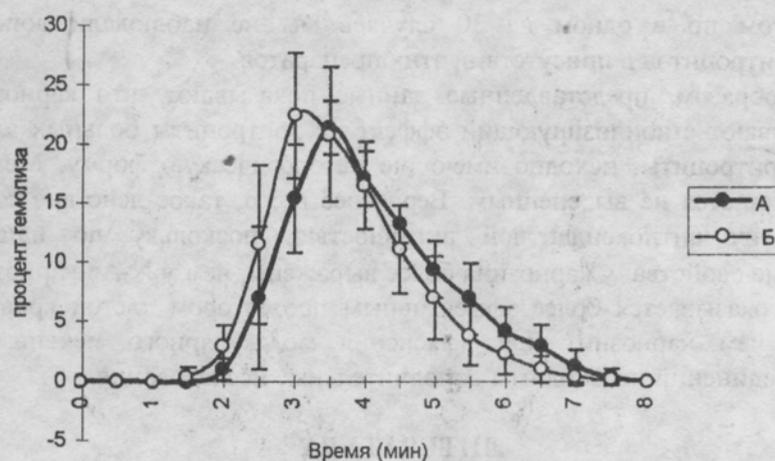


Рисунок 3.

Влияние препаратов (2 мМ) на эритрограмму больных алкоголизмом в состоянии абстиненции. А - без препаратов (n=32); Б - PIPES (n=11); В - карнозин (n=10); Г - N-Ас-карнозин (n=12).

Таблица 2. Влияние соединений на форму эритроцитов 30 больных алкоголизмом в состоянии абстиненции, кровь которых содержит 10-20 % нормальных эритроцитов.

Соединение	Количество больных			
	< 10 % нормальных клеток	10-20% нормальных клеток	20-70% нормальных клеток	>70% нормальных клеток
контроль	0	30	0	0
PIPES	5	22	3	0
карнозин	0	18	10	2
N-Ас-карнозин	0	13	9	8

Примечание. Концентрация соединений в пробе - 5 мМ

Добавление в среду инкубации карнозина приводит к более выраженным изменениям эритрограммы: она становится более полой, увеличиваются Тк, Т макс, ИСЭ, существенно снижается % макс. В присутствии N-Ас-карнозина эти изменения становятся еще более заметными. Если учесть, что гемолиз эритроцитов во всех случаях проводили при исходном значении рН среды, равном 5,5, а рК исследуемых соединений при используемой температуре находится в области 6,8-7,0, можно полагать, что представленные изменения эритрограммы под влиянием этих веществ нельзя объяснить рН-буферными свойствами. Мы полагаем, что такое изменение эритрограммы в присутствии карнозина и N-Ас-карнозина связано с изменением в их присутствии устойчивости эритроцитарных мембран к повреждающему действию кислоты.

О том, что при добавлении дипептидов происходят положительные изменения мембран эритроцитов, свидетельствуют и микроскопические данные. На Рис.1 представлены микрофотографии эритроцитов больного без исследуемых веществ (добавлен физиологический раствор) (Рис. 1Б), в присутствии PIPESa (Рис.1В) и в присутствии N-Ас-карнозина (Рис.1Г). Если в среде с PIPESом существенных изменений эритроцитов не происходило, то в присутствии N-Ас-карнозина форма клеток изменялась - исчезали акантоциты, уменьшалось количество пойкилоцитов, не наблюдалось анизоцитоза.

Результаты исследования влияния соединений на форму эритроцитов 30 больных алкоголизмом, имеющих лишь 10-20% нормальных клеток, представлены в Таблице 2. При добавлении к такой крови PIPESa обычно не наблюдается изменения формы эритроцитов (22 случая из 30), а в 5 случаях патологические изменения эритроцитов в присутствии этого препарата даже усугублялись. В то же время карнозин и N-Ас-карнозин в 12 и 17 случаях из 30 соответственно приводили к нормализации формы клеток, при этом ни в одном из 30 случаев мы не наблюдали дополнительного повреждения эритроцитов в присутствии этих препаратов.

Таким образом, представленные данные показывают, что карнозин и N-Ас-карнозин оказывают стабилизирующий эффект на эритроциты больных алкоголизмом, нормализуют эритроциты, исходно имеющие патологическую форму. Механизм этого эффекта пока остается не выясненным. Вероятнее всего, такое действие соединений не исчерпывается их антиоксидантной активностью, поскольку по нашим данным антиоксидантные свойства у карнозина более выражены, чем у N-Ас-карнозина [9], хотя N-Ас-карнозин оказывается более эффективным протектором клеток крови у больных алкоголизмом, чем карнозин. Для выяснения молекулярного механизма действия исследуемых соединений необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goldstein D., Chin J. (1981) Fed. Proc., **40**, 2073-2076.
2. Sozmen E., Tanyalcin T., Onat T., Kutav F., Erlacin S. (1994) Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **32**, 741-744.
3. Chi L.M. (1991) Biochim. Biophys. Acta, **1062**, 46-50.
4. Bizzaro N. (1993) Clin. Lab. Haematol, **15**, 93-102.
5. Boldyrev A.A. (1993) Int. J. Biochem., **25**, 1101-1107.
6. Коробов В.Н., Федорович И.П., Климишин Н.И. (1992) Бюлл. эксп. биол. мед., **113**, (6), 640-642.
7. Меньшиков В.В. (1987) Лабораторные методы исследования в клинике. М., Медицина.
8. Bonfoco E., Leist M., Zhivotovsky B. et.al. (1996) J. Neurochem., **67**, 2484-2493.
9. Болдырев А.А. (1998) Карнозин - биологическое значение и возможности применения в медицине. Изд-во Московского Университета.

EFFECT OF CARNOSINE AND ITS DERIVATIVE N-ACETYL-CARNOSINE ON THE STABILITY OF RED BLOOD CELLS FROM ABSTINENT ALCOHOLIC PATIENTS

V.D.PROKOPIEVA*, N.A. BOHAN*, P. JOHNSON**, A.A. BOLDYREV***

*Mental Health Research Institute, Medical Academy of Sciences of Russia, Tomsk, Russia;

**Department of Chemistry, Ohio University, Athens, OH 45701, USA;

***International Biotechnological Center of M.V. Lomonosov University (Department of Biochemistry), 199899 Moscow, Russia, tel/fax 939-1398.

The effects of carnosine, a natural dipeptide, and its derivative, N-acetyl-carnosine (Ac-carnosine), on the stability and shape of red blood cells obtained from abstinent alcoholics was studied. In the presence of both carnosine and Ac-carnosine, the erythrocytes of abstinent alcoholics show a statistically significant increase in their ability to resist acidic hemolysis. Investigations of microscope pictures also show that carnosine and Ac-carnosine have beneficial effects on the pathological state of abstinent alcoholic erythrocytes. The addition of carnosine and Ac-carnosine resulted in the normalization of cell morphology (in 12 and 17 out of 30 cases, respectively). These results may be due to the stabilizing and regenerating ability of these compounds on alcoholic erythrocytes.

Key words: alcoholism, erythrocyte hemolysis, carnosine.