

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАЗОВОГО АНАЛИЗА ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ БИОМОНИТОРИНГА ЗДОРОВЬЯ РАБОТНИКОВ БИОПРОМЫШЛЕННОСТИ

С. С. ОГАНЕСЯН, А. Г. АГАМАЛЯН, Н. И. ГЭРАЯН,
П. М. МАРТИРОСЯН, А. С. АРАКЕЛЯН

Институт кардиологии им. Оганесяна МЗ Армении
Ереванский витаминный завод

Проведен фазовый анализ кинетики гемолиза эритроцитов работников различных цехов и отделений Ереванского витаминного завода. Показана возможность использования этого метода в качестве биомониторинга действия условий производства. Наибольшая чувствительность наблюдалась при анализе параметрон кислотного гемолиза и частности, остаточного светопронускания.

Կատարված է երևանի վիտամինի գործարանի տարբեր ցехերի և բաժան. մզկետների աշխատողների էրիթրոցիտների հեմոլիզի կինետիկայի ֆազային վերլուծություն: Ցույց է արված այդ մեթոդի օգտագործման Կենսաբանական արվեստագրության պայմանների ներգործության բիոմոնիթորինգ: Ամենա-բարձր զգայունություն է նկատվել թթվային հեմոլիզի պարամետրերի անալիզի, մասնավորապես մնացորդային լուսանցման ժամանակ:

The phase analysis of kinetics of hemolysis of erythrocytes of the Yerevan vitamin factory workers of different shops and departments is realized. The possibility of using this method as an action of conditions of industry has been shown. The sensibility was mostly observed in analysis of acid hemolysis, specifically remaining lightening.

Гемолиз эритроцитов—иммуноглобулин А—биомониторинг.

Решение проблем медицинской экологии тесно связано с разработкой способов выявления ранних изменений в организме человека. С этой целью необходимо внедрение высокоспецифичных, чувствительных методов биомониторинга, которые доступны для массовых исследований. Их поиск диктуется ограниченностью и недостаточностью информации, получаемой в результате определения в окружающей среде концентрации промышленных отходов, продуктов сгорания и других атмосферных выбросов. Прямое определение указанных ксенобиотов в организме затруднено не только из-за отсутствия простых методов их количественной оценки, но и разнкой скорости метаболизирования, накопления в тканях и биологических жидкостях или из-за нерастворимости их

в водных средах. Предлагаемые методы биомониторинга должны обладать селективностью, а также давать информацию о состоянии тех или иных звеньев в организме, которые испытывают действие вредных факторов. В этом случае могут быть обнаружены ранние изменения, когда клинические признаки отравления или заболевания не выражены, а возникшие нарушения легко обратимы [16]. Такое состояние организма, названное пограничным, характеризует ситуацию, когда он находится на грани нормы и патологии [3].

Исходя из этих положений и теории «мишеней» для описания действия биологически активных соединений на организм в качестве объекта биомониторинга, мы выбрали мембрану красных кровяных клеток — эритроцитов. Клеточные мембраны — первый барьер в организме, с которым взаимодействуют химические соединения, способные модифицировать липидный матрикс и белки эритроцитарной мембраны и влиять на ее физико-химические свойства, в частности, на гемолиз [5, 9]. Кроме того, по изменению устойчивости эритроцитов к гемолизу можно судить о выбросе в кровяное русло новых порций «молодых» эритроцитов с высокой мембранной устойчивостью. Литературные сведения указывают также на возможность влияния факторов биотехнологического и других видов производства на физико-химические свойства крови, иммунореактивность и ход адаптационных реакций со стороны кроветворных органов [2, 4, 5, 8, 13, 14].

Для количественной оценки процесса разрушения клеточной мембраны использован фазовый анализ кинетики процесса гемолиза эритроцитов работников на различных производственных участках витаминного завода, где рабочие контактируют с разными комплексами химических веществ, с целью дифференциации их действия на организм человека.

Материал и методика. Наблюдения проведены у 91 работника Ереванского витаминного завода в возрасте 18—60 лет, обоих полов, в течение 1989 г. С целью проведения фазового анализа хода гемолиза эритроцитов был использован модифицированный нами способ автоматической непрерывной регистрации изменений светопоглощения гемолизата [1]. Сравнивали два типа гемолиза — осмотический и кислотный.

Кровь в объеме 100 мкл, взятую из пальца, быстро вносили в пробирку с 900 мкл разбавленного раствора, содержащего 0,9% NaCl, 15 мМ Трис-HCl буфер (pH 7,4) и 10 мкл гепарина. Пробу использовали в течение 2—3 часов, при комнатной температуре.

Осмотический гемолиз эритроцитов проводили следующим образом. Пробу крови разбавляли в 0,225% NaCl, содержащего 15 мМ Трис-HCl буфер (pH 7,4). Гемолиз шел в термостатированной ячейке фотокалориметра с постоянным перемешиванием при $t = 25 \pm 0,2^\circ \text{C}$ [1].

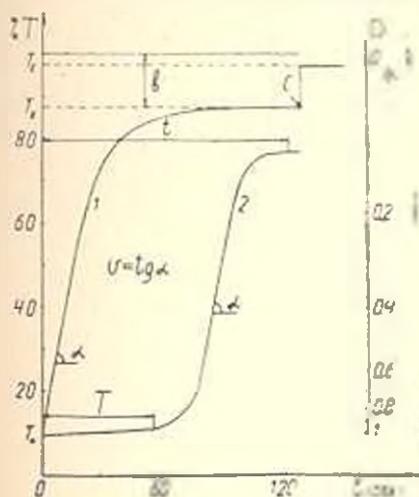
Кислотный гемолиз проводили снижением pH до 2,1, изменение светопоглощения регистрировали на спектрофотометре «Спекорд-М40» при длине волны 740 нм, что позволяло учитывать вклад поглощения выщелоченного из клеток гемоглобина на ход регистрации процесса [2].

Перед приготовлением проб подсчитывали количество эритроцитов в единице объема в свете фазового контраста на микроскопе «Люмам РЗ» с использованием камеры Горяева. Исследуемые пробы содержали одинаковое количество эритроцитов — 10 млн/мл. Эта концентрация клеток оптимальна, т.к. увеличение их числа ведет к нарушению линейной зависимости оптической плотности суспензии от количества кле-

ток, а уменьшение—увеличивает ошибку измерения, и на ход гемолиза начинает оказывать влияние изменение формы эритроцитов в процессе гемолиза.

Были определены следующие параметры процесса гемолиза эритроцитов: 1—общая длительность в сек; b —остаточное светопропускание после окончания гемолиза в %; T —скорость гемолиза на прямолинейном участке кривой изменения светопропускания в %/сек; T_0 —«лаг»-фаза скрытого времени до начала гемолиза после окисления среды эритроцитов в сек.

На рис. представлены кривые осмотического и кислотного гемолиза, полученные автоматической регистрацией изменения светопропускания проб крови.



Расчет параметров кинетики осмотического (1) и кислотного (2) гемолиза эритроцитов по кривым автоматической регистрации. T —конечное светопропускание после гемолиза; T_0 —светопропускание после добавки солиниа, вызывающего 100%-ное разрушение эритроцитов.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены данные о качественном составе химических соединений на отдельных участках производства. Однако не сделано сопоставление полученных результатов с количественным содержанием этих соединений в воздухе, что составляет предмет специального исследования и не входит в задачу настоящей работы.

Анализ кинетических параметров гемолиза эритроцитов табл. 2 показывает, что величина b является достаточно четким индикатором неоднозначного влияния состава химических соединений на организм работников разных участков. Увеличение этого показателя указывает на повышение устойчивости эритроцитов к гемолизу, одной из причин которого является выброс более устойчивых, молодых эритроцитов в кровь. Особенно четко выявляется разница при использовании метода кислотного гемолиза. Отметим, что его ход отличается не только наличием «лаг»-фазы, которая обусловлена преднарушением мембраны, ее липидных компонентов, но и характеризуется замедленным разрушением эритроцитов. Это позволяет более широко использовать кислотный гемолиз при исследовании состояния эритроцитов как биотеста.

Скорость реакции кислотного гемолиза (v) в два раза ниже, чем осмотического, а длительность процесса соответственно в два раза больше. Менее интенсивное разрушение эритроцитов при кислотном гемолизе способствует более тонкой сортировке эритроцитов с разной устойчивостью, и этот способ может быть применен для изучения действия ксенобиотиков на отдельные компоненты мембраны при биомониторинге *in vitro*. Разница в величине b достаточно большая для кислотного ге-

Таблица 1. Химические соединения и факторы, воздействующие на работников витаминного завода в процессе производства

Названия цехов и отделов производства								
Отдел получения диациетонсорбозы	Отдел электрохимического окисления диациетонсорбозы	Отдел получения технической аскорбиновой кислоты	Отдел получения медицинской аскорбиновой кислоты	Отдел фрактовки аскорбиновой кислоты	Лаборатория цеха аскорбиновой кислоты	Машинеротехн. персонал и мех. служба цеха аскорбиновой кислоты	Производство витамина К	Производство витамина Д
Ацетон, серная кислота, едкий натрий	едкий натрий	хлороформ, ацетон, соляная к-та, этиловый спирт, вибрация	этиловый спирт	пыль питательная	хлороформ, ацетон, этиловый спирт, соляная и серная кислоты, едкий натрий	ацетон, хлороформ, этиловый спирт, кислоты, едкий натрий	серная и азотная кислоты, толуол, гидросульфит натрия, искусственный ангидрид, искусственная кислота, едкий калий, аммиачная вода	толуол, ацетон, четыреххлористый углерод, пинидин, кетолон, бензол, хлористый, либроминтин, этиловый и метиловый спирты.

Т а б л и ц а 2. Параметры кинетики гемолиза эритроцитов работников Ереванского витаминного завода и НИИ кардиологии МЗ Арм^ю — контрольная группа (M±m)

Наименование отделов и цехов	Число исследо- ванных	Осмотический гемолиз			Кислотный гемолиз			
		v	l	b	v	To	l	b
Отдел диакетонсорбозы	12	4.57±0.29	83.25±4.58	7.60±0.45	1.87±0.22	84.73±7.55	176.82±17.74	11.3 ±2.10*
Отдел гехнического витамина С	6	4.33±0.33	83.53±4.95	8.33±0.74	1.75±0.39	90.33±13.93	189.33±3.24	13.63±3.82*
Отдел медицинского витамина С	8	4.56±0.23	74.93±2.91	6.88±0.43	1.82±0.22	87.63±7.65	175±17.42	8.20±2.54
Лаборатория цеха витамина С	13	4.69±0.16*	77.71±2.43	7.13±0.34	1.99±0.19*	98.08±8.41	173.23±15.29	10.52±2.26*
Отдел электрохимии	4	4.43±0.81	87.95±12.77	8.31±1.24	2.01±0.43	82.59±12.53	174.75±32.17	11.78±4.31
Отдел фасовки витамина С	3	4.63±0.56	81.33±5.46	8.58±0.58	2.15±0.03*	75.45±0.99	148.33±7.12*	8.46±3.24
ИТР и механическая служба цеха витамина С	15	4.3 ±0.19	86.76±3.10*	8.12±0.39	2.05±0.15*	77.95±2.40	150.05±4.12*	9.21±1.00*
Цех витамина E	16	4.18±0.11	78.94±1.79	8.07±0.29	1.79±0.07	89.61±1.54*	177.69±2.49	6.33±0.69
Цех витамина D ₂	14	3.94±0.18	85.36±5.04	8.16±0.52	1.77±0.7	83.25±1.72	183.36±4.64	7.28±0.67
Контрольная группа	12	4.28±0.23	76.96±5.53	7.73±0.7	1.67±0.11	81.01±2.79	178.32±9.27	5.58±1.31

* — данные, достоверно отличающиеся от контроля (P<0.05)

молиза и составляет $9,5 \pm 2,2\%$ Т, для осмотического же — $6,9 \pm 0,3\%$ Т.

Сравнение величин различных кинетических параметров гемолиза эритроцитов работников завода и контрольной группы показывает, что между этими группами существенной достоверной разницы в скорости и длительности процесса осмотического гемолиза нет. Достоверна лишь разница в величине b . При кислотном же гемолизе обнаруживается существенная разница как в скорости гемолиза (v), длительности «лаг»-фазы (T_0), так и в величине остаточного светопропускания (b). Общая длительность гемолиза (t) существенно отличается от таковой контрольной группы.

Рассматривая результаты измерения величины b кислотного гемолиза эритроцитов у работников различных участков производства можно увидеть следующее. У работников отдела изготовления технической аскорбиновой кислоты и диасетонсорбозы величина b значительно больше и составляет соответственно $13,6 \pm 3,8\%$ Т и $11,3 \pm 2,1\%$ Т, тогда как в контрольной группе (сотрудники Института кардиологии) она составляет $5,5 \pm 1,3\%$ Т ($p < 0,05$). Значительный рост величины b наблюдается у работников участка электрохимии, лаборатории и цеха витамина С (табл. 1). У работников, занятых на производстве витамина Е, наблюдается лишь небольшое повышение значения ($p > 0,05$). С точки зрения оценки теста кислотного гемолиза весьма важно, что увеличение параметра b сопровождается достоверными изменениями скорости кислотного гемолиза, а «лаг»-фаза характеризуется тенденцией к уменьшению. Изменение в величине не всегда строго совпадает с изменением длительности гемолиза.

Таким образом, наблюдаемые у работников производства витамина С изменения b и v указывают на приспособительное повышение содержания молодых эритроцитов в крови с повышенной устойчивостью к кислотному гемолизу. Это, возможно, связано со стимулирующим действием как витамина С, так и некоторых органических химических соединений на кроветворные органы. Известно, что увеличение содержания этого витамина в организме ведет к индукции в печени ферментов биотрансформации аскорбиновой кислоты, продукты которой могут иметь стимулирующее действие на иммунореактивность и сопротивляемость организма [6, 12]. Учитывая тот факт, что на участках производства витамина D_3 не наблюдается существенного изменения указанных кинетических параметров гемолиза эритроцитов, следует заключить, что данный состав органических соединений в условиях производства не отражается на выбросе молодых эритроцитов. Дополнительный выброс молодых эритроцитов в кровь должен быть обусловлен вдыханием пыли витамина С, несмотря на использование респираторов. Аскорбиновая кислота, попавшая в организм через дыхательные пути, уже через несколько дней утилизируется организмом и метаболизируется, так как в моче она не обнаруживается [10]. Именно эти метаболиты, вероятно, способствуют выбросу новых эритроцитов, цикл жизни которых, как хорошо известно, составляет около 120 дней. В этом случае «защитное» действие витамина С может выражаться в значительном изменении

максимальной скорости и длительности процесса гемолиза, ибо эти параметры определяются частью эритроцитов «старой» популяции. В то же время рост величины говорит в пользу сохранения интактных, гемолитически устойчивых популяций молодых эритроцитов, выбрасываемых в кровяное русло.

Таким образом, измерение кинетических параметров кислотного гемолиза может быть предложено как чувствительный метод биомониторинга состояния системы красной крови у работников биопромышленности. Метод прост и может быть применен для массовых исследований. Весь процесс длится несколько минут, требует 0,1 мл крови из пальца испытуемого. Поэтому он может быть использован на рабочем месте. Перспективность этого способа биомониторинга еще и в том, что можно провести исследования также для характеристики изменения чувствительности мембран эритроцитов к различным ксенобиотам с целью определения зависимости доза—эффект. Полученная таким образом информация важна для оценки пограничного состояния организма, когда при отсутствии видимых отклонений в состоянии здоровья человека может меняться реактивность эритроцитов к тем или иным воздействиям. В этом случае особое значение имеет более точное и четкое определение понятия индивидуальной чувствительности группы людей отдельных профессий к колебаниям концентрации ксенобиотов в окружающей среде. Такой подход значительно дополнит и изменит наше понимание о допустимых дозах, пока основанное на грубых методах биомониторинга. В настоящее время авторы работают над развитием этого подхода, а также в направлении изучения возможности оценки изменения кинетических параметров гемолиза эритроцитов в зависимости от количественного содержания биологически активных соединений в окружающей среде на разных участках производства витаминной. Использование кислотного гемолиза эритроцитов позволяет также изучать изменения чувствительности мембраны к различным биологически активным веществам естественного и искусственного происхождения. Такой подход поможет выбрать биотест глобального ответа организма и характеристики индивидуальной химической чувствительности в условиях воздействия вредных факторов среды, а также для оценки степени риска заболевания [7, 11, 15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Агамалян А. Г., Оганесян С. С. Космическая биология, 6, 60—62, 1983.
2. Агамалян А. Г. Автореферат канд. дисс., Ереван, 1988.
3. Баевский Р. М. Прогнозирование состояний на грани нормы и патологии, М., 1979.
4. Коверова Н. И. Тез. докл. VI Всесоюз. конф. по эколог. физиологии, 3, 215, Суктышкар, 1982.
5. Михайлов В. Ф., Тариканова М. И. Бюлл. экспер. биол. и мед., 90, 9, 375—377, 1980.
6. Палецкий К. Д. Вопросы питания, 6, 3—7, 1986.
7. Раннее выявление профессиональных болезней. Всемирный организация здравоохранения. Женева, 1988.

8. Сайкина Н. Н., Алексеева В. М. Сб. Общие проблемы экологической физиологии. Тез. докл. VI Всесоюзн. конф. по эколог. физиологии. 1, 115, Сыктывкар, 1982.
9. Сидоров Е. П., Молькара А. А., Айдаралиев А. А., Ли В. С., Анисимов М. М., Попов А. В., Антонов В. Ф. Сб.: I Всесоюзн. биофизич. съезд. Тез. докл. стендовых сообщений. 1, 214, М., 1982.
10. Чаговец Р. В., Кузнецов Л. Н., Лахно Е. Б., Рыбина А. А. Республ. межведомств. сб. МЗ УССР «Витамины и эксперименте и клинике» 2, 5, Киев, 1970.
11. Чулприка В. П. Сб.: Адаптация организмов к природным условиям. Тез. докл. VI Всесоюзн. конф. по эколог. физиологии 3, 249, Сыктывкар, 1982.
12. Шрам Р., Самкова И., Хола Н. Ж. Гигиена, эпидемиология, микроб., иммунол., 27, 307—321, 1983.
13. Buttersohlt G. Z. des. Нуд., 35, 1, 25—30, 1989.
14. Bernard A., Lanweyrs B. Arch. Matad. profess, 50, 1, 101—107, 1989.
15. Fox V., Maront M., Farrell A., Falt A., Colouhi A. Am. J. Indust. Med., 10 105—109, 1956.
16. WHO Technical Report Series, 535. Geneva, 1973.

Поступило 10.V 1990 г.

Биолог. журн. Армении, № 12 (43), 1990

УДК 577.352.315

ГРАФИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИ РАВНОВЕСНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В СОСТАВЕ МАКРОСТРУКТУРЫ

Г. А. МНАЦАКАНЯН, А. С. КАЛАЧЯН, К. А. ШАГИНИАН**,
Т. Н. АКОПЯН**, А. А. АРУТЮНЯН**

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван,
**Институт ботаники АН Армении, Ереван

С помощью метода двухкоординатной экстракции составлены трехкоординатные диаграммы состояния белков мембран эритроцитов кур. По форме сечений линий полувыходов изученные белки подразделены на три группы. Обсуждается причинная связь между физико-химическими закономерностями комплексообразования белок—мембрана и графическими особенностями диаграмм. Показано, что диаграммы являются индивидуальными характеристиками конкретного белка.

Յրկկօօրդինատային յօժադատման մեթոդով կազմվել են համը իրիթրոցիտների թաղանթային սպիտակուցների հոսկոորդինատ վիճակային դիագրամներ: Ըստ կիսակլիբ գծի հատվածքների ուսումնասիրվող սպիտակուցները բաժանվել են երեք խմբի: Յննարկվում է սպիտակուց-թաղանթ կոմպլեքսազրյացման ֆիզիկաքիմիական օրինաչափությունների և դիագրամների գրաֆիկական առանձնահատկությունների պատճառական կապը: Ցույց է տրված, որ դիագրամները հանդիսանում են ազիայ սպիտակուցի ուրույն բնութագրականները:

With the help of two-coordinate extraction method the three-coordination diagrams of hen erythrocyte membrane proteins' state were constructed. According to the form of half exit line sections the examined proteins were subdivided into three groups. The causal connection between the physico-chemical peculiarities of protein-membrane complex formation and graphical regularities of the diagrams is discussed. It is shown that the diagrams are quite individual for a given protein.