

## СОДЕРЖАНИЕ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
1.1 Эритроциты: свойства и функции.....	4
1.1.1 Характеристика мембран эритроцитов.....	6
1.1.2 Проницаемость эритроцитарных мембран.....	9
1.2 Содержание глюкозы в плазме крови и эритроцитах.....	11
1.3 Содержание лактата в плазме крови и эритроцитах.....	12
1.4 Экологическая ситуация в городе Красноярске.....	13
1.5 Влияние промышленных выбросов на показатели крови.....	14
1.6 Воздействие токсических веществ на эритроциты.....	15
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	18
2.1 Объект исследований.....	18
2.2 Методы исследования.....	18
2.2.1 Подсчет количества эритроцитов электрокалориметрическим способом.....	18
2.2.2 Определение содержания гемоглобина.....	19
2.2.3 Расчет среднего содержания гемоглобина в одном эритроците и цветного показателя крови.....	19
2.2.4 Определение концентрации глюкозы в плазме крови и эритроцитах.....	20
2.2.5 Определение проницаемости эритроцитарных мембран.....	21
2.2.6 Определение сорбционной способности эритроцитов.....	22
2.2.7 Определение концентрации лактата в плазме крови и эритроцитах.....	22
2.2.8 Статистические методы исследования.....	23
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	25
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	26

## ВВЕДЕНИЕ

Кровь человека составляет примерно 8% от массы тела. Кровь состоит из клеток, клеточных фрагментов и плазмы. Доля клеточных элементов в общем объеме называется гематокритом и составляет примерно 45%.

К форменным элементам крови относятся эритроциты, лейкоциты и тромбоциты [1].

Анализ показателей крови наиболее важен, так как у здорового человека эти показатели относительно постоянны, любое их изменение – показатель изменения и в организме человека [2].

Общий анализ крови является основополагающим исследованием в диагностике любого заболевания. За счет своей динамичности кровь самой первой реагирует на любые изменения в теле человека. Именно поэтому по общему анализу крови можно значительно сузить поиск предполагаемых патологий и в некоторых случаях даже сразу диагностировать различные заболевания [3].

Изменение любого из основных показателей крови является признаком какого-либо нарушения в организме, такое изменение может вызывать нарушения в других системах [4, 5, 6].

Уровень загрязнения атмосферы в Красноярске в разы превышает нормативы. В воздухе Красноярска скапливаются вредоносные вещества, промышленные отходы, химикаты, дым от пожаров, отравляющие пары. При неподходящих метеоусловиях, в безветренную погоду, выбросы держатся в воздухе на протяжении долгого времени. Техногенные загрязнения влияют на показатели крови. Повышенное содержание вредных примесей в приземном слое воздуха, вызванное выбросами промышленных предприятий, выхлопными газами автотранспорта и другими факторами при проникновении в органы дыхания человека приводит к нарушению системы дыхания и кровообращения. Выбросы автотранспортных средств особенно опасны, потому что

осуществляются в непосредственной близости от тротуаров в зоне активного пешеходного движения [7, 8].

В настоящее время при исследовании биологических мембран часто используют эритроциты как модель, отражающую состояние мембран всего организма [9].

Использованный в работе комплексный подход при определении влияния токсикантов и биологически активных веществ на мембраны эритроцитов позволяет выявить характер происходящих в мембране изменений, взаимные изменения параметров состояния мембран при действии токсических соединений, и может быть рекомендован в качестве экспериментальной модели для исследования свойств новых потенциальных мембранопротекторов и токсикантов.

Целью данной работы является оценка функционального состояния мембран эритроцитов лиц, проживающих в районе Академгородка и Центральном районе города Красноярска.

Исходя из цели, сформулированы следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ общего числа эритроцитов в крови, содержания гемоглобина в эритроцитах и плазме крови лиц из изученных районов города Красноярска.
2. Оценить концентрацию глюкозы и лактата в плазме крови в обследуемых группах.
3. Определить сорбционную способность эритроцитов и проницаемость эритроцитарных мембран в обследуемых группах.

Работа проводилась на кафедре медицинской биологии института фундаментальной биологии и биотехнологий Сибирского Федерального Университета.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Эритроциты: свойства и функции

В норме в крови у мужчин содержится  $4,0 - 5,0 \times 10^{12}$  кл/л, у женщин –  $3,9 - 4,5 \times 10^{12}$  кл/л. Повышение количества эритроцитов в крови называется эритроцитозом, уменьшение – эритропенией, что часто сопутствует малокровию, или анемии. При анемии может быть снижено или число эритроцитов, или содержание в них гемоглобина, или и то и другое. Как эритроцитозы, так и эритропении бывают ложными в случаях сгущения или разжижения крови и истинными [5,10].

Эритроциты человека лишены ядра и состоят из стромы, заполненной гемоглобином, и белково-липидной оболочки. Эритроциты имеют преимущественно форму двояковогнутого диска диаметром 7,5 мкм, толщиной на периферии 2,5 мкм, в центре – 1,5 мкм. Эритроциты такой формы называются нормоцитами. Особая форма эритроцитов приводит к увеличению диффузионной поверхности, что способствует лучшему выполнению основной функции эритроцитов – дыхательной. Специфическая форма обеспечивает также прохождение эритроцитов через узкие капилляры. Лишение ядра не требует больших затрат кислорода на собственные нужды и позволяет более полноценно снабжать организм кислородом [2].

Скорость оседания эритроцитов у здоровых мужчин составляет 2 – 10 мм в час, у женщин – 2 – 15 мм в час. СОЭ зависит от многих факторов: количества, объема, формы и величины заряда эритроцитов, их способности к агрегации, белкового состава плазмы. В большей степени СОЭ зависит от свойств плазмы крови. СОЭ увеличивается при беременности, стрессе, воспалительных, инфекционных и онкологических заболеваниях, при уменьшении числа эритроцитов, при увеличении содержания фибриногена. СОЭ снижается при увеличении количества альбуминов. Многие стероидные

гормоны (эстрогены, глюкокортикоиды), а также лекарственные вещества вызывают повышение СОЭ [11].

Образование эритроцитов, или эритропоэз, происходит в красном костном мозге.

Об интенсивности эритропоэза судят по числу ретикулоцитов – предшественников эритроцитов. В норме их количество составляет 1 – 2%. Созревшие эритроциты циркулируют в крови в течение 100 – 120 дней [6].

Разрушение эритроцитов происходит в печени, селезенке, в костном мозге посредством клеток мононуклеарной фагоцитарной системы. Продукты распада эритроцитов также являются стимуляторами кроветворения [11].

Максимальная продолжительность жизни эритроцитов достигает 120 дней, средняя — 60-90 дней. Старение эритроцитов сопровождается уменьшением образования в них количества АТФ в ходе метаболизма глюкозы. Это нарушает требующие энергии процессы восстановления формы эритроцитов, транспорта катионов, защиты компонентов эритроцитов от окисления [11]. Эритроциты становятся менее эластичными, их мембрана теряет кислоты, в результате чего, они или разрушаются внутри сосудов или же становятся добычей захватывающих и разрушающих их макрофагов селезенки, купферовских клеток печени и макрофагов костного мозга. В ходе внутриклеточного гемолиза каждый день разрушается 6- 7 г гемоглобина, освобождая в макрофаги до 30 мг железа. После отщепления от гемоглобина гем превращается в желчный пигмент — билирубин, поступает с желчью в кишечник, и в виде стеркобилина и уробилина выводится с калом и мочой [12].

При внутрисосудистом гемолизе разрушается 10-20 % эритроцитов. Их гемоглобин освобождается непосредственно в плазму, в которой он связывается плазменным белком — гаптоглобином.. Половина количества образовавшегося комплекса — гемоглобин-гаптоглобин покидает плазму и поглощается паренхиматозными клетками печени, что предупреждает поступление свободного гемоглобина в почки [13].

Гемоглобин — это хемотрепин, окрашивающий эритроцит в красный цвет после присоединения к содержащемуся в нем железу молекулы кислорода. Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц, каждая из которых представлена гемом, связанным с белковой частью молекулы — глобином. Глобин представлен двумя  $\alpha$ - и двумя  $\beta$ - полипептидными цепями. Синтез гема протекает в митохондриях эритробластов. Синтез цепей глобина идет на полирибосомах и контролируется генами 11 и 16 хромосом [14].

Гемоглобин обладает способностью обратимо присоединять кислород. Соединения гемоглобина с молекулой кислорода называется оксигемоглобин. Сродство гемоглобина к кислороду выражают парциальным давлением кислорода, при котором гемоглобин насыщен кислородом на 50%. Молекулярный кислород обладает высоким сродством к гемоглобину. Однако, и другие соединения могут фиксироваться на его молекуле, ослабляя связь кислорода с гемоглобином. Поэтому сродство гемоглобина к кислороду и диссоциация оксигемоглобина (т.е. отсоединение молекулы кислорода от гемоглобина) зависят от напряжения кислорода, угольной кислоты в крови, концентрации протонов водорода и ее температуры, концентрации 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах. Изменение величин этих факторов снижают скорость отдачи кислорода гемоглобином [15].

### **1.1.1 Характеристика мембран эритроцитов**

Эритроцит обладает развитым мембранным комплексом. Мембрана служит барьером проницаемости с повышенной степенью избирательности. Перенос веществ через мембрану совершается в зависимости от их химических свойств различными способами: диффузией, путем проникновения через липидные участки, либо взаимодействуя с встроенными в мембрану белками переносчиками [16].

Мембрана эритроцитов отражает особенности биохимического строения мембран различных тканей, а именно представляет пластичную молекулярную

мозаику, состоящую из белков, липопротеинов и гликопротеинов. В липидном бислое содержатся холестерин, фосфотидилсерин, фосфотидилэтаноламин, фосфотидилхолин, сфингомиелин, цереброзиды и другие липиды. Липиды в мембране эритроцита находятся исключительно в виде бислоя [17].

Белки в эритроцитарной мембране расположены неравномерно. Основная часть мембранных белков располагается на внутренней (цитоплазматической) стороне мембраны и образует сеть филаментов, которая служит для поддержания двояковогнутой формы эритроцита.

Углеводная составляющая эритроцитарных мембран представлена в виде олигосахаридных цепей, ковалентно присоединенных к белкам (гликопротеины) и в меньшей степени к липидам (гликолипиды) и располагающихся на стороне мембраны, контактирующей с цитоплазмой [18].

Фактор целостности мембраны определяется биохимическими процессами. При рассмотрении энзимов основного энергетического процесса в эритроците - гликолиза - в первую очередь, выделяют каталазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Защитная роль каталазы заключается в предотвращении окисления гемоглобина до метгемоглобина, а также предохранении гемоглобина от расщепления под действием перекиси водорода. Сходным эффектом обладает глутатионпероксидаза. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа катализирует реакцию образования НАДФ(Н); последний в свою очередь способствует функционированию глутатионредуктазы, которая регулирует уровень восстановленного глутатиона. Глутатион необходим для нормального протекания реакций гликолиза. Система глутатина рассматривается как буферная, защищающая эритроциты от деструктивного действия окислителей. Нарушение синтеза глутатиона, увеличение его распада, а также нарушение систем регулирования его уровня приводит к гемолизу [19].

Мембрана эритроцита представляет собой сложный комплекс, включающий определенным образом организованные липиды, белки и углеводы, которые формируют наружный, средний и внутренний слои эритроцитарной мембраны [20].

Касаясь пространственного расположения различных химических компонентов эритроцитарной мембраны, следует отметить, что наружный слой образован гликопротеидами с разветвленными комплексами олигосахаридов, которые являются концевыми отделами групповых антигенов крови. Липидным компонентом наружного слоя являются фосфатидилхолин, сфингомиелин и неэстерифицированный холестерин. Липиды наружного слоя мембраны эритроцита играют важную роль в обеспечении постоянства структуры мембраны, избирательности ее проницаемости для различных субстратов и ионов. Вместе с фосфолипидами холестерин регулирует активность мембранно-связанных ферментов путем изменения вязкости мембраны, а также участвует в модификации вторичной структуры ферментов. Молярное отношение холестерин / фосфолипиды в мембранах клеток у человека и многих млекопитающих равно 0,9. Изменение этого соотношения в сторону увеличения наблюдается в пожилом возрасте, а также при некоторых заболеваниях, связанных с нарушением холестеринового обмена [21].

Средний бислой мембраны эритроцита представлен гидрофобными «хвостами» полярных липидов. Липидный бислой обладает выраженной текучестью, которая обеспечивается определенным соотношением между насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами гидрофобной части бислоя. Интегральные белки, к которым относятся ферменты, рецепторы, транспортные белки, обладают активностью только в том случае, если находятся в гидрофобной части бислоя, где они приобретают необходимую для активности пространственную конфигурацию. Поэтому любые изменения в составе липидов эритроцитарной мембраны сопровождаются изменением ее текучести и нарушением работы интегральных белков [22].

Внутренний слой мембраны эритроцита, обращенный к цитоплазме, состоит из белков спектрина и актина. Спектрин является специфическим белком эритроцитов, его гибкие вытянутые молекулы, связываясь с микрофиламентами актина и липидами внутренней поверхности мембраны, формируют своеобразный скелет эритроцита. Небольшой процент липидов во



внутреннем слое мембраны эритроцита представлен фосфатидилэтаноламином и фосфатидилсерином. От наличия спектрина зависит подвижность белков, удерживающих двойной бисой липидов [15].

Одним из важных гликопротеинов является гликофорин, содержащийся как на внешней, так и на внутренней поверхностях мембран эритроцитов. Гликофорин в своем составе содержит большое количество сиаловой кислоты и обладает значительным отрицательным зарядом. В мембране он располагается неравномерно, образует выступающие из мембраны участки, которые являются носителями иммунологических детерминант.

Строение и состояние эритроцитарной мембраны, низкая вязкость нормального гемоглобина обеспечивают значительные пластические свойства эритроцитам, благодаря которым эритроцит легко проходит по капиллярам, имеющим вдвое меньший диаметр, чем сама клетка, и может принимать самые разнообразные формы [23].

### **1.1.2 Проницаемость эритроцитарных мембран**

Создание барьера для прохождения веществ и осуществление избирательного их транспорта в эритроциты, а также перенос кислорода - важнейшие функции эритроцитарных мембран, которые обеспечивают поддержание клеточного гомеостаза в условиях больших различий химического состава цитоплазмы клеток и среды [24].

Проникновение веществ через мембрану может осуществляться с помощью различных механизмов на основе растворимости в липидах в виде пассивной диффузии, облегченной или катализируемой диффузии и активного переноса с затратой энергии [25].

Из-за большой плотности упаковки молекул липидов и наличия в бислое гидрофобной зоны макромолекулы не проникают через него, а низкомолекулярные гидрофильные вещества проникают чрезвычайно медленно.

Медленное проникновение ионов объясняется наличием в порах мембран электрических зарядов. Преобладание положительных или отрицательных зарядов резко изменяет скорость поступления катионов и анионов. Обычно более быстро в клетку поступают катионы. Однако через эритроцитарную мембрану анионы поступают быстрее катионов [17].

Наиболее важной формой прохождения веществ через мембраны является активный перенос, при котором вещества накапливаются в клетках в концентрациях, значительно превышающих их концентрации в окружающей среде. Активный транспорт веществ в эритроциты связан с затратой энергии на разрыв водородных связей, образованных с водой, на поступление против градиента концентрации. Активный перенос происходит с использованием энергии АТФ [16].

### **1.1.3 Сорбционная способность эритроцитов**

Эритроциты участвуют в транспорте аминокислот и полипептидов, регулируют их концентрацию в плазме крови, выполняют роль буферной системы. Постоянство концентрации аминокислот и полипептидов в плазме крови поддерживается с помощью эритроцитов, которые адсорбируют их избыток из плазмы, а затем отдают различным тканям и органам. Таким образом, эритроциты являются подвижным депо аминокислот и полипептидов.

Сорбционная способность эритроцитов связана с состоянием газового режима, в частности, при действии кислорода наблюдаются выход аминокислот из эритроцитов и увеличение их содержания в плазме [25].

Сорбционная способность эритроцитов – это способность сорбировать различные витальные красители, например, метиленовый синий. При воздействии экстремальных факторов на мембрану эритроцитов, сорбционная способность эритроцитов существенно увеличивается [26].

## 1.2 Содержание глюкозы в плазме крови и эритроцитах

Эритроциты - высокоспециализированные клетки, которые переносят кислород от легких к тканям и диоксид углерода, образующийся при метаболизме из тканей к альвеолам легких. В результате дифференцировки эритроциты теряют ядро, рибосомы, митохондрии, эндоплазматический ретикулум. Эти клетки имеют только плазматическую мембрану и цитоплазму. Они не содержат ядра, поэтому неспособны к самовоспроизведению и репарации возникающих в них повреждений. Двояковогнутая форма эритроцитов имеет большую площадь поверхности по сравнению с клетками сферической формы такого же размера. Это облегчает газообмен между клеткой и внеклеточной средой. Вместе с тем такая форма и особенности строения [27].

Метаболизм глюкозы в эритроцитах представлен анаэробным гликолизом и пентозофосфатным путем превращения глюкозы. Эти процессы обуславливают сохранение структуры и функций гемоглобина, целостность клеточной мембраны и образование энергии для работы ионных насосов.

Гликолиз обеспечивает энергией работу транспортных АТФаз, а также протекающие с затратой АТФ гексокиназную и фосфофруктокиназную реакции гликолиза. НАД(Н), образующийся в ходе анаэробного гликолиза, является коферментом метгемоглобинредуктазы, катализирующей восстановление метгемоглобина в гемоглобин. Кроме того, в эритроцитах присутствует фермент бисфосфолицератмутаза, превращающий промежуточный метаболит этого процесса 1,3-бисфосфолицерат в 2,3-бисфосфолицерат. Образующийся только в эритроцитах 2,3-бисфосфолицерат служит важным аллостерическим регулятором связывания кислорода с гемоглобином. На окислительном этапе пентозофосфатного пути превращения глюкозы образуется НАДФ(Н), участвующий в восстановлении глутатиона. Последний используется в антиоксидантной защите эритроцитов [28].

Особенности и значение гликолиза в эритроцитах:

1. Генерация АТФ. АТФ используется для активного транспорта катионов через мембрану, сохранения целостности мембраны и формы эритроцитов [29].

2. В процессе гликолиза генерируется НАДН<sub>2</sub>, который является кофактором метгемоглобинредуктазы - фермента, катализирующего переход мет-Нб в Нб; этот процесс предотвращает накопление метгемоглобина, кофактором лактатдегидрогеназы и поставщиком протонов для супероксиддисмутазной реакции.

3. В процессе гликолиза 1,3-бисфосфолицерат превращается в 2,3-бисфосфолицерат. На этот процесс расходуется 20-25% глюкозы. 2,3-бисфосфолицерат - активная отрицательно заряженная молекула. В эритроцитах периферической крови образует солевую связь с гемоглобином, уменьшает его сродство к кислороду, что обеспечивает переход кислорода в клетки тканей. В капиллярах легких гемоглобин освобождается от 2,3-бисфосфолицерата и приобретает способность акцептировать кислород [29].

### **1.3 Содержание лактата в плазме крови и эритроцитах**

Молочная кислота — продукт анаэробного метаболизма глюкозы, в ходе которого она образуется из пирувата под действием лактатдегидрогеназы. При достаточном поступлении кислорода пируват подвергается метаболизму в митохондриях до воды и углекислоты. В анаэробных условиях, при недостаточном поступлении кислорода, пируват преобразуется в лактат. Основное количество молочной кислоты поступает в кровь из скелетных мышц, мозга и эритроцитов [30].

В норме концентрация лактата в крови очень низкая. В мышцах, эритроцитах, клетках мозга и в других тканях она повышается при недостатке кислорода в клетке либо если первичный путь производства энергии в клетках нарушен.

#### **1.4 Экологическая ситуация в городе Красноярске**

В соответствии с тем, что Красноярск относится к крупным промышленным и транспортным городам, экологическая ситуация города находится в крайне напряжённом состоянии. Кроме того, высокие показатели загрязнения окружающей природы осложняются совокупностью природно-климатических факторов, масштабом и структурой техногенных воздействий на городскую среду [7].

В Красноярске источники загрязнения атмосферы многообразны, а состав выбросов отличается многокомпонентностью. Красноярск относится к городам, характеризующимся сверхвысоким уровнем загрязнения атмосферных слоёв. В городе расположены очень крупные предприятия металлургической, машиностроительной и химической промышленности, оказывающие активное влияние на процессы биогеоценоза и состояние воздушных масс. Показатели суммарного индекса загрязнения атмосферных слоёв города находятся на максимально предельном уровне значения. Основные вещества, создающие очень высокие показатели атмосферного загрязнения, представлены бензапиреном, формальдегидом, взвешенными веществами, диоксидом и оксидом азота [31].

Исходя из данных наблюдения за состоянием загрязнения атмосферного воздуха в Красноярске, можно сделать вывод, что концентрации таких веществ, как формальдегид, оксид углерода, бензол, взвешенные вещества, диоксид и оксид азота наблюдаются в Центральном районе в большем количестве, чем в Академгородке. Атмосферный воздух в районе Академгородка значительно чище, чем в Центральном районе.

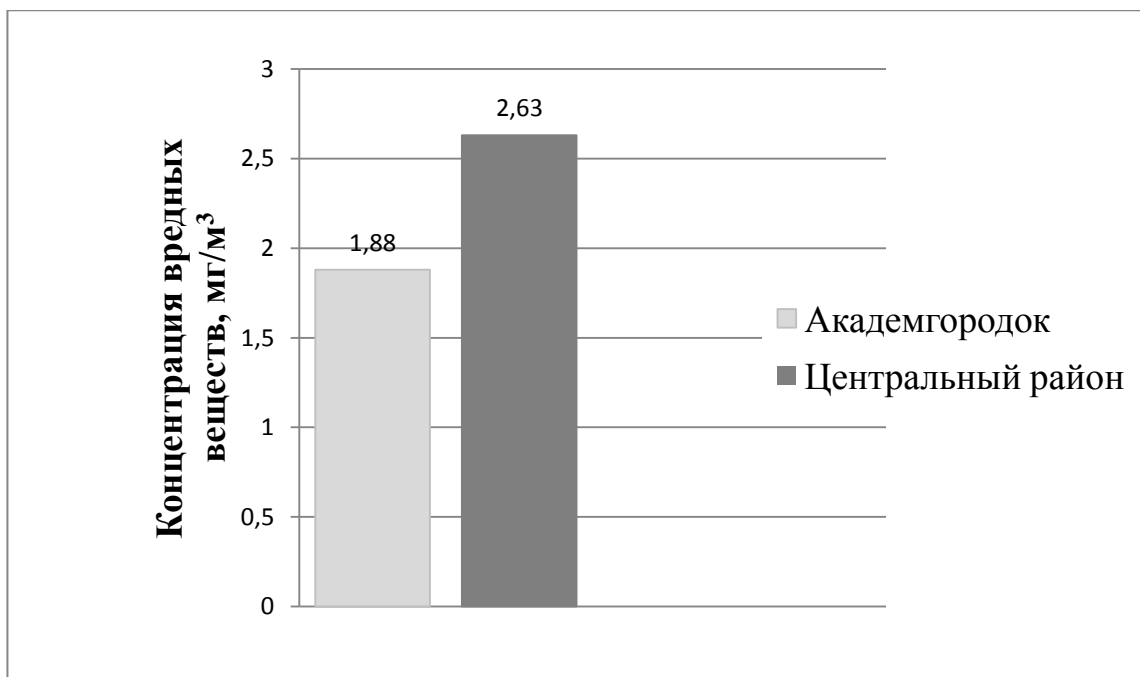


Рисунок 1 - Суммарное содержание вредных веществ в атмосферном воздухе Академгородка и центрального района [7].

### 1.5 Влияние промышленных выбросов на показатели крови

Основными источниками загрязнения атмосферы являются промышленные предприятия. Весомый вклад в загрязнение окружающей среды по неспецифическим ингредиентам вносит автотранспорт, выбросы которого по отдельным веществам сопоставимы с выбросами промышленных предприятий [32].

Именно автотранспорт является основным источником загрязнения окружающей среды свинцом, сажей, формальдегидом, углеводородами, оксидом углерода. Большое количество вредных токсических веществ обнаруживается на территориях жилых микрорайонов возле промышленных предприятий [33,34].

Известно, что загрязнение окружающей среды оказывает негативное влияние на здоровье человека. Значительная часть заболеваний человека связана с ухудшением экологической обстановки в среде обитания [35].

Изменения структуры и характера патологии современных людей во многом связаны с глобальными техногенными преобразованиями и загрязнением окружающей среды [36]. Организм человека, подвергаясь воздействию вредных факторов, вынужден постоянно мобилизовывать свои компенсаторно-приспособительные механизмы, резервы которых ограничены и со временем могут истощаться. В итоге интенсивное и длительное воздействие экологически неблагоприятных факторов окружающей среды может вызывать перенапряжение и срыв адаптационных процессов организма и тем самым способствовать развитию различных патологических состояний человека, которые несут все более выраженные черты экологической обусловленности [37,38].

Последствием промышленных выбросов могут быть существенные морфологические, физические и химические изменения крови [33,39].

При неблагоприятных экологических условиях клетки красной крови подвержены значительному гемолизу. В условиях действия неблагоприятных экологических факторов отмечается значительное изменение структуры эритроцитов, а также нарушение мембран эритроцитов и возникновении их патологических форм [31].

## **1.6 Воздействие токсических веществ на эритроциты**

Механизмом токсического действия называется взаимодействие токсиканта или продуктов его превращения в организме со структурными элементами биосистем, лежащее в основе развивающегося токсического процесса. Чаще в основе токсического действия лежат химические реакции токсиканта с определенным структурным элементом живой системы («рецептором» или «мишенью»). Механизмы токсического действия подавляющего большинства химических веществ в настоящее время неизвестны. Структурными элементами клеток, с которыми взаимодействуют

токсиканты, как правило, являются: белки, нуклеиновые кислоты, липидные элементы биомембран [14,40].

Токсическое действие многих веществ сопряжено с их влиянием на состояние мембранных структур. Мембрана образована двумя слоями молекул липидов, гидрофобные части которых направлены друг к другу, а гидрофильные в сторону окружающей и внутренней среды клетки. Основные группы липидов - фосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, сфингомиелин), гликолипиды, нейтральные липиды (холестерол и т.д.) [41]. Молекулы липидов легко диффундируют в липидных слоях. Обмен молекулами между слоями осуществляется редко. Распределение молекул различного строения между слоями асимметрично. В мембрану встроены белковые молекулы, которые часто пронизывают всю ее толщину, либо погружаются на различную глубину, локализуясь на внешней или внутренней стороне [16]. Углеводный компонент клеточной мембраны представлен главным образом гликопротеинами [37]. Они располагаются на внешней поверхности мембраны. Мембраны различных клеток существенно различаются по своему строению и функциям. Активность ферментов во многом зависит от липидного состава мембран. Изменение их свойств в ответ на стимул являются важнейшим звеном цепи биологических процессов, лежащих в основе формирования реакции организма на внешние и внутренние раздражители. Клеточные мембраны чрезвычайно динамичный элемент. Их строение изменяется в соответствии с условиями окружающей среды и потребностями клетки [36].

Благодаря ненасыщенности углеводородной цепи жирных кислот, фосфолипиды клеточных мембран предрасположены к реакции окисления, инициируемой свободными радикалами, образующимися в клетке [42].

Наиболее вероятным механизмом опосредованного повреждения биологических мембран при интоксикациях является активация перекисного окисления липидов. Существенная активация процесса образования свободных



радикалов при химических воздействиях приводит к усилению перекисного окисления липидов и повреждению биологических мембран [43].

В результате действия многочисленных токсикантов (бензола, толуола, динитробензола, хлороформа, тяжелых металлов и других денатурирующих агентов) может нарушаться проницаемость и структурная целостность мембран, что приводит к деформации, лизису клетки и её гибели. При действии таких веществ на мембраны эритроцитов развивается гемолиз [44].

Имеются данные, что ионы тяжелых металлов вызывают гемолиз эритроцитов. Результаты исследований показали, что гемолиз, вызванный действием металлов, связан с развитием перекисных процессов в мембране. Было предположено, что перекисное окисление мембранных липидов является возможным механизмом повреждения эритроцитарных мембран, и развитие перекисных процессов предшествует гемолизу, вызванному ионами тяжелых металлов. Окислительная модификация увеличивает хрупкость мембран эритроцитов [45].

Таким образом, в основе токсического действия веществ лежит повреждение клеток, сопровождающееся их функциональными, либо структурно-функциональными изменениями.

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Объект исследований**

В процессе работы обследовано 29 женщин в возрасте от 20 до 25 лет: четырнадцать женщин, проживающих в Центральном районе города Красноярска, в качестве контроля обследовано пятнадцать женщин, проживающих и работающих в районе Академгородка. Женщины группы контроля не имели контакта с химическими соединениями.

Предусмотрен опрос по анкете с указанием места жительства, места работы, хронических заболеваний. Преимущественно для обследования отбирались горожане, место жительства и место работы которых находилось в пределах изучаемого района.

К моменту забора крови все обследованные были признаны здоровыми и не имели отягощенного аллергологического анамнеза. С целью исключения сезонных и суточных колебаний иммунологических параметров обследование проводилось с октября по апрель, натощак, утром с 8 до 9 часов. В качестве антикоагулянта использовали гепарин.

### **2.2 Методы исследования**

#### **2.2.1 Подсчет количества эритроцитов электрокалориметрическим способом**

В сухую пробирку переносят 8 мл 3,5% раствора NaCl, с последующим добавлением 20 мкл крови.

Затем производят измерение оптической плотности на ФЭКе при красном светофильтре в кювете толщиной 3 мм, с предварительным выставлением на ноль по разводящему раствору. Показания снимаются по левой красной шкале [11].

В норме содержание эритроцитов у женщин составляет  $3,9-4,5 \times 10^{12}$  кл/л.

### **2.2.2 Определение содержания гемоглобина**

Для определения гемоглобина используется гемоглобинцианидный метод. Принцип метода состоит в том, что к крови добавляется специальный трансформирующий раствор, содержащий сильный окислитель (цианид), при взаимодействии с которым эритроциты разрушаются, гемоглобин выходит в раствор и образует окрашенное соединение гемоглобинцианид. Интенсивность окраски пропорциональна количеству гемоглобина и фиксируется на ФЭКе или спектрофотометре [11].

В пробирку пипеткой переносят 5 мл трансформирующего раствора. Добавляют 20 мкл крови. Раствор крови в трансформирующем растворе аккуратно, но тщательно перемешивают и оставляют на 10-15 мин при комнатной температуре для полного развития окраски (раствор остается стабильным в течение более 24 ч). Таким же образом подготавливают пробу со стандартным раствором гемоглобина: 5 мл трансформирующего раствора и 20 мкл стандартного раствора гемоглобина (120 г/л).

Далее производят измерение оптической плотности на ФЭКе опытной и стандартной проб при длине волны 520-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете толщиной 10 мм. Предварительно выставляют ноль по трансформирующему раствору [47].

В норме содержание гемоглобина составляет 120-140 г/л.

### **2.2.3 Расчет среднего содержания гемоглобина в одном эритроците и цветного показателя крови**

Расчетные показатели среднего содержания гемоглобина в одном эритроците и цветного показателя крови называются индексами красной крови и используются для выводов о насыщенности эритроцитов гемоглобином.

Расчет среднего содержания гемоглобина в одном эритроците производится делением количества гемоглобина (г/л) на число эритроцитов (кл/л).

В норме содержание гемоглобина в одном эритроците колеблется между 27 и 33 пг.

Число 33 пг в одном эритроците принято за цветной показатель равный единице. Расчет цветного показателя крови производится из соотношения содержания эритроцитов в норме и эритроцитов испытуемого к содержанию гемоглобина в норме и гемоглобина испытуемого [11].

#### **2.2.4 Определение концентрации глюкозы в плазме крови и эритроцитах**

Определение концентрации глюкозы проводится с помощью реагентов, произведенных АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн».

Принцип метода:

1. Глюкоза + АТФ + гексокиназа → Глюкоза-6-фосфат + АДФ;
  2. Глюкоза-6-фосфат + НАД + г6ф-дг → глюконат-6-фосфат + НАДН + Н<sup>+</sup>
- Величина абсорбции пропорциональна концентрации глюкозы в пробе.

Для определения содержания глюкозы в плазме крови необходимо в опытную пробу добавить рабочий реагент, содержащий буфер, рН 7,8 и лиофилизат (Гексокиназа, Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, АТФ, НАД), с последующим добавлением образца.

Калибровочная проба содержит тот же рабочий реагент и калибровочный раствор.

Холостая проба содержит только рабочий реагент.

Пробы инкубируются 5 минут при температуре 18-25°C, после чего фотометрируются при длине волны: 340 нм. против холостой пробы. Затем производятся расчеты.

Нормальные величины: сыворотка (плазма): 4,2-6,1 ммоль/л,

## 2.2.5 Определение проницаемости эритроцитарных мембран

Проницаемость эритроцитарных мембран определяется по методике В.Н.Колмакова. Сущность этой методики состоит в том, что проницаемость эритроцитов определяется по степени их гемолиза в изотоническом растворе мочевины.

Степень гемолиза оценивается по изменению оптической плотности взвеси эритроцитов при красном светофильтре. Момент прекращения изменений оптической плотности взвеси считали окончанием процесса гемолиза. Время от момента добавления взвеси эритроцитов до прекращения гемолиза определяли как время гемолиза - величина, обратно пропорциональная проницаемости эритроцитов.

В физиологических условиях клеточные мембраны практически непроницаемы для мочевины. Механизм гемолитического действия заключается в быстром проникновении мочевины в клетку через повреждённую мембрану с последующим формированием её внутриклеточной гипертонической концентрации, что ведёт к перемещению в эритроциты воды, их набуханию и разрушению.

Готовят взвесь эритроцитов путём смешивания одного объёма упакованных клеток с двумя объёмами физиологического раствора.

В семь пробирок разливают по 5 мл рабочих растворов, приготовленных путём смешивания раствора мочевины и физиологического раствора в разных концентрациях: 0.72%, 0.81%, 0.9%, 0.99%, 1.08%, 1.17%, 1.8%.

Затем в каждую пробирку добавляют по 100 мкл приготовленной взвеси эритроцитов. Содержимое пробирок инкубируют при комнатной температуре в течение 3 мин, а затем центрифугировать 10 мин при 1700g. Оптическую плотность супернатантов определяют фотометрически, при длине волны 400 нм против физиологического раствора. Осмотическую стойкость во всех растворах выражают в процентах от эталона (1,8%-ного раствора мочевины), что и принято считать показателем проницаемости эритроцитарных мембран [49].

### **2.2.6 Определение сорбционной способности эритроцитов**

Сорбционная способность эритроцитов – это способность сорбировать различные витальные красители, например метиленовый синий. При воздействии экстремальных факторов на мембрану эритроцитов сорбционная способность существенно увеличивается.

Принцип метода определения сорбционной способности основан на измерении оптической плотности не связавшейся с эритроцитами метиленовой сини в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии клеток с красителем.

К 1 мл упакованных эритроцитов приливают 3 мл раствора красителя метиленового синего. Пробу инкубируют при комнатной температуре 10 минут, затем центрифугируют 10 минут при 1700g. Надосадочную жидкость переносят в кювету с толщиной слоя 0,5 см. Оптическую плотность определяют при длине волны 670 нм, против физиологического раствора [48,49].

### **2.2.7 Определение концентрации лактата в плазме крови и эритроцитах**

Определение содержания молочной кислоты в образцах проводят с помощью наборов реагентов для определения концентрации лактата в биологических жидкостях энзиматическим колориметрическим методом, 5x10 мл. АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Состав набора: 1. Реагент 1 - буфер, рН 7,5. 2.

Реагент 2 - лиофилизат.

3. Реагент 3 - кислота перхлорная 3,3%.

4. Реагент 4 - калибратор: молочная к-та 3,3 ммоль/л (30 мг/100 мл).

Чувствительность не более 0,3 ммоль/л, линейность 13,3 ммоль/л (120,9 мг/100мл) коэффициент вариации не более 5%, время реакции - 5 мин.,

Измерения производят при длине волны 505 нм (490-520 нм, ФЭК - 490 нм) после инкубации при температуре 18-25С, фотометрирование производят против холостой пробы.

### **2.2.8 Статистические методы исследования**

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MS Excel была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакетов прикладных программ SPSS 8,0 и “Statistica 8,0” производился статистический анализ. Для всех данных определяли медиану (Me) и интерквартильный разброс в виде подсчета 25- (C25) и 75-перцентилей (C75). Проверку гипотезы о статистической достоверности двух выборок проводили непараметрическим методом с помощью критерия Манна-Уитни [50]. Результаты статистической обработки сведены в таблицы.

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СОЭ – скорость оседания эритроцитов;

АТФ – аденозинтрифосфат;

НАД – никотинамидадениндинуклеотид;

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;

ФЭК – фотоэлектроколориметр;

ССЭ – сорбционная способность эритроцитов;

ПЭМ – проницаемость эритроцитарных мембран.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Волкова, С.А. Основы клинической гематологии: Учебное пособие / С.А. Волкова. – Москва, 2013. – 53-64с.
2. Михайлов И. Б. Клиническая фармакология / И.Б. Михайлов.- СПб.: Фолиант, 1999.-315с.
3. Anuradha, C.D. Oxidative Damage to Mitochondria Is a Preliminary Step to Caspase-3 Activation in Fluoride-Induced Apoptosis in HL-60 Cells / C.D. Anuradha, S. Kanno, S. Hirano // Free Radic. Biol. Med.- 2001. – 54-57 с.
4. Kotak, S. Complexity of the Heat Stress Response in Plants / S. Kotak, J. Larkindale et al. // Curr. Opin. Plant Biol.- 2007. – 89-90 с.
5. Reape, T.J. Apoptotic-Like Regulation of Programmed Cell Death in Plants / T.J. Reape, P.F. McCabe // Apoptosis.- 2010. -12 с.
6. Wald, N. Occupational exposure to hydrazine and subsequent risk of cancer / N. Wald, J. Boreham et al. // Br. J. Ind. Med. - 1984. - № 41. - P. 31-34.
7. Горбачев, В.Н. Мониторинг земель Красноярска и его пригородной зоны / В.Н. Горбачев, Р.М. Бабинцева, Г.А. Демиденко. – Красноярск : Гомеостаз лесных экосистем, 2001. - 28-33с.
8. Вронский, В.А. Экология и здоровье населения промышленных городов / В.А. Вронский, И.Н. Саламаха // Экология человека.- 2002. – С. 239.
9. Северин, Е.С. Биохимия с упражнениями и задачами: учебник / Северин Е.С. [и др.]; под ред. Е.С. Северина.- 2010. - 384 с.
10. Берёзов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Берёзов, Б.Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 1998.-704с.
11. Оценка структурно-функционального состояния клетки: методические указания / Н.М. Титова, Т.Н. Замай [и др.]. - Красноярск, 2009.-369 с.
12. Коницев, А.С. Биохимия и молекулярная биология: словарь терминов / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова.- Москва: ДРОФА, 2008. – 98 с.


13. Данилова, Л. А. Анализы крови и мочи. - СПб.: Салит-Медкнига, 2000. – 128 с.
14. Клиническая биохимия: учебное пособие для студентов медицинских вузов / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, И.В. Завгородний. - М.: Триада-Х, 2002. - 504 с.
15. Маршалл, В.Дж. Клиническая биохимия: пер. с англ. - М.; СПб.: БИНОМ; Невский Диалект, 2000. - 368 с.
16. Steinhoff, D. The question of carcinogenic effects of hydrazine / D. Steinhoff, U. Mohr // Exp. Pathol. - 1988. - Vol. 33, № 3. - P. 133-43.
17. Димитриев, Д.А. Современные методы изучения влияния загрязнения окружающей среды на иммунную систему / Д.А. Димитриев, Е.Г. Румянцева // Гигиена и санитария.-2002.-№5.-68-71с.
18. Колмаков, В.Н., Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран в диагностике хронических заболеваний печени / В.Н. Колмаков, В.Г. Радченко // Терапевтический архив. — 1982. — № 2. — 22-24 с.
19. Тогайбаев, А.К. Гемосорбция при неотложных состояниях / А.К. Тогайбаев, А.В. Кургузкин. — Алма-Ата, 1988. —51-54 с.
20. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Е. С. Северина. — 5-е изд., испр. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. — 768 с.
21. Березов, Т. Т. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учеб. / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. — 3-е изд., стереотип. — М.: ОАО Изд-во:Медицина, 2008. — 704 с.
22. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия/ Н.А Тюкавкина, Ю.И Бауков, С.Э. Зурабян.– М.: ДРОФА, 2014. – 78 с.
23. Попков, В.А.Общая химия /В.А.Попков. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009.-976 с.
24. Сторожок, С.А. Зависимость стабильности деформабельности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета / С.А. Сторожок, А.Г. Санников, А.В. Белкин // Научный вестник ТГУ.- 2009.- №3.- 3-10 с.

25. Михайлович, В.А. Проницаемость эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов — оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации / В.А. Михайлович, В.Е. Марусанов [и др.] // Анестезиология и реаниматология. — 1993. — № 5. — 66-69 с.
26. Ерюхин, И.А. Эндотоксикоз как проблема клинической хирургии / И.А. Ерюхин и др. // Вестник хирургии им. Грекова. — 1989. — № 3. — 3-7 с.
27. Бокуть, С.Б. Биохимия филогенеза и онтогенеза: учеб. пособие / С.Б. Бокуть, А.А. Чиркин, Е.О. Данченко; под общ. ред. А.А. Чиркин. - М.: НИЦ ИНФРА-М, Нов. знание, 2012. - 288 с.
28. Ершов, Ю.А. Биохимия человека: учебник для академического бакалавриата / Ю.А. Ершов. - Люберцы: Юрайт, 2016. - 374 с.
29. Новокшанова, А.Л. Биохимия для технологов; учебник и практикум для академического бакалавриата / А.Л. Новокшанова. - Люберцы: Юрайт, 2015. - 508 с.
30. Михайлов, С.С. Спортивная биохимия; учебник для вузов и колледжей физической культуры / С.С. Михайлов. - М.: Сов. спорт, 2012. - 348 с.
31. Иванова С.В. Влияние химических веществ, загрязняющих атмосферный воздух городов, на здоровье / С.В. Иванова // Гигиена и санитария.-2004.-№11-13с.
32. Гейнце, В.В. Экологический аспект проблемы альтернативного связующего в производстве первичного алюминия / В.В. Гейнце, И.И. Ребрик, М.Ю. Угай - Проблемы экологии и развития городов: сб. статей по материалам 2-ой Всероссийской конференции.-Красноярск, 2001.-Т.2.-188-192с.
33. Bourne, Geoffrey Howard Dietary research and guidance in health and disease.- 1986. — 12 с.
34. American Chemical Society Sodium fluoride, Molecule of the week.- 2008. — 32 с.
35. Bhide, S.V. Lung tumour incidence in mice treated with hidrazine sulfate / S.V. Bhide, DçSouza R. A., Saway M.M., Ranadive K. J.// Int. J. Cancer. - 1976. - №18. - P. 530-535.

36. Efroymson, R.A. Ecological risk assessment of multimedia hazardous air pollutants: estimating exposure and effects / R.A. Efroymson, Murphy D.L. // *Sci. Total Environ.* - 2001. - Vol. 274, № 1-3. - P. 219-230.
37. Тихомирова И.А. Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов: автореф. дис. ...докт. наук / И.А. Тихомирова – Ярославль, 2006. – 48 с.
38. Ansell, A. D. Occurrence of Haemocoelic Erythrocytes containing Haemoglobin in a Wood Boring Mollusc / A. D. Ansell *Nature* 217 (5126): 357-357 с.
39. Игамбердиев, В.М. Методологические аспекты оценки воздействия загрязнений на экосистемы/В.М. Игамбердиев // *Экология человека.*-1994.-№2. – 147 с.
40. Lominadze, D. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation / D. Lominadze, W.L. Dean // *FEBS Letters.* -2002. -V/ 517, Issue 1, P. 41-44.
41. Bleich, M. Effects of the carcinogen dimethylhydrazine (DMH) on the function of rat colonic crypts / M. Bleich, M. Ecke, M. Schwartz // *Pflugers Archiv.* - 1996. - Vol. 433, №3. - P. 254-259.
42. Saric, M. Health effects studies related to occupational and environmental exposure / M. Saric // *Arh Hig Rada Toksikol.* - 1999. - Vol. 50, № 3. - P. 309-326.
43. Renz-Polster, H. *Basislehrbuch Innere Medizin* / H. Renz-Polster, S. Krautzig, J. Braun // 3. Auflage 2005. – 54 с.
44. Hess, E.V. Environmental chemicals and autoimmune disease: cause and effects *Toxicology* / E.V. Hess. - 2002. - Vol. 27. - P. 65-70, 181-182.
45. Klein, Cornelis / Hurlbut, Cornelius, Searle Dana, James Dwight / 1999. - 18 с.
46. Игамбердиев, В.М. Методологические аспекты оценки воздействия загрязнений на экосистемы / В.М. Игамбердиев // *Экология человека.*-1994.-№2.-5-11с.



47. Miller, G.W. The Effect of Fluoride on Higher Plants with Special Emphasis on Early Physiological and Biochemical Disorders / G.W. Miller // Fluoride. 1993. – 7-8 с.
48. Маймистова, А.А. Изменение агрегации и деформируемости эритроцитов при активации внутриклеточных сигнальных путей / А.А. Маймистова [и др.] // Ярославский педагогический вестник.- 2010.- № 3–71-74 с.
49. Глушков, В.С Модификация структуры мембран клеток крови как модулятор изменения проницаемости мембран для АДФ при их сдвиговой деформации / В.С. Глушков, С.А. Сторожок, А.М. Петровец // Известия Челябинского научного центра.- 2004.- Вып. 1 (22).- 225-230 с.
50. Зверев, А.А. Статистические методы в биологии: учеб. пособие / А.А. Зверев, Т.Л. Зефирова. -Казань, КФУ.-2013.-42 с.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
  
подпись Е.И. Шишацкая  
« 23 » июня 2017 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**  
06.03.01 – Биология

Функциональное состояние мембран эритроцитов лиц, проживающих в  
различных районах города Красноярска

Руководитель	 подпись, дата	доцент, к.б.н.	<u>Ю.С. Аكوпова</u>
Выпускник	 подпись, дата	должность, ученая степень	<u>А.А. Чигринская</u>

Красноярск 2017