Биолог. журн. Армении, 1-2 (50), 1997

УДК 615.387+612.111+577.1+57.085

ВЛИЯНИЕ СУКЦИНАТА НАТРИЯ НА КОМПОНЕНТЫ МЕМБРАН РАЗМОРОЖЕННЫХ И ОТМЫТЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Н.А.КАЗАРЯН, М.А.САРКИСЯН, С.Р.ГАСПАРЯН, А.В.САЛРЯН, А.В.АНТОНЯН

Республиканский гематологический центр МЗ Армении, 375014, Ереван

Исследовано влияние сукцината натрия на скорость гемолиза, содержание 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах, уровень фосфолипидов мембран и скорость перекисного окисления липидов. Предлагается использование сукцината натрия как нового ингредиента в составе ресуспендирующего раствора размороженных и отмытых эритроцитов для увеличения сроков хранения их до трех суток при 4°С.

Հետազոտվել է նատրիումի սուկցինատի ազդեցությունը հեմոլիզի արագության, էրիթրոցիտներում 2,3-դիֆոսֆոգլիցերատի պարունակության, մեմբրանների ֆոսֆոլիպիդների մակարդակի և լիպիդների գերօքսիդացման արագության վրա: Առաջարկվում է օգտագործել նատրիումի սուկցինատը որպես նոր բաղադրամաս հետսառեցված և լվացված էրիթրոցիտների վերակախտյային լուծույթի կազմում նրանց պահպանման ժամկետը 4°С-ում մինչև 3 օր երկարացնելու նպատակով:

The influence of sodium succinate on the hemolysis rate, on the content of 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes, on the level of membranes phospholipids and the peroxidation rate of lipids has been studied. The application of Na-succinate as a new ingredient in the composition of resuspended solution of defrosted and washed erythrocytes for increasing the terms of their storage till 3 days at 4°C is suggested.

Мембраны эритроцитов - сукцинат натрия

Как известно, современные методы консервации эритроцитов путем замораживания жидким азотом (при -196°С) позволяют сохранять их пригодными для переливания в течение ряда лет. Вместе с тем эти методы не лишены недостатков и не всегда обеспечивают надежную воспроизводимость результатов. Так, размороженные и отмытые эритроциты, ресуспендированные специальными растворами, содержащими компоненты, близкие к плазме крови (сахароза, NaCl, фосфатные соли и т.д.), восстанавливают свои функции в течение 24 часов после их размораживания. Дальнейшее хранение эритроцитов при 4°С не рекомендуется, так как при этом происходит значительное

усиление процессов гемолиза эритроцитов, деградация липидных компонентов мембран, активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижение уровня АТФ, 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) – основного энергетического субстрата эритроцитов, с нарушением их кислород-транспортной функции.

Сказанное свидетельствует о необходимости создания больших запасов крови, особенно редких групп, которые тем более необходимы при чрезвычайных ситуациях (острая необходимость возникла, например, при землетрясении в Армении). В связи с этим особый интерес представляют изучение факторов повреждения размороженных эритроцитов, разработка новых методов повышения их функциональной полноценности с одновременным увеличением сроков хранения при 4°.

Наши поиски в этом направлении привели к заключению, что эффективным может оказаться применение сукцината натрия – важнейшего метаболита цикла Кребса- активатора клеточного метаболизма. Выбор данного препарата обосновывался литературными данными [1,3,6,9].

Действие сукцината натрия на состояние размороженных эритроцитов изучали в процессе их хранения при 4° с целью определения его влияния на процесс гемолиза, содержание 2,3-ДФГ, состояние метаболизма фосфолипидов мембран эритроцитов и на скорость ПОЛ.

Материал и методика. Процесс кислотного гемолиза размороженных и отмытых эритроцитов изучали методом [5], содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах-методом [4], фракционирование индивидуальных фосфолипидов-методом тонкослойной хроматографии [8] в модификации Казаряна и Элояна [2] на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мк (Чехословакия), липидный фосфор- по методу [7], активность переокисления-по реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой [10]. Полученные результаты статистически обработаны с использованием критерия достоверности и различий Фишер-Стьюдента.

Сукцинат натрия использовали в различных концентрациях (от 0,85 до 1,7 мМ/мл) в составе общепринятого ресуспендирующего раствора N 8в ЦНИИГПК. Прописъ раствора N 8в (г/л): сахарова - 30,0, NaCl - 3,0, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ - 2,0; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ - 1,0; вода бидистиллированная - до 1000 мл. Размороженные и отмытые эритроциты исследовали сразу после размораживания,а также после ресуспендирования раствором N 8в и в условиях отсутствия сукцината натрия и с добавлением различных концентраций его через трое суток после хранения при 4°. Контролем служили эритроциты, выделенные из донорской крови.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований показали, что влияние сукцината натрия на скорость гемолиза в зависимости от применяемых концентраций неоднозначно - (рис.1). Максимальный эффект отмечался при использовании 1,45-

1,7мМ/мл сукцината натрия.

Такое же положительное действие оказывал сукцинат на уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах (рис.2). Повышение этого показателя, по-видимому, связано как со сдвигом pH в щелочную сторону [6], играющим

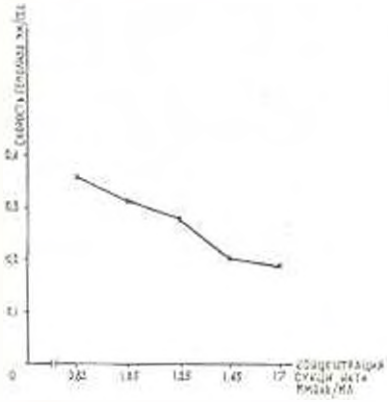

Рис.1 Изменение скорости гемолиза размороженных и отмытых эритроцитов на третий день хранения при 4°.

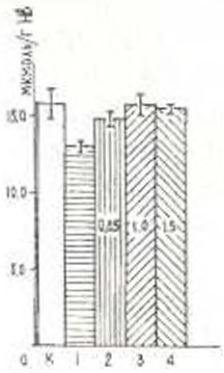

Рис.2 Изменение содержания 2,3-дифосфоглицерата размороженных и отмытых эритроцитов на третий день хранения при 4°.

К-контроль: 1-эритроциты без сукцината натрия; 2,3,4-эритроциты с различными концентрациями (0,85; 1,0 и 1,5мМ/мл) сукцината натрия.

определенную роль в поддержании синтеза 2,3-ДФГ [9], так и за счет предотвращения утечки ионов калия из эритроцитов [7], что в конечном итоге может влиять на кислород-транспортную функцию эритроцитов.

При хранении размороженных и отмытых эритроцитов при 4° повышается активность ПОЛ (рис.3). Добавление к среде ресуспендирования сукцината натрия частично предотвращает этот процесс, что связано, по всей вероятности, с увеличением глютатиона и SH-групп [3,9], т. е. с антиоксидантными свойствами препарата.

Действие сукцината натрия характеризуется также поддержанием уровня α-глицерофосфата (рис.4) - основного исходного метаболита биосинтеза фосфолипидов биомембран, связанного с достаточным содержанием АТФ в эритроцитах. Хранение размороженных и отмытых эритроцитов при 4° приводит к

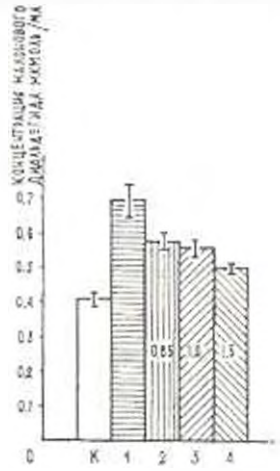

Рис.3 Изменение концентрации малонового диальдегида размороженных и отмытых эритроцитов на третий день хранения при 4°.

К-контроль: 1- эритроциты без сукцината натрия; 2,3,4-эритроциты с различными концентрациями (0,85; 1,0 и 1,5мМ/мл) сукцината натрия.

нарушению липолиза в результате намечающейся деградации фосфолипидов мембран.

Добавление сукцината натрия к эритроцитарной массе приводит к нормализации концентрации как лизофосфатидилхолинов - цитотоксичных продуктов липолиза, так и некоторых других важнейших структурных фосфолипидов, в том числе фосфатидилинозитов, сфингомиелинов и, частично, фосфатидилхолинов мембран размороженных и отмытых эритроцитов на третий день хранения при 4° (рис.5). Эти изменения сопровождаются нормализацией фосфолипид-фосфолипидных отношений и восстановлением проницаемости эритроцитарных мембран. В пользу этого свидетельствуют литературные

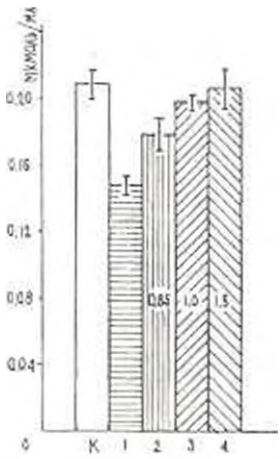

Рис.4 Изменение уровня глицерофосфата размороженных и отмытых эритроцитов на третий день хранения при 4°.

К- контроль; 1-эритроциты без сукцината натрия; 2,3,4-эритроциты с различными концентрациями (0,85; 1,0 и 1,5мМ/мл) сукцината натрия.

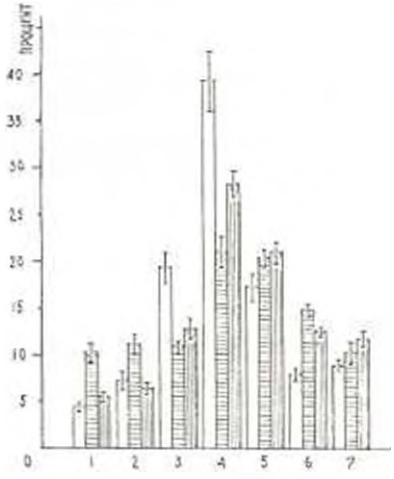

Рис.5 Изменение уровня отдельных фракций фосфолипидов в мембранах размороженных и отмытых эритроцитов на третий день хранения при 4°.

1-лизофосфатидилхолины; 2-фосфатидилинозиты; 3-сфингомиелины; 4-фосфати-дилхолины; 5-фосфатидилэтаноламины; 6-фосфатидилсерины; 7-полиглицерофос-фолипиды.

данные об участии янтарной кислоты в регуляции K^+, Na^+-ого насоса [9] и в окислительно-восстановительных превращениях НАД [1], способствующей установлению баланса ее окисленных и восстановленных форм и тем самым регулирующей фосфатидогенез и процессы ПОЛ. Полученные данные, на наш взгляд, являются обоснованием необходимости более глубокого и разностороннего исследования эффективности применения этого препарата в отношении поддержания стабильности биомембран и, следовательно, функциональной активности эритроцитов.

ЛИТАРАТУРА

1. *Церкачев Э.Ф.* В кн.: Терапевтическое действие янтарной кислоты. 36-49, Пущино, 1976.
2. *Казарян П.А., Элоян Д.В.* Хроматографические методы (распределительная и адсорбционная хроматография). М., 1982.
3. *Кондрашова М.Н.* Автореф. докт. дисс., Пущино, 1971.
4. *Луганова И.С., Блинов М.Н.* Лабор. дело, 652-654, 1975.
5. Определение кинетических параметров гемолиза эритроцитов методом непрерывной автоматической регистрации. Методич. рекомендации (составители: Адамян К.Г., Оганесян С.С. и др.), Ереван, 1981.
6. *Розенфельд А.С., Маевский Е.И.* В кн.: Терапевтическое действие янтарной кислоты. 150-152, Пущино, 1976.
7. *Светашев В.И.* Автореф. канд. дисс., Владивосток, 1973.
8. Хроматография в тонких слоях. Под. ред. Э.Шталя, М., 1965.
9. *Фрейдман С.Л., Хлебников А.Н.* В кн.: Терапевтическое действие янтарной кислоты. 49-55, Пущино, 1976.
10. *Brit* J. Hematology, *20*, 95-111, 1971.

Поступила 10.IX.1995

Биолог. журн. Армении, 1-2 (50), 1997

УДК 579.66.578.81.579.871.8

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ФТОРПИРУВАТЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МУТАНТОВ У *BREVIBACTERIUM LACTOFERMENTUM*

Э.Л. АГАБЕКЯН, М.Б. ЧИТЧЯН, Г.Г. ОГАНЕЗОВА, Н.А. ОГАНЕСЯН, С.В. КАЖОЯН, Н.С. АВЕТИСЯН

НИИ "Биотехнология", ООО "Фармаген", 375056, Ереван

Получена коллекция ФП-чувствительных мутантов на основе продуцента лизина *B.lactofermentum* НИТИА-88. Мутанты классифицированы по чувствительности к доле аналога и лизинспецифицирующей активности.

Ստացված է ֆտորպիրուվատի (ՖՊ) նկատմամբ զգայուն մուտանտների հավաքածու, որի հիմքն է հանդիսանում լիզին-արտադրիչ *B.lactofermentum* ՆԻՏԻԱ-88 շտամը. Մուտանտները դասակարգված են ըստ ՖՊ-ի նկատմամբ ցուցաբերած զգայունության և լիզին սինթեզող ակտիվության:

On a base of the strain *B. lactofermentum* NITIA-88, a lisine producer, the fluoropyruvate (FP) sensitive mutants collection was obtained. The mutants were classified by the level of FP sensitivity and lysine production.