

На правах рукописи

ПРОКОПЬЕВА ВАЛЕНТИНА ДАНИЛОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ЭТАНОЛА И ЕГО  
МЕТАБОЛИТОВ НА КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ *IN VITRO* И *IN VIVO***

03.00.13 - Физиология

03.00.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой  
степени доктора биологических наук

ТОМСК - 2003

Работа выполнена в ГУ НИИ психического здоровья Томского научного центра СО РАМН и МГУ им. М.В. Ломоносова.

**Научные консультанты:**

доктор биологических наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ  
доктор медицинских наук,  
профессор

**Болдырев Александр Александрович**

**Бохан Николай Александрович**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
профессор  
доктор биологических наук,  
профессор  
доктор биологических наук

**Суханова Галина Алексеевна**

**Шалабодов Александр Дмитриевич**

**Большаков Михаил Алексеевич**

**Ведущая организация:**

Институт физиологии СО РАМН, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2003 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт,2)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, проспект Ленина, 107).

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2003 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

**Бражникова Н.А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Биологические мембраны являются неотъемлемой частью любой живой клетки. Помимо таких функций биологических мембран, как отграничение клетки от окружающей среды, разделение внутреннего объема клетки на отдельные компартменты, обеспечение специфики межклеточных контактов и контроль за проникновением в клетку и выход из нее различных соединений, биологические мембраны способны воспринимать, усиливать и передавать внутрь клетки сигналы из внешней среды, создавать специальные условия для протекания ферментативных реакций, осуществляемых гидрофобными мембранными белками, обеспечивать превращение биологической энергии и т.д.

Эффективное выполнение биологическими мембранами разнообразных функций возможно благодаря их уникальной структуре. В настоящее время имеется большое количество научных обзоров, монографий и учебных пособий, посвященных описанию принципов организации и функционирования биологических мембран [Крепс Е.М., 1981; Конев С.В., 1987; Твердислов В.А. и соавт., 1987; Скулачев В.П., 1989; Болдырев А.А. и соавт., 1990; Hausley M.D., Stanly K.K., 1984; Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999]. Их анализ позволяет заключить, что такие важные функции биомембран, как способность воспринимать, классифицировать (усиливать или элиминировать) и передавать информацию, осуществлять транспорт ионов против их концентрационного градиента, преобразовывать энергию в форму, необходимую клетке, осуществляются благодаря структурным (конформационным) перестройкам мембранных компонентов. Такая тесная структурно-функциональная связь в биомембранах обеспечивает как динамическое равновесие внутри клетки, так и возможность взаимодействия клеток друг с другом.

Известно, что в основе многих патологий лежат изменения свойств клеточных мембран. Структурно-функциональные нарушения биомембран могут быть не только причиной, но и следствием развития патологических процессов. Как правило, при патологиях происходит комплексная модификация функций мембран, которая непременно сопровождается структурными изменениями как мембранных липидов (изменение липидного состава, соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов, развитием перекисного окисления липидов, и др.), так и мембранных белков (гликирование, карбонилирование, кросс-линкинг) [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999].

Клеточные мембраны являются мишенью действия токсинов, радиоактивного и ультрафиолетового облучения. Кроме этого известно большое количество природных модификаторов мембран, способных в зависимости от условий и их концентрации оказывать различное (иногда противоположное) действие на клеточные мембраны. Такие соединения относят к классу мембранотропных веществ. Одним из них является этанол. Изучение молекулярных механизмов влияния этанола и его метаболитов на биомембраны *in vivo* и *in vitro* при остром или хроническом влиянии в свете новых знаний о структурно-функциональных взаимоотношениях в биологических мембранах позволяет лучше понять фундаментальные основы возникновения и развития одного из наиболее широко распространенных заболеваний в мире – алкоголизма.

В настоящее время исследования, посвященные различным аспектам алкоголизма, интенсивно проводятся в разных странах. Для успешного решения таких проблем алкоголизма, как выяснение общих закономерностей формирования и течения этого заболевания, его клиники и дифференцированной

терапии больных алкоголизмом, необходимы углубленные представления о молекулярных механизмах влияния этанола и структурно-функциональных изменениях, возникающих в биологических мембранах вследствие острого или хронического его действия.

Благодаря усилиям многих исследователей в последние годы получены новые данные о молекулярных механизмах формирования алкогольной зависимости и токсического действия этанола. Однако многие аспекты молекулярных механизмов повреждающего действия хронической алкоголизации остаются неясными. До сих пор не известно, в какой мере эти повреждения связаны с прямым влиянием неметаболизированного этанола на клетки, а в какой – с влиянием его метаболитов. Основным путем метаболизма этанола в организме является его окисление до ацетальдегида алкогольдегидрогеназой, этанол-индуцируемым цитохромом P450 (CYP2E1) и каталазой [Lieber C.S., 1994; French S.W., 1996]. Ацетальдегид обладает высокой реакционной способностью. Он может взаимодействовать с  $\text{NH}_2$ -,  $\text{SH}$ -,  $\text{COOH}$ - группами, что может приводить к модификации белков, липидов, нуклеиновых кислот и других биомолекул [Hepkiss A.R., et al, 1998; Holownia A., et al, 1999]. Кроме того, при хроническом поступлении в организм высоких доз этанола побочными продуктами его окислительного превращения могут быть чрезвычайно активные гидроксипероксидные радикалы [Reinke L.A., et al., 1997]. Показана возможность накопления в этих условиях супероксидных, гидроксильных, пероксильных и других радикалов, которые также могут приводить к повреждению биомембран и гибели клеток [Sato Y. et al, 1995; Pekiner B., Pennock J.F., 1994].

Другой путь метаболизма этанола в организме – его неокислительное превращение в этиловые эфиры жирных кислот (ЭЭЖК) под действием синтазы этиловых эфиров жирных кислот. Этот путь является преобладающим в нервных клетках и кардиомиоцитах [Gorski N.P., et al., 1999; Laposata M., 1999]. Этиловые эфиры жирных кислот, вмешиваясь в метаболические процессы клетки, могут приводить к перестройке клеточного метаболизма, нарушению многих функций, включая такую важную, как трансмембранный транспорт целого ряда метаболитов [Gubitosi-Klug R.A., Gross, R.W., 1996].

Для изучения тонких молекулярных механизмов повреждающего действия этанола и его метаболитов на клеточные мембраны в качестве модели удобно использовать эритроциты периферической крови и их тени. Эритроциты являются высокочувствительной тест-системой внутренней среды организма. Помимо осуществления присущей им основной специфической газотранспортирующей функции, эти клетки принимают участие в обеспечении стабильности водно-солевого обмена, кислотно-основного равновесия, определяют микрореологические свойства крови, способны связывать и переносить вирусы, токсины, лекарственные вещества и т.д.

При алкоголизме обнаруживается структурно-функциональная дезорганизация эритроцитов, меняется их морфология, что сопровождается снижением гемолитической устойчивости и развитием анемии [Chi L.M., Wu W.G., 1991; Bizzaro N., et al., 1993]. Такие изменения эритроцитов неизбежно усугубляют тканевую гипоксию, имеющую место при алкоголизме. Нарушается роль эритроцитов в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого организма, что осложняет течение заболевания. В связи с этим актуальным является вопрос, каков молекулярный механизм происхождения аномальных клеток красной крови при данном заболевании и насколько обратимы эти патологические изменения эритроцитов.

Одним из важных факторов, контролирующих форму эритроцита, является работа мембранных ион-транспортующих систем. Показано нарушение функционирования и регуляции эритроцитарной Na/K-АТФазы при алкоголизме [Johnson J.H., Crider B.P., 1989]. Есть данные о действии алкоголя на трансмембранный транспорт лития [Ostrow D.G., et al., 1986] и об изменении под действием этанола проницаемости биомембран для  $Ca^{2+}$  [Kelly-Murphy S., et al., 1984]. Однако сведений, касающихся функционирования и регуляции ион-транспортующих систем в эритроцитах больных алкоголизмом, явно недостаточно.

При алкоголизме значительные изменения происходят не только в эритроцитах, но и в других клетках крови. Известно, что у больных алкоголизмом происходит снижение фагоцитарной активности [Евсеев В.А., 1990; Гамалея Н.Б. и соавт., 2000]. В то же время до сих пор нет данных о соотношении показателей маркеров окислительного стресса в организме с дыхательной активностью нейтрофилов при данной патологии.

Таким образом, имеющихся в настоящее время экспериментальных данных недостаточно для понимания тонких молекулярных механизмов токсического действия этанола и его метаболитов на структурно-функциональные взаимоотношения в биологических мембранах, отсутствует целостная картина, выявляющая на молекулярном уровне причины структурно-функциональных изменений клеток крови при алкоголизме. Неисследованным также остается вопрос о том, насколько возможно восстановление патологически измененных параметров клеток красной и белой крови в процессе традиционной дезинтоксикационной терапии. Кроме того, актуальным является поиск новых способов коррекции клеточных повреждений при алкогольной интоксикации.

#### **Цель и задачи исследования.**

Цель настоящей работы заключалась в исследовании молекулярных механизмов повреждающего действия этанола и продуктов его метаболизма - ацетальдегида и этиловых эфиров жирных кислот - на клетки крови *in vitro* и *in vivo*.

При выполнении работы были поставлены следующие задачи:

1. Выявить особенности влияния этанола и ацетальдегида на устойчивость эритроцитов к кислотному и окислительному гемолизу *in vitro*.
2. Оценить взаимосвязь изменения морфологии эритроцитов с изменением состояния эритроцитарных белков при действии этанола и ацетальдегида *in vitro*.
3. Установить закономерности влияния этанола и ацетальдегида на гидрофобную область липидного матрикса эритроцитов *in vitro*.
4. Изучить влияние этиловых эфиров линоленовой и пальмитиновой жирных кислот на структуру и стабильность эритроцитов *in vitro*.
5. Дать комплексную оценку структурно-функционального статуса эритроцитов больных алкоголизмом в динамике лечения.
6. Выявить особенности функционирования и регуляции мембранных ферментов (Na/K-АТФазы) и ионных каналов ( $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов) в эритроцитах больных алкоголизмом в динамике лечения.
7. Оценить уровень окислительной модификации белков и липидов сыворотки крови больных алкоголизмом в динамике лечения.
8. Исследовать фагоцитарную и дыхательную активности нейтрофилов у больных алкоголизмом в динамике лечения.
9. Оценить эффективность применения природного мембраностабилизатора и антиоксиданта карнозина *in vitro* в качестве протектора структурно-функциональных нарушений клеток крови больных алкоголизмом.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Молекулярные механизмы влияния этанола и ацетальдегида на эритроциты *in vitro* существенно различаются. Неметаболизированный этанол снижает устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу. В условиях окислительного гемолиза этанол не приводит к дестабилизации эритроцитов, напротив, наблюдается тенденция к повышению стабильности клеток. Этанол приводит к снижению микровязкости гидрофобной области липидного бислоя без изменения белкового спектра и окислительного статуса белков мембран эритроцитов. Ацетальдегид не изменяет устойчивость эритроцитов к гемолизирующему действию кислоты, но снижает устойчивость к действию гипохлорита натрия. При этом происходит снижение микровязкости липидного бислоя мембран и изменяется состояние эритроцитарных белков - наблюдается их окислительная модификация, затрудняется экстракция спектрина и актина. Как этанол, так и ацетальдегид *in vitro* не нарушают морфологию эритроцитов.
2. Этиловые эфиры жирных кислот встраиваются в мембраны эритроцитов при инкубации *in vitro*. При этом снижается стабильность эритроцитов, нарушается асимметрия распределения фосфатидилсерина между внутренним и наружным монослоями мембраны, но нарушения морфологии клеток не происходит. У больных алкоголизмом ЭЭЖК в эритроцитах не обнаруживаются.
3. Структурно-функциональные изменения эритроцитов при действии этанола и его метаболитов *in vitro* отличаются от структурно-функциональных нарушений эритроцитов больных алкоголизмом. У больных нарушение морфологии эритроцитов сочетается со снижением гемолитической устойчивости клеток, кросс-линкингом эритроцитарных белков, снижением гидрофобного объема мембран, повышением упорядоченности их структуры, уменьшением чувствительности мембран к хаотропному действию этанола и ацетальдегида, повышением активности Na/K-АТФазы и проводимости K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов. В процессе дезинтоксикационной терапии наблюдается положительная динамика перечисленных параметров: увеличивается количество морфологически нормальных эритроцитов, восстанавливается их гемолитическая устойчивость, нормализуются гидрофобный объем мембран, активность Na/K-АТФазы и проводимость K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов, а также чувствительность липидного матрикса к хаотропному действию этанола, однако чувствительность мембран к хаотропному действию ацетальдегида не восстанавливается.
4. Хроническое поступление высоких доз этанола в организм приводит к увеличению окислительной модификации белков и липидов сыворотки крови и к повышению дыхательной активности нейтрофилов. После лечения содержание продуктов ПОЛ в сыворотке крови и дыхательная активность нейтрофилов нормализуются, уровень карбонилирования сывороточных белков снижается, однако остается выше нормы.
5. Природный дипептид карнозин повышает устойчивость эритроцитов больных алкоголизмом к кислотному гемолизу и предохраняет клетки от структурных повреждений *in vitro*. Аналогичными свойствами обладает ацетилированное производное карнозина – N-ацетил-карнозин. Карнозин обладает иммуномодулирующим действием, которое выражается в регулировании фагоцитоза и продукции активных форм кислорода нейтрофилами. Эффект карнозина зависит от его концентрации и функционального состояния клеток.

### **Новизна исследования и наиболее существенные научные результаты.**

В данном исследовании выявлены неизвестные ранее механизмы повреждающего действия этанола и его метаболитов на клеточные мембраны. Впервые проведено сравнение действия этанола и ацетальдегида *in vitro* на устойчивость эритроцитов к кислотному и окислительному гемолизу. Показано, что дестабилизирующий эффект неметаболизированного этанола на эритроциты проявляется в условиях кислотного, но не окислительного гемолиза. Ацетальдегид проявляет свое действие в условиях окислительного, но не кислотного гемолиза.

Молекулярные механизмы действия этанола и ацетальдегида на мембраны эритроцитов существенно различаются. Этанол не приводит к модификации белков мембран эритроцитов. В результате влияния ацетальдегида увеличивается уровень карбонилирования белков эритроцитов, затрудняется экстракция спектрина и актина из теней эритроцитов, при этом продукты кросс-линкинга белков не обнаруживаются. Модификация белков эритроцитов под действием ацетальдегида без кросс-линкинга не приводит к морфологическим нарушениям клеток, в то время как модификация белков под действием глутаральдегида, приводящая к кросс-линкингу белков, сопровождается нарушением формы эритроцитов.

Впервые установлено, что этиловые эфиры жирных кислот, встраиваясь в мембрану эритроцита *in vitro*, приводят к перераспределению фосфатидилсерина с внутренней поверхности эритроцитарной мембраны на внешнюю, при этом наблюдается значительное снижение стабильности эритроцитов без нарушения морфологии. В эритроцитах больных алкоголизмом этиловые эфиры жирных кислот не обнаружены.

Впервые дана комплексная структурно-функциональная характеристика эритроцитов больных алкоголизмом в динамике лечения. У больных в состоянии абстиненции выявлены нарушение морфологии эритроцитов, в мембранах обнаружены продукты кросс-линкинга белков, установлено возрастание микровязкости гидрофобной области эритроцитарных мембран. Обнаружена различная чувствительность мембран эритроцитов больных алкоголизмом и здоровых лиц к воздействию этанола и ацетальдегида: этанол, как и ацетальдегид, приводят к увеличению гидрофобного объема мембран здоровых доноров, в то время как у больных в состоянии абстиненции мембраны эритроцитов оказываются не чувствительными к этанолу и ацетальдегиду. После лечения увеличивается количество морфологически полноценных клеток, наблюдается снижение микровязкости эритроцитарных мембран, восстанавливается чувствительность гидрофобной области мембран к хаотропному действию этанола, но не ацетальдегида.

Впервые исследованы особенности функционирования и регуляции мембранных ион-транспортирующих ферментов и каналов в патологически измененных эритроцитах больных алкоголизмом. Установлено, что у больных в период абстиненции активность Na/K-АТФазы, как и Ca<sup>2+</sup>-зависимая калиевая проницаемость мембран эритроцитов, повышены. При алкоголизме в условиях Mg<sup>2+</sup>-дефицита изменяется характер зависимости активности Na/K-АТФазы от магния. Показана важная роль белков мембранного каркаса в регуляции K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов эритроцитов. Обнаружена различная чувствительность K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов к изменению объема клеток при изменении осмолярности среды инкубации у здоровых доноров и больных алкоголизмом, что свидетельствует об изменении свойств мембранного каркаса эритроцитов при алкоголизме. После лечения активность Na/K-АТФазы и Ca<sup>2+</sup>-зависимая K<sup>+</sup>-проводимость эритроцитов

пациентов нормализуются. В период ремиссии зависимость активности Na/K-АТФазы от магния не отличается от нормы.

Обнаружено увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов и повышение уровня карбонилирования белков в сыворотке крови больных алкоголизмом в период абстиненции. Показано снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и повышение их дыхательной активности у пациентов. Эти результаты подтверждают данные литературы об активации окислительных процессов и состоянии окислительного стресса при алкоголизме. После лечения содержание продуктов ПОЛ в сыворотке крови пациентов не отличается от нормы, количество карбонилированных белков снижается, однако остается повышенным по сравнению с нормой. Показатели дыхательной активности нейтрофилов больных алкоголизмом после лечения также приближаются к норме.

Впервые в опытах *in vitro* показано, что природный гидрофильный антиоксидант гистидин-содержащий дипептид карнозин и его ацетилированное производное N- ацетил-карнозин повышают устойчивость эритроцитов больных алкоголизмом к кислотному гемолизу и увеличивают количество морфологически нормальных эритроцитов. Впервые установлено, что карнозин *in vitro* способен стимулировать фагоцитоз и дыхательную активность нейтрофилов у здоровых лиц и больных алкоголизмом. Эффекты карнозина зависят от его концентрации и функционального состояния клеток.

#### **Теоретическое и практическое значение работы.**

Полученные данные расширяют современные представления о механизмах повреждающего действия этанола и его метаболитов на биологические мембраны. Результаты работы фундаментального характера вносят вклад в развитие представлений о механизмах структурно-функциональных нарушений клеток крови при алкоголизме и могут быть использованы для разработки новой патогенетически обоснованной терапии больных алкоголизмом, служить основанием для оптимизации оценки эффективности проводимого лечения. Разработанный способ повышения устойчивости к гемолизу эритроцитов путем введения в кровь природного гидрофильного антиоксиданта карнозина или его N-ацетильного производного может использоваться при стабилизации донорской крови, защите эритроцитов в аппаратах искусственного кровообращения, а также при патологиях, сопровождающихся повреждением эритроцитов.

#### **Апробация работы.**

Результаты работы были представлены на Межреспубликанской научно-практической конференции «Синтез, фармакология и клинические аспекты новых психотропных и сердечно-сосудистых веществ» (Волгоград, 1989), на Международной конференции «Регуляция свободнорадикальных реакций (биомедицинские аспекты)» (Варна, 1989), на Всесоюзной конференции «Медико-биологические аспекты охраны психического здоровья» (Томск, 1990), на XII и XIII съездах психиатров России (Москва, 1995; 2000), на Межрегиональной конференции «Медико-биологические аспекты нейрогуморальной регуляции» (Томск, 1997), на региональном научном симпозиуме «Молекулярные основы заболеваний XXI века» (Томск, 2000), на VII, VIII, IX и X научных отчетных сессиях НИИ психического здоровья Томского научного центра СО РАМН (Томск, 1995; 1997; 1999; 2001), на конференции «Психическое здоровье в XXI веке: оценка и прогноз» (Томск, 2001), на VII Всемирном конгрессе по биологической психиатрии (Берлин, 2001), XXVII Съезде Федерации Европейских биохимических обществ (Лиссабон, 2001), VIII конгрессе Европейского общества по исследованию



биомедицинских аспектов алкоголизма (Париж, 2001), IV съезде физиологов Сибири (Новосибирск, 2002), на Всероссийской конференции «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2003).

### **Публикации.**

Результаты работы представлены в 41 публикации, из них 1 патент на изобретение, 5 статей в зарубежной печати, 14 статей в центральных рецензируемых журналах.

### **Объем и структура работы.**

Диссертация изложена на \_\_\_\_\_ печатных страницах, содержит \_\_\_ таблиц, \_\_\_ рисунков. Состоит из введения, разделов: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования и их обсуждение», а также заключения, выводов и списка литературы, включающего \_\_\_ источников, из них \_\_\_ отечественных и \_\_\_ зарубежных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### **Методы исследования.**

В работе использовали кровь 120 мужчин, больных алкоголизмом II стадии (диагноз по МКБ-10 соответствовал коду F10.2), средний возраст на день обследования составил  $40,5 \pm 8,5$  лет. У 78 пациентов за период лечения кровь брали дважды, чтобы проследить динамику исследуемых показателей. Критериями включения больных в основную группу явилось: пребывание в абстинентном состоянии; добровольное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения из исследования являлись: возраст старше 55 лет; наличие эндогенных заболеваний, эпилепсии; наличие заболеваний, передающихся половым путем (ВИЧ-инфекции, сифилиса); наличие выраженных коморбидных неврологических и соматических заболеваний, затрудняющих объективную оценку клинического состояния, вызванного основным заболеванием; отказ больного от участия в исследовании.

Первый раз кровь для анализа у всех больных брали в день поступления на лечение до купирования абстинентного синдрома. Второй раз кровь брали у больных, которые успешно прошли курс дезинтоксикационной терапии в течение 30-35 дней и находились в стадии формирования ремиссии. В отдельных случаях кровь брали также на 5-7 день лечения, сразу после купирования абстинентного синдрома (29 пациентов). Контрольную группу составили 58 практически здоровых мужчин соответствующего возраста (средний возраст  $38,0 \pm 8,8$  лет), у которых анамнестически были исключены алкоголизм и употребление спиртных напитков, по крайней мере, в течение последних 10 суток.

В период проведения лечения пациенты получали традиционную медикаментозную терапию, включающую дифференцированное назначение дезинтоксикационных средств (изотонический раствор натрия хлорида, гемодез, витамины группы «В», «С») и следующих основных групп препаратов: антидепрессанты (амитриптилин до 100 мг/сут); корректоры поведения (неулептил до 30 мг/сут, сонапакс до 50 мг/сут); гипнотики (хлорпротиксен до 100 мг/сут); ноотропы (пирацетам до 800 мг/сут), вегетостабилизаторы (пирроксан до 60 мг/сут, грандаксин до 100 мг/сут).

Кроме того, использовали кровь лабораторных кроликов-самцов породы шиншилла. Кровь кроликов стабилизировали 3,8% цитратом натрия в соотношении 1:10 в момент отбора из ушной вены. Для стабилизации крови

пациентов и здоровых доноров использовали 3,8% цитрат натрия при заборе периферической крови (соотношение 1:10) и гепарин при заборе венозной крови (25 ед. на мл крови).

При исследовании гемолитической устойчивости эритроцитов образец крови (0,1 мл) разводили физиологическим раствором (0,85% NaCl, pH 6,3) в 10 раз и инкубировали на водяной бане 2 ч при 37° С, после чего хранили в тех же условиях не более 4 ч. Преинкубацию разведенного в 10 раз образца крови с 0,1-0,5% этанолом или 0,25% ацетальдегидом проводили 1 ч при 37° С. Количество клеток в образце крови подсчитывали в камере Горяева. Гемолитическую устойчивость эритроцитов определяли по изменению оптической плотности проб, содержащих суспензию клеток, в области 630 нм [Терсков И.А., Гительзон И.И., 1957]. Измерения проводили при 25° С, при непрерывном перемешивании пробы. Кислотный гемолиз индуцировали добавлением 2 мМ соляной кислоты (рН среды инкубации после добавления HCl составлял 2,7), окислительный гемолиз – добавлением 0,2 мМ гипохлорита натрия, либо 1,5 мМ SIN-1 $\gamma$ CD (3-морфолино-N-нитрозо-аминоацетонитрил,  $\gamma$ -циклодекстриновый комплекс), либо 2 мМ перекиси водорода, или смеси 2 мМ перекиси водорода с 0,04 мМ FeSO<sub>4</sub>. Для характеристики гемолитической устойчивости эритроцитов использовали параметры T<sub>max</sub> и %<sub>max</sub>, которые представляют собой соответственно время достижения максимальной скорости гемолиза (в мин) и количество клеток (в %), подвергающихся гемолизу с максимальной скоростью.

При исследовании влияния этиловых эфиров жирных кислот на спонтанный гемолиз эритроцитов клетки инкубировали в присутствии или отсутствии человеческого сывороточного альбумина (40 мг/мл) при 25°С в течение 24 часов после добавления 100 мкМ этиловых эфиров линоленовой или пальмитиловой жирных кислот, растворенных в 10 мМ растворе диметилсульфоксида (DMSO). В контрольные образцы добавляли то же количество DMSO без ЭЭЖК. Уровень спонтанного гемолиза оценивали по количеству гемоглобина в супернатантах после центрифугирования образцов (измеряя абсорбцию проб при 415 нм) по сравнению с уровнем гемоглобина в образцах с тем же количеством эритроцитов, подвергнутых полному гемолизу путем растворения клеток в 10 объемах 5 мМ фосфатного буфера (pH 8,0).

Активность каталазы измеряли методом, предложенным Aebi H. (1984), по снижению уровня перекиси водорода в пробе, которое регистрировали спектрофотометрически при 240 нм. В качестве ингибитора каталазы использовали 3-аминотриазол в концентрации 25 мМ в присутствии метиленового синего (0,01 мг/мл) [Tephly T.R., et al., 1961].

Получение теней эритроцитов, а также экстракцию из них спектрина и актина проводили по описанным ранее методам [Shotton D.M., 1998]. Белковый состав препаратов определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) по Лэммли в присутствии додецилсульфата натрия [Laemmli U.K., 1970]. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури [Lowry O.H., et al, 1951].

Качественную оценку размера и формы эритроцитов проводили после окрашивания мазков крови по стандартной методике с красителем Романовского [Меньшиков В.В., 1987] под световым микроскопом МБИ-15-2 (ЛОМО, Россия). Особенности поверхностной архитектоники эритроцитов изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Для этого биоптаты периферической крови обрабатывали по методу, предложенному Г.И.Козинцом и Ю.А.Симоварт

(1985). Готовые препараты исследовали в электронных микроскопах «РЭМ-200» и «JEM-100» (Япония).

Оценку микровязкости мембран эритроцитов проводили с помощью флуоресцентного зонда пирена на спектрофлуориметре «Hitachi-MPF4» (Япония) [Vanderkooi J.M., Calles J.B., 1974].

Анализ содержания ЭЭЖК в мембранах эритроцитов проводили методом газовой хроматографии, как описано в работе Bird D.A. et al., 1997. Распределение фосфатидилсерина в мембранах эритроцитов оценивали с флуоресцеин-изотиоцианат-меченным аннексином V методом проточной цитометрии [Koorman G. et al., 1994] на флюцитометре Becton-Dickinson FACSort.

Активность Na/K-АТФазы в эритроцитах определяли методом, разработанным Казенновым А.М. и соавт. (1984), по увеличению концентрации неорганического фосфата ( $\Phi_n$ ) в пробе на биохимическом анализаторе ФП-901 (Финляндия). Активность выражали в мкмоль  $\Phi_n$ /час·мл упакованных эритроцитов. Проводимость  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов мембран эритроцитов оценивали по изменению мембранного потенциала в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора A23187 [Орлов С.Н., и соавт., 1992]. Для регистрации изменений мембранного потенциала в суспензии эритроцитов использовали метод непрерывной регистрации pH среды инкубации, предложенный Vestergaard-Bogind B., Vennekou P. (1982). Этот метод основан на том, что в присутствии протонофора распределение протонов зависит от мембранного потенциала  $E$  как  $E = RT/F(\text{pH}_i - \text{pH}_0)$ , где  $\text{pH}_i$  и  $\text{pH}_0$  – значения pH цитоплазмы и среды инкубации, соответственно. При низкой буферной емкости среды инкубации (в наших условиях она примерно в 100 раз меньше буферной емкости цитоплазмы) изменениями  $\text{pH}_i$  можно пренебречь, а его квазистационарный уровень определять при гемолизе клеток в присутствии детергента (использовали тритон X-100, конечная концентрация в пробе 0,2%).

Карбонильные группы сывороточных белков определяли иммунохимическим методом слот-блот после обработки белков 2,4-динитрофенилгидразином (DNPH) и получения динитрофенол-меченных по карбонильным группам белков (DNP-меченных белков) [Harlow E., Lane D., 1988]. Использовали первые антитела, специфические к динитрофенолу, и вторые антитела с конъюгированной щелочной фосфатазой. В качестве стандартного белка, содержащего известное количество карбонильных групп, использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (50 мг/мл), предварительно обработанный 5 мМ NaOCl [Buss H. et al., 1997].

Карбонильные группы в белках эритроцитов выявляли с помощью метода Вестерн-блот, используя кит для определения окислительной модификации белков. Тени эритроцитов обрабатывали DNPH для получения DNP-меченных белков. Белки, разделенные методом ЭФ в ПААГ, переносили путем блоттинга с геля на нитроцеллюлозную мембрану и обрабатывали специфическими антителами на DNP-меченные белки, а затем вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой.

Оценку перекисного окисления липидов в сыворотке крови проводили, определяя один из конечных продуктов ПОЛ – малоновый диальдегид (МДА) - с помощью тиобарбитуровой кислоты по методу, описанному Владимировым Ю.А., Арчаковым А.И. (1972).

Иммунологические исследования проводили методами, описанными Кетлинским С.А. и Калининой Н.М. (1998). Фагоцитарную активность лейкоцитов оценивали по поглотительной способности нейтрофилов. В качестве тест-системы использовали меланинформальдегидный латекс. Измеряли фагоцитарный индекс

(пропорциональный проценту фагоцитирующих нейтрофилов) и фагоцитарное число (среднее число частиц латекса, поглощенных одним фагоцитом). Дыхательную активность нейтрофилов оценивали по восстановлению в цитоплазме клетки нитросинего тетразолия до диформаза (НСТ-тест). Измеряли процент клеток, образующих гранулы диформаза, и цитологический индекс (ЦИ), пропорциональный количеству образовавшихся гранул диформаза, без стимуляции (спонтанный НСТ-тест) и при стимуляции латексом (стимулированный НСТ-тест).

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики. Для оценки достоверности различия средних вариационных рядов использовали t-критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна-Уитни [Урбах В.Ю., 1975; Лакин Г.Ф., 1990]. Были использованы компьютерные программы: ANOVA, Statistics 5.0, Microsoft Excel.

В работе использовали реактивы: SITS (4-ацетиамидо-4-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота), СССР (карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон) («Calbiochem», США); A23187, тритон X-100, NaOCl, этиловые эфиры жирных кислот, 3-аминотриазол, метиленовый синий, SIN-1 $\gamma$ CD (3-морфолино-N-нитрозо-аминоацетонитрил,  $\gamma$ -циклодекстриновый комплекс), Кумасси R-250, DNPH (динитрофенилгидразин), кроличьи антитела к динитрофенолу, вторые (козьи) анти-кроличьи антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой, нитросиний тетразолий (НСТ), 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат (BCIP), PIPES (пиперазин-N-N-бис-2-этан сульфонат), L-гистидин, ацетальдегид («Sigma», США); реактивы для электрофореза в ПААГ («Reanal», Венгрия); аннексин V, меченый FITC (флуоресцеинизотиоцианатом) («Molecular Probes», США); кит для определения окислительной модификации белков (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, «Intergen Company», США); нитроцеллюлозные мембранные фильтры BA 85 (0.45  $\mu$ m) («Schleicher & Schuell», Германия); реактивы для выявления активности пероксидазы, конъюгированной с антителами (ECL Western Blotting Analysis System, «Amersham», США). Меланинформальдегидный латекс был получен из ВНИИ биологического приборостроения, Москва. Дипептиды: карнозин, анзерин (N<sup>1</sup>-метил-карнозин), офидин (N<sup>3</sup>-метил-карнозин) и N-ацетил-карнозин (N-Ас-карнозин) были любезно предоставлены профессором А.А.Болдыревым (кафедра биохимии МГУ им. М.В.Ломоносова). Остальные реактивы были получены от фирмы «Реахим», Россия.

## **Результаты исследования и их обсуждение**

### **I. Молекулярные механизмы влияния этанола и его метаболитов на мембраны эритроцитов *in vitro*.**

#### **I.1. Влияние этанола и ацетальдегида на устойчивость эритроцитов к кислотному и окислительному гемолизу.**

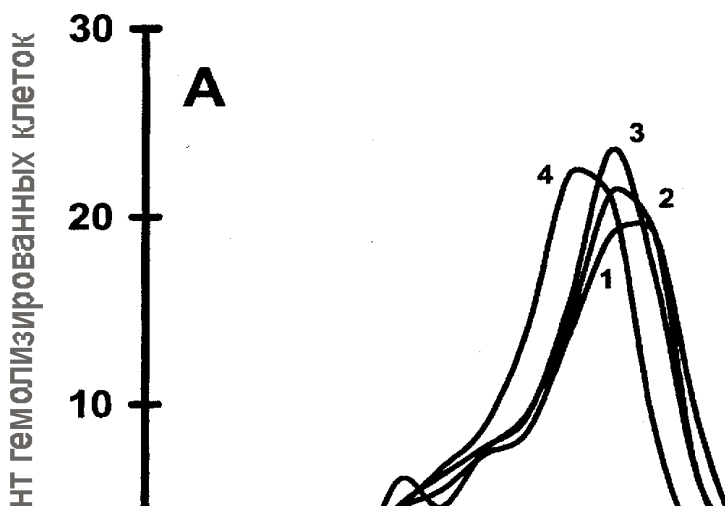
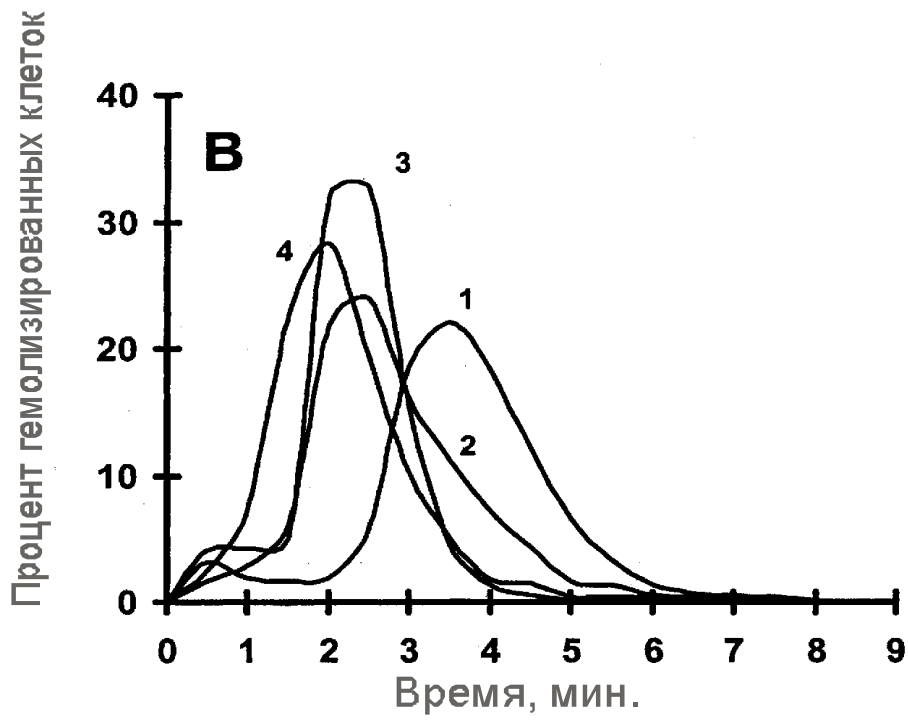
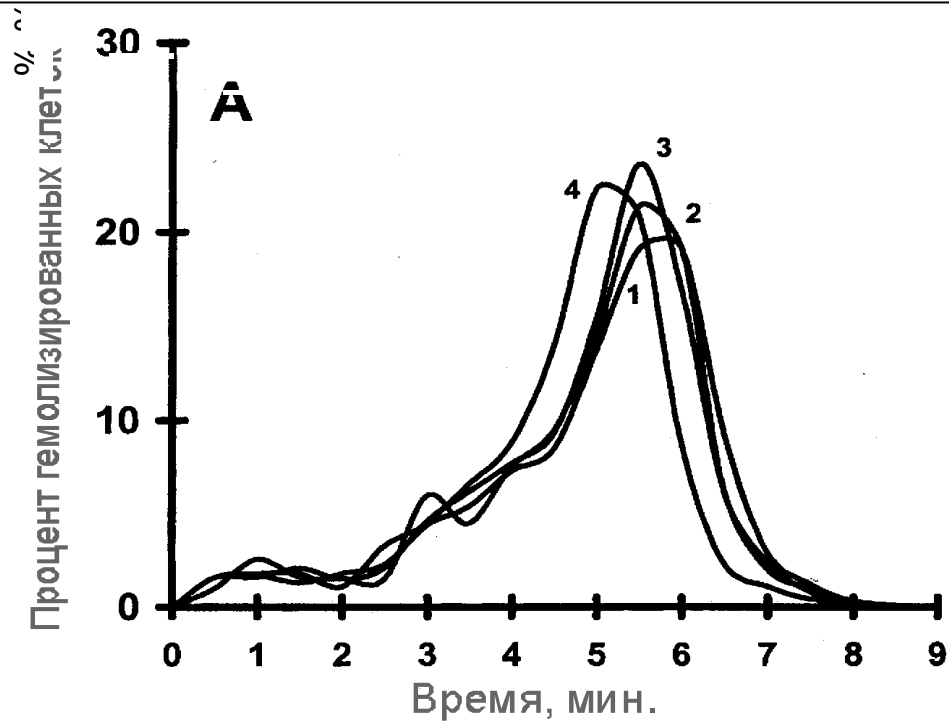
Устойчивость эритроцитов к гемолитическому воздействию определяется многими факторами, в том числе - возрастом клеток и состоянием их клеточной мембраны. Поскольку действие различных по своей природе гемолитических агентов зависит от исходного состояния эритроцитарной мембраны, ее подверженность гемолизу может служить интегральным показателем жизнеспособности клеток. Известно, что при алкоголизме наблюдается снижение устойчивости эритроцитов и развитие анемии [Chi L.M., Wu W.G., 1991]. В настоящее время не ясно, является ли этот феномен результатом прямого

воздействия этанола на клетки крови, или же он опосредованно реализуется за счет продуктов его окислительного метаболизма.

Нами проведено исследование влияния этанола и ацетальдегида на гемолитическую устойчивость эритроцитов кролика в условиях кислотного или окислительного гемолиза. Для характеристики устойчивости эритроцитов к разным окислителям было проведено сравнение эффектов гипохлорита натрия ( $\text{NaOCl}$ ), перекиси водорода, гидроксид-радикалов, образующихся в ходе реакции Фентона, индуцируемой добавлением к перекиси водорода ионов двухвалентного железа, а также  $\text{NO}$ -радикала, генерация которого осуществлялась в ходе спонтанного разложения  $\text{SIN-1}\gamma\text{CD}$  в водной среде. Наиболее эффективным из перечисленных окислителей оказался  $\text{NaOCl}$ , который в концентрации  $0,2 \text{ мМ}$  вызывал полный гемолиз клеток за 4 мин, тогда как в присутствии  $1,5 \text{ мМ}$   $\text{SIN-1}\gamma\text{CD}$  гемолиз продолжался в течение 20 мин. Перекись водорода в концентрации  $2 \text{ мМ}$  и смесь перекиси водорода ( $2 \text{ мМ}$ ) с сульфатом железа ( $0,04 \text{ мМ}$ ) (реакция Фентона) не вызывали заметных изменений оптической плотности образца в течение 10 мин наблюдения. После трехкратного отмывания эритроцитов от примеси плазмы клетки претерпевали частичный гемолиз (на 40%) при протекании реакции Фентона. Последующее добавление в кювету  $\text{HCl}$  в конечной концентрации  $1 \text{ М}$  приводило к быстрому гемолизу оставшихся эритроцитов. Таким образом, большая часть клеток в этих условиях оставалась в нативном состоянии. Это позволило заключить, что мембраны эритроцитов обладают устойчивостью к повреждающему действию перекиси водорода и гидроксид-радикалов, но чувствительны к  $\text{NO}^{\bullet}$  и особенно к  $\text{NaOCl}$ .

Мы сравнили влияние этанола на гемолиз эритроцитов кролика под действием  $2 \text{ мМ}$   $\text{HCl}$  или  $0,2 \text{ мМ}$   $\text{NaOCl}$ , вызывающих, соответственно, кислотный и окислительный гемолиз. Кислотные эритрограммы контрольных эритроцитов, полученных от разных особей животных, были хорошо воспроизводимы. Усредненные величины  $T_{\text{max}}$  и  $\%_{\text{max}}$  (которые, соответственно, представляют собой время достижения максимальной скорости гемолиза (в мин) и количество клеток (в %), подвергающихся гемолизу с максимальной скоростью) для них составляли  $5,5 \pm 0,5$  мин и  $21 \pm 4\%$ . Эритрограммы гемолиза, индуцированного  $\text{NaOCl}$ , были хорошо воспроизводимы в течение эксперимента, но отличались более выраженными колебаниями  $T_{\text{max}}$  и  $\%_{\text{max}}$  у разных кроликов. Их усредненные величины составляли соответственно  $2,4 \pm 1,2$  мин и  $32 \pm 10\%$ . Для сравнения результатов данные  $T_{\text{max}}$  и  $\%_{\text{max}}$ , полученные в каждом эксперименте, нормализовали, выражая в процентах от величин, полученных для контрольных проб. Действие этанола на состояние эритроцитов в ходе кислотного или окислительного гемолиза в наших экспериментах оказалось различным. Влияние этанола в диапазоне концентраций  $0,1-0,5\%$  ( $17-85 \text{ мМ}$ ) на состояние клеток в ходе кислотного гемолиза было слабо выражено и проявлялось только после преинкубации с этанолом в течение 1 ч (рис. 1А).

Эффект этанола заключался в уменьшении устойчивости эритроцитов к гемолизу (снижение  $T_{\text{max}}$ ) и в возрастании доли клеток, подвергающихся гемолизу с максимальной скоростью (увеличение  $\%_{\text{max}}$ ). Последнее обстоятельство отражало уменьшение гетерогенности (дисперсии распределения) эритроцитов по отношению к гемолитическому фактору. Действие этанола на эритроциты при окислительном гемолизе в том же диапазоне концентраций проявлялось сразу после его добавления к клеточной суспензии и также выражалось в уменьшении  $T_{\text{max}}$  и увеличении  $\%_{\text{max}}$  (рис. 1Б).



При преинкубации клеток с этанолом в течение 1 ч этот эффект становился более существенным. Это позволило предположить, что продукты метаболизма этанола вносят дополнительный вклад в модификацию мембраны эритроцитов. Основным продуктом окислительного метаболизма этанола в организме является ацетальдегид. Алкогольдегидрогеназа, осуществляющая окисление этанола до ацетальдегида, в эритроцитах отсутствует [Zorzano A. et al., 1989]. Однако ту же реакцию может осуществлять присутствующая в них каталаза, активность которой в эритроцитах достаточно высока [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1989]. Для выяснения возможного вклада ацетальдегида в уменьшение гемолитической устойчивости эритроцитов, мы сравнили его действие с действием этанола в примерно той же процентной концентрации. Оказалось, что 0,25% (55 мМ) ацетальдегид не оказывает достоверного влияния на чувствительность эритроцитов к кислотному гемолизу. На окислительный гемолиз эритроцитов ацетальдегид оказывал похожий по характеру, но более слабый, чем этанол, эффект (рис. 2).

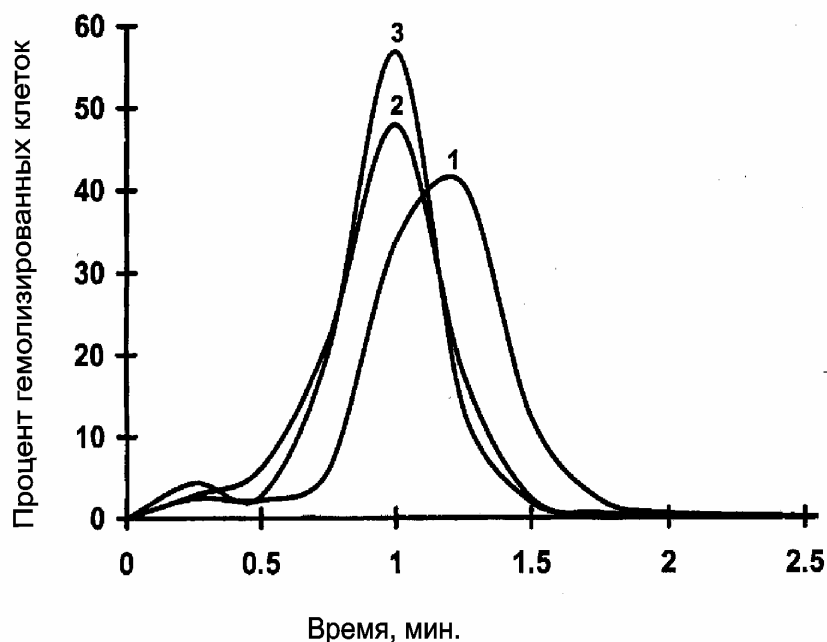


Рис. 2. Влияние ацетальдегида на устойчивость эритроцитов к гемолизу, индуцированному 0,2 мМ NaOCl (дифференциальная форма кривых). 1 – контроль, 2 – добавление 0,25% ацетальдегида к суспензии эритроцитов непосредственно перед индукцией гемолиза, 3 – преинкубация суспензии эритроцитов в течение 1 ч с 0,25% ацетальдегидом. По оси абсцисс – время с момента индукции гемолиза, по оси ординат – количество клеток, гемолизированных за указанный промежуток времени.

Максимальное влияние ацетальдегида на гемолитическую устойчивость эритроцитов ( $T_{max}$ ) реализуется сразу после его добавления к клеточной суспензии, а дальнейшие изменения устойчивости клеток в ходе их преинкубации с ацетальдегидом касаются только характера распределения эритроцитов по

устойчивости, который отражает параметр  $\%_{\max}$ . Таким образом, клеточная популяция в целом в ходе преинкубации с ацетальдегидом становится более уязвима к действию окислителя.

Опыты с эритроцитами, в которых активность каталазы была заингибирована 3-аминотриазолом, проводили с клетками, тщательно отмытыми от примесей ингибитора. Процедура отмывки клеток приводила к дестабилизации эритроцитов. В табл. 1 представлены данные о влиянии этанола на гемолитическую устойчивость эритроцитов кролика с активной или неактивной каталазой. Клетки инкубировали с 0,5% этанолом в течение 1 ч до проведения гемолиза. За 100% были приняты контрольные величины  $T_{\max}$  и  $\%_{\max}$  для клеток, не преинкубированных с этанолом. Для эритроцитов с активной каталазой эти величины составили  $4,5 \pm 0,25$  мин и  $27 \pm 5\%$  в условиях кислотного гемолиза, и  $27 \pm 5$  сек и  $20 \pm 4\%$  в условиях окислительного гемолиза. Соответствующие контрольные величины  $T_{\max}$  и  $\%_{\max}$  для клеток с инактивированной каталазой были равны  $4,0 \pm 0,25$  мин,  $25 \pm 3\%$  в условиях кислотного гемолиза, и  $25 \pm 5$  сек,  $27 \pm 5\%$  в условиях окислительного гемолиза, что достоверно не отличалось от соответствующих показателей эритроцитов с активной каталазой.

Таблица 1.

Влияние этанола на параметры, характеризующие гемолитическую устойчивость эритроцитов кролика с активной или неактивной каталазой.

Условия гемолиза	Активность каталазы	$T_{\max}$ (% от контроля)	$\%_{\max}$ (% от контроля)
Кислотный	Активна	$89,8 \pm 1,4^*$	$95,3 \pm 4,3$
	Неактивна	$82,7 \pm 7,7^*$	$114,3 \pm 12,7$
Окислительный	Активна	$94,5 \pm 3,4^*$	$168,9 \pm 33,0^*$
	Неактивна	$112,0 \pm 11,5$	$75,2 \pm 5,9^*$

Примечание: представлены средние величины, полученные в 7 независимых экспериментах. Данные представлены в % от контрольных величин, \* - различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

При кислотном и окислительном гемолизе клеток с активной или неактивной каталазой величины  $T_{\max}$  и  $\%_{\max}$  под влиянием этанола изменяются по-разному. Так, обработка этанолом обоих типов клеток приводила к значительному снижению  $T_{\max}$  и не влияла на  $\%_{\max}$  при кислотном гемолизе. Однако при окислительном гемолизе инкубация эритроцитов с этанолом приводила к менее значительному снижению  $T_{\max}$ , но существенному повышению  $\%_{\max}$  в клетках с активной каталазой, в то время как в клетках с ингибированной каталазой наблюдалось достоверное снижение  $\%_{\max}$  при незначительном повышении  $T_{\max}$ . Таким образом, в условиях кислотного гемолиза, когда каталаза не активна, этанол продолжает оказывать дестабилизирующий эффект на эритроциты. Следовательно, этот дестабилизирующий эффект этанола не связан с его превращением под действием каталазы, а скорее всего обусловлен прямым действием неметаболизированного этанола на эритроцитарную мембрану или другие клеточные компоненты. В условиях окислительного гемолиза эффект этанола на эритроциты обусловлен главным образом действием продуктов окислительного метаболизма этанола. Это подтверждают данные, полученные в экспериментах с преинкубацией эритроцитов с этанолом, каталаза которых неактивна (табл. 1), которые свидетельствуют о том, что в условиях, когда продукция ацетальдегида нарушена путем ингибирования каталазы, чувствительность эритроцитов к окислительному гемолизу снижается.



(наблюдается некоторое повышение  $T_{max}$  и существенное снижение  $\%_{max}$ ). Можно предположить, что дестабилизирующий эффект этанола на эритроциты в условиях окислительного гемолиза обусловлен, в частности, накоплением свободных радикалов в процессе окисления этанола и последующим перекисным окислением мембранных липидов и белков [Halliwell.B., Gutteridge J.M.C., 1999; Reinke L.A. et al., 1997]. Ацетальдегид, образующийся в процессе функционирования каталазы, может быть одним из факторов, снижающих устойчивость клеток к окислительному гемолизу, поскольку прямой дестабилизирующий эффект ацетальдегида на эритроциты в этих условиях также был обнаружен (рис. 2).

## **1.2. Влияние этанола и ацетальдегида на эритроцитарные белки.**

Следующим этапом работы было сопоставление влияния 85 мМ этанола, а также ацетальдегида и глутарового альдегида в концентрациях 5 и 50 мМ, на устойчивость эритроцитов кролика к окислительному гемолизу, морфологию клеток и эритроцитарные белки. Как показано выше, инкубация эритроцитов с 85 мМ этанолом приводит к снижению устойчивости клеток к действию гемолитиков. При этом изменений в состоянии эритроцитарных белков, как и нарушения морфологии клеток, мы не обнаружили.

По данным литературы ацетальдегид способен модифицировать белки, взаимодействуя, в частности, с их свободными аминогруппами [Gaines K.C. et al., 1977]. Мы провели исследование влияния ацетальдегида на белковый состав эритроцитов. Аналогичные исследования были проведены с глутаровым альдегидом, который, благодаря наличию двух альдегидных групп, является «сшивающим» агентом, часто используемым в экспериментах для кросс-линкинга белков [Steck N.L., 1972]. Инкубация эритроцитов с 5 или 50 мМ ацетальдегида делает эритроциты менее устойчивыми к действию NaOCl. В присутствии 50 мМ ацетальдегида это действие более выражено. Ни 5 мМ, ни 50 мМ ацетальдегид *in vitro* не нарушали морфологию эритроцитов. Глутаровый альдегид в тех же условиях повышал устойчивость эритроцитов к гемолизирующему действию гипохлорита натрия и приводил к существенному нарушению формы клеток.

При электрофорезе белков эритроцитов в ПААГ мы обнаружили, что обработка мембран эритроцитов кролика как 5 мМ, так и 50 мМ ацетальдегида не приводит к появлению новых полос, соответствующих высокомолекулярным белкам, то есть процесса кросс-линкинга не происходит. В то же время такая обработка затрудняет экстракцию спектрина и актина из мембран эритроцитов (рис. 3). Глутаральдегид, как и ацетальдегид, затрудняет экстракцию спектрина и актина из теней эритроцитов, кроме того, он индуцирует процесс кросс-линкинга эритроцитарных белков (рис. 3). На электрофореграмме белков мембран, обработанных глутаровым альдегидом, видны полосы, соответствующие высокомолекулярным белкам, которые не обнаруживаются ни в контроле, ни после обработки мембран ацетальдегидом. Полученные данные позволяют предположить, что кросс-линкинг эритроцитарных белков может приводить к нарушению морфологии клеток.

При исследовании окислительной модификации белков эритроцитов человека под влиянием этанола и ацетальдегида *in vitro* было обнаружено, что инкубация эритроцитов с этанолом в диапазоне концентраций 0,1-0,5% в течение 1 ч не приводит к каким-либо изменениям уровня карбонилирования эритроцитарных белков. Можно предположить, что повреждающее действие этанола на эритроциты реализуется, в основном, через его действие на липидную компоненту мембран.

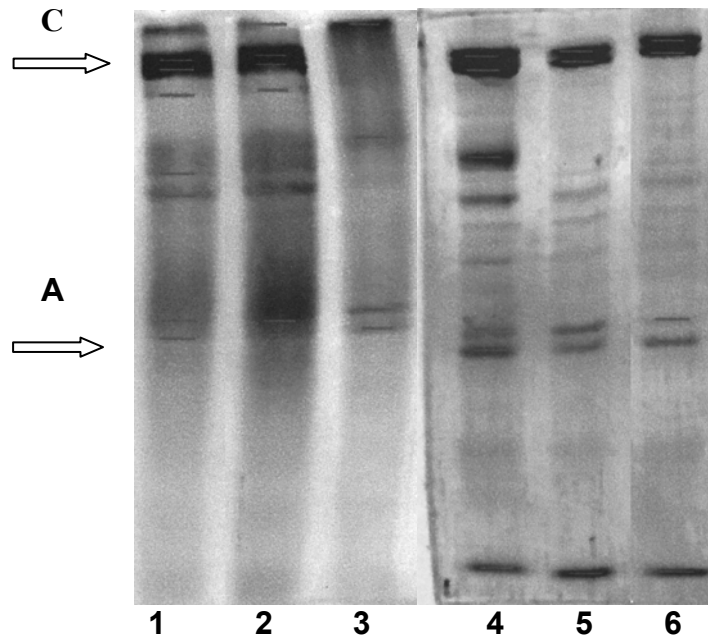


Рис. 3. Влияние ацетальдегида и глутаральдегида на белки эритроцитов. Электрофореграммы белков мембран эритроцитов после экстракции спектрина и актина (дорожки 1-3) и экстрактов спектрина и актина (дорожки 4-6). Дорожки 1 и 4 – без обработки мембран. Дорожки 2 и 5 – после обработки мембран эритроцитов ацетальдегидом (5 мМ). Дорожки 3 и 6 – после обработки мембран глутаральдегидом (5 мМ). С, А – указывают расположение полос спектрина и актина в гелях, соответственно.

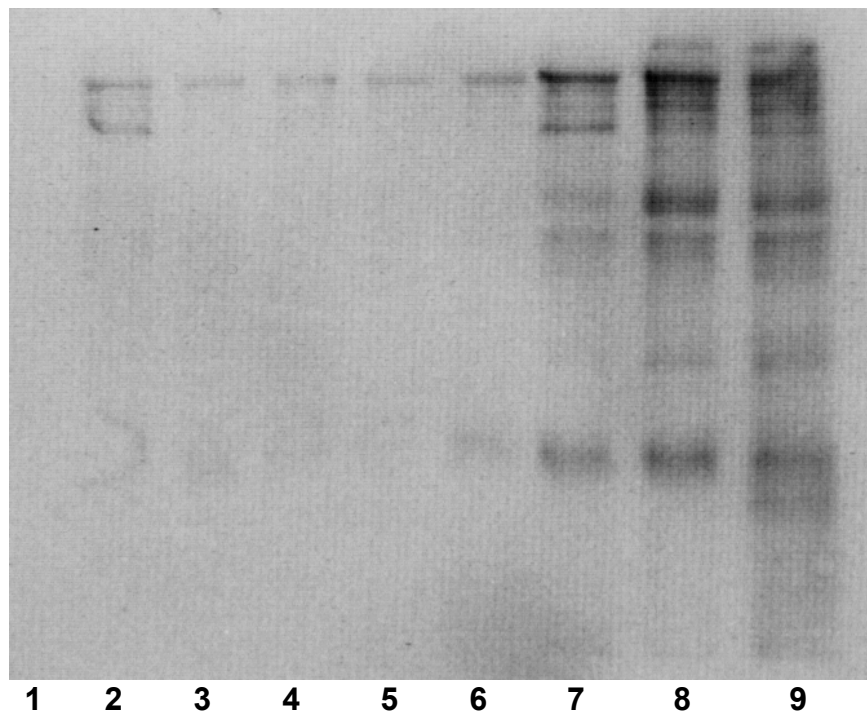


Рис. 4. Результаты Вестерн-блот анализа, проведенного с использованием антител против DNP-меченных по карбонилам белков. Препараты белков теней эритроцитов здорового донора после инкубации с ацетальдегидом. 1,2,3 - контроль, без АцА; 4,5,6 - 0,05% АцА; 7,8,9 – 0,25% АцА. 4 и 7 – время инкубации с АцА 1 час; 5 и 8 – время инкубации с АцА 6 час; 6 и 9 – время инкубации с АцА 18 час.

В то же время после инкубации эритроцитов с ацетальдегидом (0,05% и 0,25%) наблюдалось увеличение карбониллов белков. Уровень окислительной модификации белков эритроцитов под действием ацетальдегида зависит от концентрации и времени его воздействия (рис.4).

Таким образом, окислительная модификация белков эритроцитов под действием ацетальдегида при отсутствии кросс-линкинга белков приводит к снижению гемолитической устойчивости клеток к действию NaOCl, при этом морфология клеток не нарушается. Модификация белков под действием глутаральдегида, приводящая к «сшивке» белков, существенно повреждает форму эритроцитов.

Молекулярный механизм снижения гемолитической устойчивости эритроцитов под действием этанола, вероятно, связан главным образом с изменением не белковой, а липидной компоненты эритроцитарных мембран, поскольку преинкубация клеток с этанолом не приводит к заметным изменениям в белковом спектре и окислительном статусе белков эритроцитов.

### **I.3. Влияние этанола и ацетальдегида на микровязкость мембран эритроцитов.**

Для характеристики эффектов этанола и ацетальдегида на микровязкость мембран эритроцитов мы использовали метод флуоресцентного анализа. В качестве флуоресцентного зонда был использован пирен - неполярное соединение, молекулы которого распределяются в гидрофобном компартменте мембраны и способны образовывать эксимеры. Степень эксимеризации пирена ( $F_{470}/F_{392}$ ) зависит от микровязкости гидрофобного окружения и может служить ее характеристикой. Наши исследования показали, что инкубация теней эритроцитов здоровых доноров в течение 30 мин как с этанолом (в концентрациях 0,25% и 0,5%), так и с ацетальдегидом (в концентрациях 0,1% и 0,25%) приводит к увеличению степени эксимеризации пирена (табл. 4), то есть к снижению микровязкости липидного матрикса эритроцитарных мембран.

Таким образом, снижение микровязкости гидрофобной области мембран эритроцитов без изменения белков мембранного каркаса под действием этанола приводит к дестабилизации клеток в условиях как кислотного, так и окислительного гемолиза. Снижение микровязкости гидрофобной области мембран эритроцитов с одновременной модификацией белков под действием ацетальдегида дестабилизирует клетки только в условиях окислительного гемолиза, устойчивость эритроцитов к гемолизирующему действию кислоты при этом не изменяется.

### **I.4. Роль этиловых эфиров жирных кислот в повреждении мембран эритроцитов.**

В эритроцитах синтеза этиловых эфиров жирных кислот (ЭЭЖК) не происходит [Gorski N.P. et al., 1996; Saghir M. et al., 1999]. Однако, как было показано Doyle K.M. et.al. (1994), употребление этанола приводит к повышению уровня ЭЭЖК в сыворотке крови человека. ЭЭЖК являются липофильными соединениями. Поэтому, при повышении их уровня в крови в результате хронического поступления этанола в организм человека, эти метаболиты неокислительного превращения этанола могут взаимодействовать с мембранами эритроцитов, приводя к модификации структуры и функции клеток крови. Наши исследования *in vitro* показали, что инкубация эритроцитов с этиловыми эфирами линоленовой (ЭЭЛК) и пальмитиновой (ЭЭПК) кислот в течение 24 ч приводит к встраиванию обоих соединений в мембрану эритроцитов (табл. 2).

Таблица 2.

Содержание этиловых эфиров линоленовой (ЭЭЛК) и пальмитиновой (ЭЭПК) жирных кислот в мембранах эритроцитов здоровых доноров после 24 часовой инкубации эритроцитов в присутствии 100 мкМ ЭЭЖК *in vitro*.

Этиловый эфир жирной кислоты	Концентрация в мембране (мкг эфира/мг белка)
Без ЭЭЖК	Не определяется (n=6)
ЭЭЛК	0,95±0,021 (n=4)
ЭЭПК	1,25±0,051 (n=6)

Примечание: n – количество доноров.

Анализ спонтанного гемолиза эритроцитов после их преинкубации с ЭЭЖК обнаружил значительное снижение стабильности эритроцитов после встраивания в их мембрану как ЭЭЛК, так и ЭЭПК. При инкубации эритроцитов с ЭЭЖК в присутствие физиологических концентраций альбумина (40 мг/мл) – белка, который способен связывать ЭЭЖК в крови, - дестабилизирующий эффект ЭЭЖК на клетки снижался, однако все еще достоверно выявлялся (рис. 5).

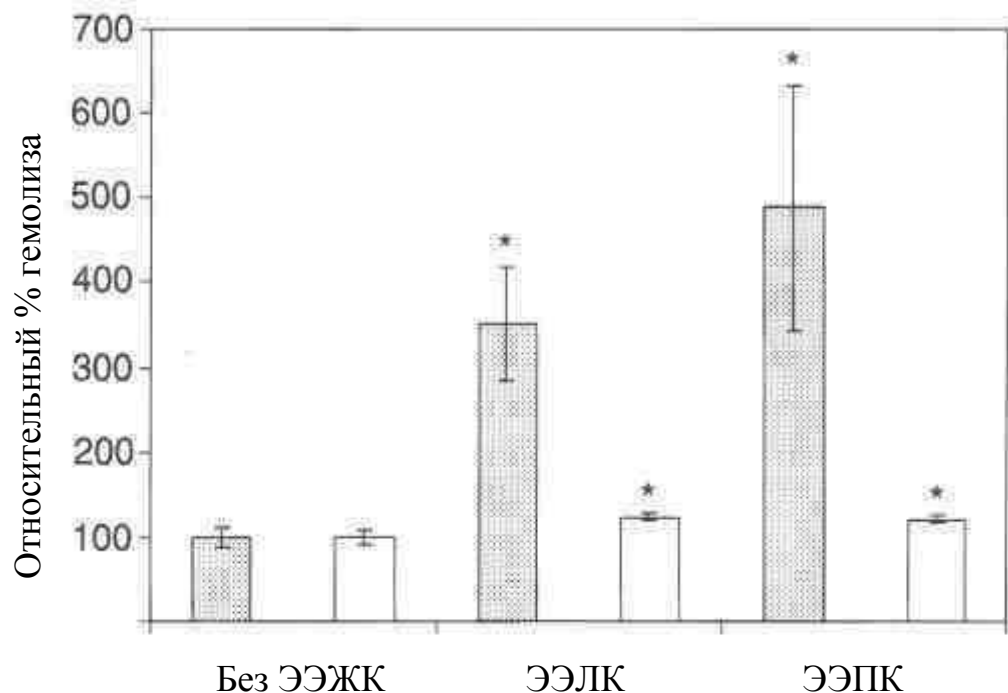


Рис. 5. Влияние ЭЭЖК на спонтанный гемолиз эритроцитов человека. Представлены данные эффектов инкубации эритроцитов со 100 мкМ этиловых эфиров линоленовой (ЭЭЛК) и пальмитиновой (ЭЭПК) жирных кислот в течение 24 часов без альбумина (серые столбики) и с альбумином (40 мг/мл) (светлые столбики). Уровень гемолиза эритроцитов в контроле (без ЭЭЖК) составлял 0,64±0,04% и был принят за 100%. \* - различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

Снижение стабильности эритроцитов может сопровождаться нарушением асимметрии распределения фосфатидилсерина между внутренним и внешним монослоями мембраны, а именно, может происходить перераспределение фосфатидилсерина с внутренней поверхности липидного бислоя на наружную [Diaz C. et al., 1996; Kuypers F.A. et al., 1998]. Встраивание липофильных ЭЭЖК в мембрану эритроцита может являться одной из причин такого перераспределения. Действительно, наши исследования методом флуориметрии с помощью флуоресцеинизотиоцианат-меченного аннексина V показали, что при инкубации эритроцитов с ЭЭЛК уровень наружного фосфатидилсерина достоверно возрастал на 14%, а с ЭЭПК – на 4% ( $p < 0,05$ ). При этом морфология клеток не изменялась.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* обнаружено, что этиловые эфиры жирных кислот, в силу своей липофильности, способны встраиваться в биомембраны, индуцируя при этом перераспределение фосфатидилсерина между внутренним и внешним монослоями липидного бислоя и дестабилизируя клетки, не нарушая при этом их морфологию.

## **II. Динамика структурно-функциональных параметров эритроцитов больных алкоголизмом в процессе традиционной дезинтоксикационной терапии.**

Как показали эксперименты с нормальными эритроцитами и их мембранами *in vitro*, этанол и его метаболиты – ацетальдегид и этиловые эфиры жирных кислот – способны оказывать повреждающее действие на клеточные мембраны. Дальнейшим этапом работы было изучение особенностей структурно-функционального статуса эритроцитов больных алкоголизмом, то есть оценка эффекта этанола и его метаболитов на эритроциты *in vivo*. По данным литературы у больных алкоголизмом в состоянии абстиненции часто наблюдается явление пойкилоцитоза, развивается макроцитоз [Gil E.B., et al., 1989; Homaidan F.R., et al., 1986]. Изменение морфологии эритроцитов сопровождается снижением времени их жизни и развитием анемии [Chi L.M., Wu W.G., 1991; Bizzaro N., et al., 1993]. Мы провели оценку динамики структурно-функциональных характеристик эритроцитов больных алкоголизмом с давностью заболевания не менее пяти лет за период стационарного лечения (30-35 дней) методами традиционной дезинтоксикационной терапии.

### **II.1. Морфология эритроцитов больных алкоголизмом на разных стадиях лечения.**

С помощью методов световой и сканирующей электронной микроскопии у всех обследуемых больных алкоголизмом в период абстиненции были обнаружены более или менее выраженные изменения морфологии эритроцитов периферической крови.

На рис. 6 представлены микрофотографии эритроцитов здорового донора (рис. 6 А) и больного алкоголизмом в период абстиненции (рис. 6 Б). В целом у больных на фоне снижения количества нормальных двояковогнутых дискоцитов увеличивается число клеток с единичными и множественными выростами, конической формы с округлой вершиной, с гребнем, клеток в виде «спущенного мяча», плоского диска, а также эритроцитов куполообразной и сферической формы.

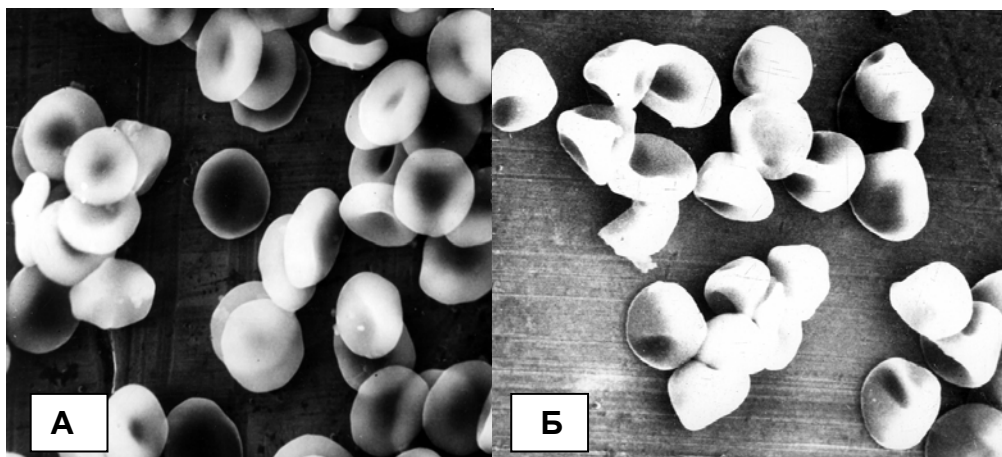


Рис. 6. Электронные микрофотографии эритроцитов периферической крови: А - здорового донора; Б – больного алкоголизмом II стадии в период абстиненции. (По данным сканирующей электронной микроскопии; увеличение в 1000 раз)

Статистический анализ показал, что у здоровых доноров количество нормальных клеток (дискоцитов) составляет  $87,2 \pm 5,0\%$  ( $n=12$ ), у больных алкоголизмом в состоянии абстиненции это количество было достоверно меньше -  $66,8 \pm 7,6\%$  ( $n=15$ ),  $p < 0,025$ . У больных, находящихся в состоянии формирования ремиссии после лечения, процент нормальных клеток повышается до  $74,8 \pm 5,1\%$  ( $n=11$ ), однако остается достоверно ниже нормы ( $p < 0,025$ ).

## II.2. Гемолитическая устойчивость эритроцитов больных алкоголизмом на разных стадиях лечения.

Оценку стабильности эритроцитов больных алкоголизмом проводили методом кислотных эритрограмм [Терсков И.А., Гительзон И.И., 1957]. Кислотная эритрограмма здоровых доноров достаточно стабильна и хорошо воспроизводима. Основные средние параметры эритрограмм здоровых доноров и больных алкоголизмом в стадии абстиненции и в стадии формирования ремиссии представлены в табл. 3.

Таблица 3.

Основные параметры эритрограмм здоровых доноров и больных алкоголизмом на разных стадиях лечения

Доноры	n	$T_{\max}$ , мин	$\%_{\max}$ , %
Здоровые	15	$3,54 \pm 0,14$	$21,35 \pm 2,28$
Больные в стадии абстиненции	17	$3,20 \pm 0,27$	$23,10 \pm 2,10$
Больные в стадии формирования ремиссии	15	$3,40 \pm 0,40$	$21,50 \pm 2,20$

Примечание: n – количество обследованных доноров.

У больных алкоголизмом в состоянии абстиненции наблюдается тенденция к сдвигу эритрограммы влево – несколько снижается  $T_{\max}$  и повышается  $\%_{\max}$ . И хотя этот сдвиг не является достоверным ( $p > 0,05$ ), можно предполагать, что в данной группе доноров доля эритроцитов со сниженной устойчивостью к гемолизирующему действию кислоты повышена. После лечения больных (в стадии формирования ремиссии) средние параметры их эритрограмм практически не отличаются от контрольных (табл. 3), что свидетельствует о повышении

стабильности основной массы эритроцитов у больных алкоголизмом за время лечения.

### **II.3. Белки эритроцитов больных алкоголизмом**

Методом ЭФ в ПААГ мы исследовали белковый состав мембран эритроцитов здоровых доноров и больных алкоголизмом. В тенях эритроцитов больных алкоголизмом, полученных из эритроцитов с патологически измененной формой, были выявлены высокомолекулярные белки, которые не обнаруживались в образцах теней, полученных из морфологически нормальных эритроцитов (рис. 7А). Появление высокомолекулярных белков в мембранах эритроцитов может свидетельствовать о кросс-линкинге белков. Качественная оценка уровня карбонилирования белков эритроцитов методом Вестерн-блот показала, что степень окислительного повреждения белков в клетках больных алкоголизмом с нарушенной морфологией существенно выше, чем в клетках больных с нормальной морфологией или клетках здоровых доноров (рис. 7Б).

Вероятно, при совместном хроническом воздействии *in vivo* этанол и ацетальдегид в повышенных концентрациях способны приводить к кросс-линкингу белков и их окислительной модификации, а также к изменению физико-химического состояния фосфолипидного бислоя эритроцитов. Сочетание этих эффектов может быть одной из причин нарушения морфологии и снижения стабильности клеток при алкоголизме. В то же время при данном заболевании нельзя не учитывать роль других факторов, таких, в частности, как нарушение кислотно-щелочного равновесия и изменение реологических свойств крови, нарушение ионных обменных процессов (Умудов Х.М., 1987; Elgsaeter A. et al., 1986), повышение степени неэффективного эритропоэза (Сычева В.А., 1975; Шапиро Ю.Л. и соавт., 1983; Яковченко В.А. и соавт., 1987) и др., которые *in vivo* также вносят существенный вклад в нарушение формы эритроцитов и снижение их стабильности.

### **II.4. Микровязкость мембран эритроцитов больных алкоголизмом на разных этапах лечения: влияние этанола и ацетальдегида.**

Одной из причин появления в кровеносном русле трансформированных эритроцитов, находящихся на различных стадиях онтогенеза (способные к обратной трансформации в дискоциты переходные формы, необратимо трансформированные предгемолитические и дегенеративно измененные эритроциты), является модификация липидной фазы эритроцитарной мембраны, изменение ее микровязкости.

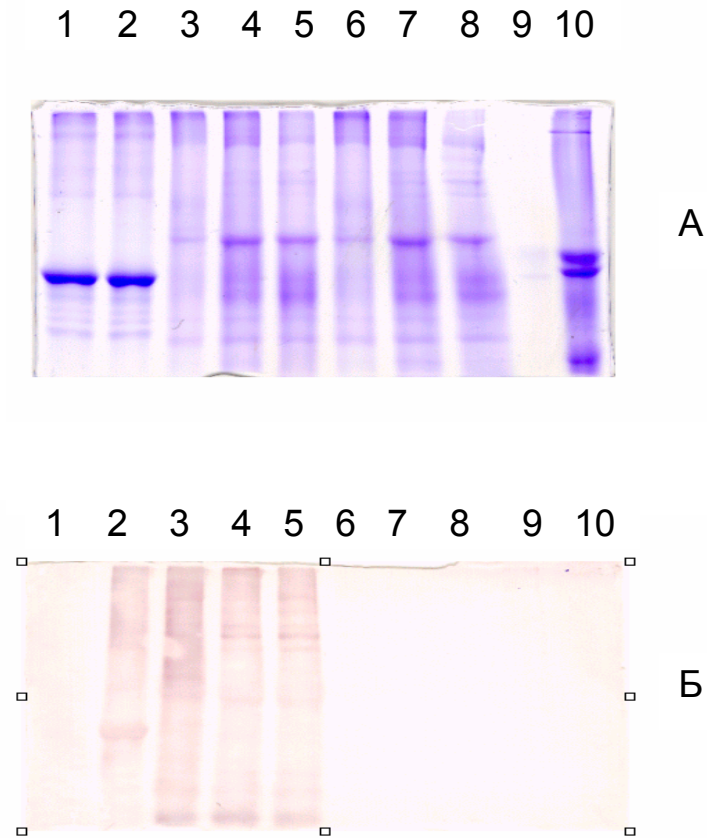


Рис. 7. Анализ белкового состава препаратов методом ЭФ в ПААГ (А) и результат последующего Вестерн-блот анализа, проведенного с использованием антител против DNP-меченных белков (Б). 1 - окисленный бычий сывороточный альбумин (ОБСА), обработанный раствором, не содержащим DNP (-DNP); 2 – ОБСА, обработанный раствором, содержащим DNP (+DNP); 3 – тени морфологически измененных эритроцитов больного алкоголизмом (+ DNP); 4 – тени морфологически нормальных эритроцитов больного алкоголизмом (+ DNP); 5 – тени эритроцитов здорового донора (+ DNP); 6 – то же, что и 3 (- DNP); 7 – то же, что и 4 (- DNP); 8 – то же что и 5 (- DNP); 9 – коммерческий препарат смеси стандартных белков (- DNP); 10 – смесь стандартных белков (тироглобулин 330 кДа, ферритин 220 кДа, альбумин 67 кДа, каталаза 60 кДа, лактатдегидрогеназа 36 кДа) (-DNP).



Мы провели исследование микровязкости мембран эритроцитов больных алкоголизмом в состояниях абстиненции и формирования ремиссии с помощью флуоресцентного зонда пирена. Оказалось, что степень эксимеризации пирена в мембранах эритроцитов больных алкоголизмом достоверно снижена по сравнению с мембранами здоровых доноров (табл. 4). Это свидетельствует о более плотной упаковке жирнокислотных цепей липидов в эритроцитарных мембранах пациентов, о повышенной жесткости этих биомембран по сравнению с нормой. Полученный нами факт хорошо согласуется с данными литературы [Beauge F. et al., 1987; Miller N.S., 1990].

Таблица 4.  
Влияние этанола и ацетальдегида на степень эксимеризации пирена ( $F_{470}/F_{392}$ ) в тенях эритроцитов разных групп доноров.

Обследованные группы	Контроль	Этанол		Ацетальдегид	
		0,25%	0,50%	0,10%	0,25%
Здоровые доноры	1,10±0,11 (8)	1,28±0,04* (5)	1,30±0,03* (8)	1,35±0,04* (3)	1,31±0,03* (8)
Больные в стадии абстиненции	0,69±0,10 <sup>#</sup> (5)	0,78±0,11 <sup>#</sup> (3)	0,81±0,07 <sup>#</sup> (3)	0,69±0,16 <sup>#</sup> (3)	0,74±0,15 <sup>#</sup> (3)
Больные в стадии формирования ремиссии	0,74±0,08 <sup>#</sup> (9)	0,84±0,09 <sup>#</sup> (8)	0,97±0,10* <sup>#</sup> (7)	0,85±0,12 <sup>#</sup> (4)	0,71±0,14 <sup>#</sup> (4)

Примечание: в скобках указано количество обследованных доноров, <sup>#</sup> - различия достоверны по сравнению с соответствующей группой здоровых доноров,  $p < 0,025$ , \* - различия достоверны по сравнению с соответствующим контролем,  $p < 0,05$ .

Степень эксимеризации пирена в мембранах больных, находящихся в состоянии формирования ремиссии, несколько повышена по сравнению с этим показателем у больных в состоянии абстиненции. И хотя достоверной разницы между этими группами больных мы не обнаружили, видно, что по мере перехода больного из состояния абстиненции в состояние ремиссии под влиянием проводимых дезинтоксикационных мероприятий наблюдается тенденция к увеличению текучести липидного матрикса в их эритроцитах.

О том, что в процессе лечения пациента мембраны его эритроцитов изменяют свои свойства, свидетельствуют также результаты, полученные нами при сравнительном изучении влияния этанола и ацетальдегида на степень эксимеризации пирена в мембранах здоровых доноров и больных в состоянии абстиненции и формирования ремиссии. Как уже говорилось выше, преинкубация мембран эритроцитов здоровых доноров с этанолом в концентрации 0,25 % и 0,50 % приводила к повышению степени эксимеризации пирена в этих мембранах; другими словами, этанол оказывал разупорядочивающее влияние на липидный бислой теней нормальных эритроцитов. Ацетальдегид в концентрациях 0,10 % и 0,25 % также приводил к достоверному повышению гидрофобного объема мембран эритроцитов здоровых доноров.

Липидный матрикс мембран эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции оказался не чувствительным к действию как этанола, так и ацетальдегида (табл. 4). Ни в одном случае, ни этанол, ни ацетальдегид в используемых концентрациях достоверного влияния на степень эксимеризации пирена в данных мембранах не оказывали. Эти результаты свидетельствуют об изменении физического состояния гидрофобной области мембран в данной группе пациентов и не противоречат данным литературы, согласно которым изменения липидного бислоя мембран в результате длительного действия этанола сводятся к тому, что мембрана адаптируется, изменяя обмен составляющих ее липидов, становясь более упорядоченной. В этом новом физическом состоянии мембрана устойчива к дальнейшему действию экзогенного алкоголя, «толерантна» к его эффектам и одновременно «зависима» от его присутствия [Chin G.H., Goldstein D.B., 1977].

Гидрофобная область мембран эритроцитов больных алкоголизмом, находящихся в стадии формирования ремиссии, оказалась чувствительной к 0,5% этанолу, то есть после лечения чувствительность липидного матрикса к хаотропному действию этанола частично восстанавливается. Однако ацетальдегид достоверного влияния на микровязкость мембран больных данной группы не оказывал (табл. 4). По данным литературы [Latge C. et al., 1987] воздействие ацетальдегида на липидный матрикс лишь частично повторяет таковое этанола. Наши результаты находятся в соответствии с этими данными: мембраны эритроцитов больных алкоголизмом, модифицированные под влиянием хронической алкоголизации и ставшие не чувствительными к воздействию как этанола, так и ацетальдегида, в результате проведенного лечения вновь приобретают чувствительность к сольбилизирующему действию этанола, оставаясь при этом не чувствительными к действию ацетальдегида.

Таким образом, этанол, как и ацетальдегид, способен снижать микровязкость мембран эритроцитов здоровых доноров. Хроническая алкоголизация приводит к изменениям физико-химического состояния мембран эритроцитов, в результате чего мембраны становятся не чувствительными к сольбилизирующему действию как этанола, так и ацетальдегида. В процессе лечения пациентов мембраны их эритроцитов претерпевают изменения и вновь приобретают способность реагировать на добавленный этанол, однако чувствительность к ацетальдегиду у этих мембран не восстанавливается.

Одной из причин изменения микровязкости мембран эритроцитов больных алкоголизмом и снижения стабильности клеток могло бы быть накопление в клеточных мембранах этиловых эфиров жирных кислот. Для проверки этого предположения мы исследовали содержание ЭЭЖК в мембранах эритроцитов больных алкоголизмом. Нам не удалось обнаружить ЭЭЖК в мембранах эритроцитов больных алкоголизмом как в стадии абстиненции, так и в стадии формирования ремиссии. Таким образом, мы показали, что данный механизм повреждения мембран эритроцитов *in vivo* не реализуется.

## **II.5. Na/K-АТФаза эритроцитов больных алкоголизмом на разных этапах лечения: изменение чувствительности к ионам магния.**

Na/K-АТФаза является мембраносвязанным ферментом, активность которого в значительной степени зависит как от физического состояния липидного окружения, так и от электролитного состава окружающей мембрану жидкости. В норме электролитный состав плазмы крови и цитоплазматической жидкости сбалансирован. При алкоголизме водно-солевой баланс нарушается, изменяются как вне-, так и внутриклеточные концентрации калия, натрия, кальция, магния.

По данным литературы при хронической алкоголизации концентрация  $Mg^{2+}$  в сыворотке крови снижается [Ураков И.Г., 1986]. На культуре гладко-мышечных клеток сосудов головного мозга собаки было показано, что этанол содействует быстрому истощению внутриклеточного свободного  $Mg^{2+}$ . Введение  $Mg^{2+}$ -содержащих препаратов животным защищает их от повреждений, обусловленных действием высоких доз этанола [Altura B.M. et al., 1995]. Эффективность магний-содержащих препаратов продемонстрирована и в клинике алкоголизма [DePetrillo P., Peterson D., 1992].

Известно, что  $Mg^{2+}$  является кофактором многих ферментативных реакций. В частности,  $Mg^{2+}$  необходим для Na/K-АТФазы, так как, с одной стороны, он участвует в образовании субстрата, которым является MgАТФ, с другой стороны,  $Mg^{2+}$  ускоряет переход фермента из  $E_1P$  в  $E_2P$  форму. Кроме того, магний оказывает существенное действие на структуру биомембран, изменяя эффективный гидрофобный объем и увеличивая подвижность жирнокислотных цепей липидов [Boldyrev A.A. et al., 1977]. Важная роль ионов магния для Na/K-АТФазы и дефицит этого катиона у больных алкоголизмом стали основанием для проведения опытов по изучению влияния разных концентраций магния на активность Na/K-АТФазы в эритроцитах больных алкоголизмом (данные эксперименты проведены *in vitro*).

Мы обнаружили, что у всех больных алкоголизмом II стадии в период абстиненции активность Na/K-АТФазы эритроцитов достоверно выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). Процент активации фермента оказался различным при разных концентрациях магния. В результате характер зависимости активности фермента от концентрации  $Mg^{2+}$  в среде инкубации в данной группе больных оказался измененным по сравнению с контролем (рис. 8).

На 5 - 7 день лечения пациентов (после купирования у них абстинентного синдрома) мы обнаружили достоверное повышение активности Na/K-АТФазы у больных по сравнению со здоровыми донорами лишь при 6 мМ  $MgCl_2$  (рис. 8). При этом характер зависимости АТФазы от концентрации ионов магния в среде инкубации оставался таким, как в период абстиненции.

После лечения на стадии формирования ремиссии активность Na/K-АТФазы эритроцитов пациентов практически не отличалась от нормы.

Ранее мы показали, что хроническое воздействие этанола на организм человека приводит к упорядочению структуры клеточных мембран, что обуславливает снижение их текучести и увеличение устойчивости к дезорганизующему действию этанола (табл. 4). С помощью флуоресцентного зонда пирена мы обнаружили, что магний увеличивает гидрофобный объем мембран эритроцитов больных алкоголизмом: с ростом концентрации ионов магния в среде инкубации увеличивалась и степень эксимеризации пирена. Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы [Boldyrev A.A. et al., 1977; Болдырев А.А., Твердислов В.А, 1978], в которых методом ЭПР с помощью гидрофобных спиновых зондов было показано, что в присутствии магния увеличивается подвижность жирнокислотных цепей липидов и гидрофобный объем биомембран.

Можно предположить, что в наших экспериментах с Na/K-АТФазой добавление хлористого магния в концентрации 3 мМ и 6 мМ к эритроцитам больных в состоянии абстиненции, когда микровязкость мембран клеток повышена, приводит к снижению их микровязкости, что отражается на активности Na/K-АТФазы. У здоровых доноров мембрана эритроцита исходно находится в другом физическом состоянии. По этой причине, вероятно, увеличение концентрации хлористого магния с 3 до 6 мМ практически не отражается на активности Na/K-АТФазы (рис. 8).

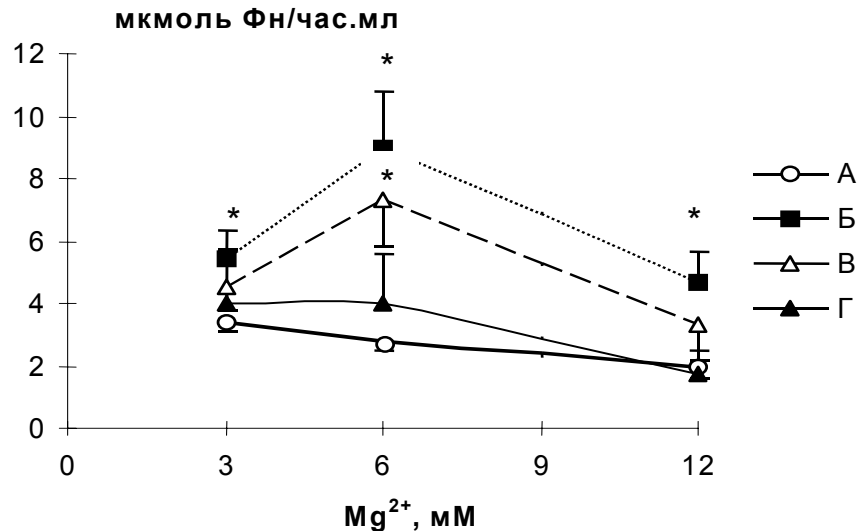


Рис. 8. Зависимость активности Na/K-АТФазы эритроцитов человека от концентрации  $Mg^{2+}$  в инкубационной среде. Концентрация АТФ во всех случаях – 2 мМ. А - здоровые доноры (n=19); Б - больные алкоголизмом до купирования абстинентного синдрома (n=33); В - больные алкоголизмом после купирования абстинентного синдрома (n=29); Г - больные алкоголизмом после лечения на стадии формирования ремиссии (n=25). \* - различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ; n – количество обследованных доноров.

Увеличение концентрации хлористого магния *in vitro* до 12 мМ (до концентраций, значительно превышающих физиологические) приводит к ингибированию Na/K-АТФазы во всех группах доноров. В данном случае, по-видимому, включаются дополнительные механизмы влияния ионов магния на активность рассматриваемого фермента.

Практически одинаковые  $Mg^{2+}$ -зависимости активности Na/K-АТФазы у здоровых доноров и доноров, больных алкоголизмом после лечения на стадии формирования ремиссии, свидетельствуют о существенном изменении свойств мембран и мембранных ферментов эритроцитов пациентов в процессе прохождения ими курса дезинтоксикационной терапии.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при хроническом влиянии этанола на организм в условиях тотального  $Mg^{2+}$ -дефицита возрастает чувствительность Na/K-АТФазы к данному катиону. В период ремиссии чувствительность Na/K-АТФазы к магнию возвращается к нормальному уровню. Один из способов реализации активирующего эффекта магния на Na/K-АТФазу при алкоголизме заключается в способности данного катиона повышать гидрофобный объем биомембран, что, вероятно, приводит к ускорению перехода фермента, являющегося интегральным мембранным белком, из одной формы ( $E_1P$ ) в другую ( $E_2P$ ) в течение ферментативного цикла.

Увеличение Na/K-АТФазы эритроцитов у больных в состоянии абстиненции косвенно свидетельствует о повышении проницаемости мембран для ионов натрия. В результате происходит активация мембранных систем, ответственных за поддержание низкого внутриклеточного уровня данного катиона, что неизбежно должно привести к перераспределению ионных потоков через мембрану, изменению трансмембранного концентрационного градиента одновалентных катионов, изменению pH цитоплазмы и осмотического давления в эритроцитах. Это, в свою очередь, не может не отражаться на форме клеток и сродстве гемоглобина к

кислороду, так как изменение pH и нарушение формы существенно влияет на процессы насыщения гемоглобина кислородом в легких и его высвобождения в тканях. Кроме того, у клеток с патологически измененной формой понижена пластичность, что затрудняет прохождение их через узкие изогнутые капилляры. Таким образом, у больных алкоголизмом в состоянии абстиненции эффективность функционирования эритроцитов как переносчиков кислорода значительно снижается. В результате развивается тканевая гипоксия, что хорошо известно из клинической практики и литературных источников [Иванец Н.Н., Валентик Ю.В., 1988].

### **III. Ca<sup>2+</sup>-активируемые K<sup>+</sup>-каналы мембран эритроцитов больных алкоголизмом**

#### **III.1. Ca<sup>2+</sup>-зависимая калиевая проницаемость мембран эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции.**

Определенный вклад в изменение деформируемости эритроцитов вносят K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналы этих клеток [Dodson R.A. et al., 1987].

У больных алкоголизмом в состоянии абстиненции амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов на добавку Ca<sup>2+</sup>-ионофора A23187 ( $\Delta E$ ), являющаяся интегральной характеристикой оперирования Ca<sup>2+</sup>-активируемых K<sup>+</sup>-каналов [Ugar O., Onaran H.O., 1997; Петрова И.В., 1999], значительно увеличена по сравнению с контрольными значениями. В эритроцитах здоровых доноров в изоосмотической среде (320 мОсм) этот параметр составлял  $-32,23 \pm 1,77$  мВ (n=12), а в эритроцитах больных алкоголизмом -  $-38,19 \pm 1,22$  мВ (n=13), p < 0,02. Поскольку известно, что гиперполяризация мембраны клеток в наших условиях обусловлена открыванием K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов и выходом ионов калия [Vestergaard – Bogind B. et al., 1987], полученные результаты свидетельствуют об увеличении Ca<sup>2+</sup>-зависимой K<sup>+</sup>-проницаемости мембран эритроцитов больных алкоголизмом.

Полученные результаты еще раз подтверждают, что у больных алкоголизмом в состоянии абстиненции мембранные системы, обеспечивающие транспорт катионов, благодаря наличию в организме разнообразных регуляторных механизмов, переходят в новое функциональное состояние, пытаясь приспособить клетку к работе в новых условиях, создавшихся в результате хронического действия этанола и его метаболитов. Однако резервы адаптации *in vivo* ограничены. Нарушение трансмембранных градиентов катионов, в частности, в результате ускоренного выхода ионов калия из эритроцитов, может являться одной из основных причин изменения морфологии эритроцитов, снижения их устойчивости к гемолизу и способности к деформациям [Dodson R.A. et al., 1987; Петрова И.В., 1999].

#### **III.2. Роль мембранного каркаса эритроцитов в регуляции K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов.**

В литературе имеются косвенные данные о том, что белки мембранного каркаса участвуют в регуляции K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов эритроцитов [Орлов С.Н и др. 1992; Петрова И.В., 1999]. Изменение объема эритроцитов при изменении осмолярности среды *in vitro* и при различных патологиях приводит к перестройке структурной организации белков мембранного каркаса клеток [Brugnaga S., Tosteson D.C., 1987]. Исследование объем-зависимой регуляции K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов показало существенное различие зависимости амплитуды гиперполяризационных ответов эритроцитов от осмолярности среды у здоровых лиц и у больных алкоголизмом.

При набухании в гипосмотической среде (220 мОсм) амплитуда гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов здоровых доноров не отличалась от значений, полученных в изоосмотических условиях. Амплитуда гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов больных алкоголизмом при 220 мОсм оказалась достоверно ниже значения, полученного в изоосмотических условиях. В то же время  $\Delta E$  оставался существенно повышенным по сравнению с данным параметром у здоровых доноров в аналогичных условиях ( $p < 0,02$ ) (Рис. 9).

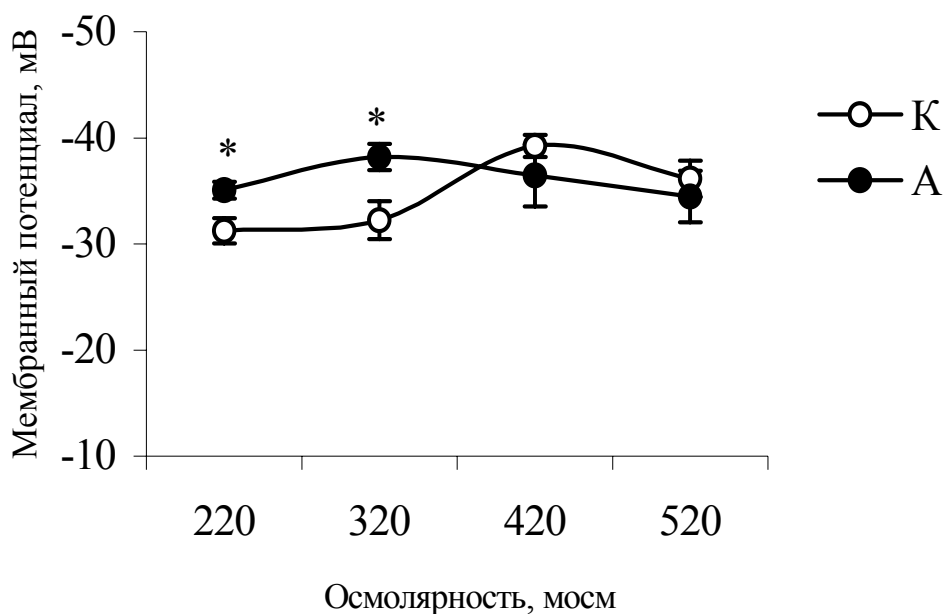


Рис.9. Зависимость амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов от осмолярности среды инкубации у здоровых доноров (К,  $n=12$ ) и у больных алкоголизмом (А,  $n=13$ ). \* - различия с контролем достоверны,  $p < 0,02$ .

При сжатии эритроцитов здоровых доноров в гиперосмотической среде максимальная амплитуда гиперполяризационного ответа клеток наблюдалась при 420 мОсм. При 520 мОсм вновь происходило некоторое снижение  $\Delta E$ . Амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов больных алкоголизмом при увеличении осмолярности среды постепенно снижалась (рис. 9). При 420 мОсм и 520 мОсм  $\Delta E$  в эритроцитах больных алкоголизмом не отличалась от соответствующих значений в эритроцитах здоровых доноров.

Полученные данные свидетельствуют о различной чувствительности  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов к изменению объема эритроцитов у больных алкоголизмом и здоровых доноров. Можно предположить, что изначально существуют различия в организации мембранного каркаса эритроцитов у здоровых и больных алкоголизмом, которые приводят к неодинаковым структурным сдвигам мембранного каркаса в динамических условиях растяжения и сжатия клеток.

Проверка этого предположения была проведена с помощью подхода, при котором исключалось участие одного из основных белков мембранного каркаса – спектрина - в объем-зависимых реакциях клетки. Как показали Shnyrov V.L. et al. (1990), инкубация эритроцитов при 50°C в течение 10 мин приводит к необратимой инактивации спектрина. Этот подход мы использовали для выяснения роли белков мембранного каркаса эритроцитов в объем-зависимой регуляции  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов.

После тепловой денатурации спектрина эритроцитов как здоровых доноров, так и больных алкоголизмом, амплитуда гиперполяризации достоверно снижалась, причем в обеих группах доноров исчезала зависимость  $\Delta E$  от осмолярности среды инкубации (Рис. 10). Кроме того, после термоинактивации спектрина при всех значениях осмолярности исчезала разница в величине гиперполяризационного ответа между экспериментальными группами доноров.

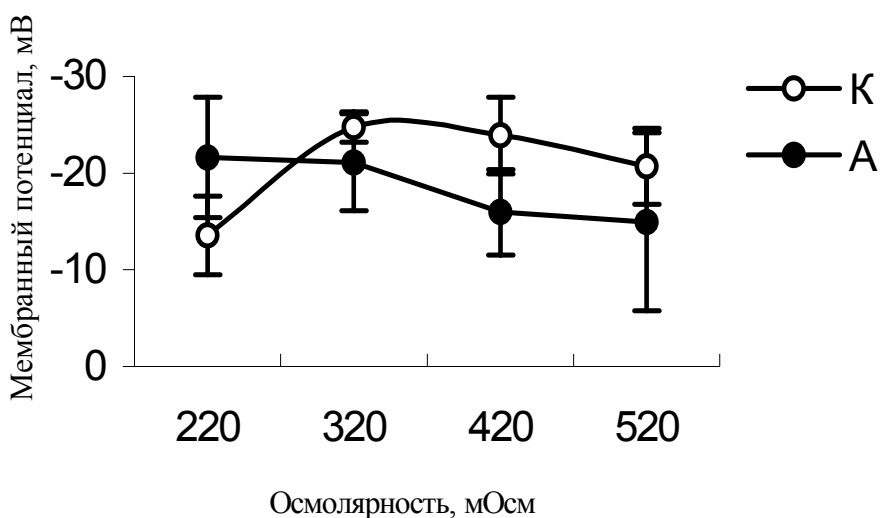


Рис. 10. Зависимость амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов от осмолярности среды инкубации у здоровых доноров (К, n=12) и у больных алкоголизмом (А, n=13) после тепловой денатурации белков мембранного каркаса при 50°С в течении 10 мин.

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли белков мембранного каркаса в регуляции  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов. Различная чувствительность каналов интактных эритроцитов к изменению объема клеток у здоровых доноров и больных алкоголизмом позволяет предполагать модификацию свойств мембранного каркаса эритроцитов при алкоголизме.

#### **IV. Окислительная модификация белков и липидов сыворотки крови, фагоцитарная и дыхательная активность нейтрофилов у больных алкоголизмом в динамике лечения.**

##### **IV.1. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонилированных белков в сыворотке крови больных алкоголизмом на разных стадиях лечения.**

Окисление белков и липидов происходит при разных патологиях: ишемии-реперфузии сердца, болезни Альцгеймера, старении, диабете, ревматоидном артрите, легочных и мышечных заболеваниях [Levine et al., 1990, Reznick and Packer, 1994]. Признаками окислительной модификации белков являются появление карбонильных остатков, изменение каталитической активности, окислительная фрагментация, гликирование, образование белковых агрегатов [Levine R.L., et al., 1990; Hipkiss A.R., et al., 1998]. Уровень перекисного окисления липидов часто оценивают по накоплению малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта ПОЛ.

При алкоголизме также наблюдается окислительная модификация мембранных и сывороточных белков и липидов. Снижается количество сульфгидрильных групп и повышается уровень карбонилирования белков, растет содержание МДА в сыворотке крови. При этом концентрация глутатиона падает, и значительно возрастает активность ксантиноксидазы [Grattagliano I., et al., 1996].

Мы провели исследование уровня карбонилирования сывороточных белков и содержания МДА в сыворотке крови у больных алкоголизмом II стадии в период абстиненции и в период формирования ремиссии. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Содержание карбониллов белков и продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови больных алкоголизмом и здоровых доноров.

Исследуемые группы	Карбонилы белков, нмоль/мг	МДА, мкмоль/л
Здоровые доноры	0,089±0,018 (n=5)	4,10±0,2 (n=10)
Больные в стадии абстиненции	0,296±0,080* (n=9)	4,79±0,3* <sup>#</sup> (n=22)
Больные в стадии формирования ремиссии	0,212±0,050* (n=5)	3,96±0,2 (n=22)

Примечание: n - количество обследованных доноров, \* - различия достоверны по сравнению с группой здоровых доноров, p < 0,05, <sup>#</sup> - различия достоверны по сравнению с группой больных в стадии формирования ремиссии, p < 0,05.

Видно, что уровень карбонилирования сывороточных белков, как и продуктов ПОЛ в сыворотке крови у больных алкоголизмом в период абстиненции достоверно выше, чем у здоровых доноров. Это свидетельствует об активации окислительных процессов в данный период заболевания.

После лечения уровень МДА в сыворотке пациентов не отличается от нормы. Уровень карбонилирования сывороточных белков после лечения несколько снижается, но все еще остается достоверно выше нормы. Таким образом, в процессе дезинтоксикационной терапии больных алкоголизмом происходит нормализация содержания продуктов перекисного окисления липидов



в сыворотке крови пациентов, в то время как для нормализации уровня карбонилированных белков, вероятно, требуется более длительный период времени.

#### IV.2. Фагоцитарная и дыхательная активность нейтрофилов больных алкоголизмом на разных стадиях лечения.

Результаты исследования фагоцитарной активности нейтрофилов и теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-теста), характеризующего продукцию активных форм кислорода в процессе дыхательного взрыва лейкоцитов здоровых лиц и больных алкоголизмом на разных стадиях лечения, представлены в табл. 6.

Фагоцитарная активность у больных алкоголизмом как до, так и после лечения несколько снижена, что согласуется с данными литературы [Евсеев В.А., 1990; Черенко В.Б., Бохан Н.А., 1991; Гамалея Н.Б. и др., 2000]. Показатели спонтанного НСТ-теста в лейкоцитах больных алкоголизмом, находящихся в стадии абстиненции, достоверно увеличены по сравнению с таковыми у здоровых лиц. Это может свидетельствовать о повышении продукции активных форм кислорода лейкоцитами у больных данной группы, что не противоречит данным литературы о том, что хроническая алкоголизация приводит к состоянию окислительного стресса [Bondy S.C., Guo S.X., 1994; Reinke L.A., et al., 1997] и об антигенной стимуляции и активации аутоиммунных реакций при данном заболевании [Маянский А.Н., Пикуза О.И. 1993].

Таблица 6.

Показатели фагоцитарной активности и НСТ-теста в лейкоцитах здоровых доноров и больных алкоголизмом на разных стадиях лечения.

Показатели		Здоровые доноры (n=10)	Больные в стадии абстиненции (n=22)	Больные после лечения (n=22)
Фагоцитарный индекс, %		82,8±4,5	74,2±3,8	75,3±3,7
Фагоцитарное число, количество частиц латекса		9,55±0,80	6,15±1,00*	6,25±0,90*
НСТ-тест, %	Спонтанный	9,8±1,8	15,6±2,5*	13,6±1,8
	Стимулированный	24,2±2,6	24,2±4,2	26,4±3,8
ЦИ	Спонтанный	0,12±0,02	0,23±0,02*	0,18±0,02
	Стимулированный	0,35±0,05	0,36±0,04	0,38±0,04

Примечание: ЦИ - цитологический индекс, n – количество обследованных доноров, \* - различия достоверны по сравнению с показателями здоровых доноров, p<0,05.

После лечения показатели спонтанных НСТ-теста и цитологического индекса все еще остаются повышенными по сравнению с соответствующими показателями здоровых доноров, однако это повышение становится не достоверным. Показатели стимулированного НСТ-теста, как и значения цитологического индекса после стимуляции лейкоцитов, в группе здоровых доноров и в обеих группах больных алкоголизмом не различаются между собой. Эти данные свидетельствуют о том, что у больных алкоголизмом снижен «функциональный резерв» лейкоцитов.

Таким образом, представленные данные позволяют заключить, что наряду со значительными нарушениями структуры и функции клеток красной крови у

больных алкоголизмом в состоянии абстиненции имеет место окислительная модификация сывороточных белков и липидов, а также увеличивается спонтанная продукция активных форм кислорода лейкоцитами. Лечение больных традиционными методами не приводит к полной нормализации исследуемых показателей, хотя положительная динамика очевидна.

#### **V. Коррекция повреждений клеток крови больных алкоголизмом.**

Важной проблемой является поиск способов коррекции клеточных повреждений при алкогольной интоксикации. Одним из перспективных соединений, сочетающих в себе антиоксидантные и мембраностабилизирующие свойства, является природный гидрофильный гистидинсодержащий дипептид карнозин ( $\beta$ -аланил-L-гистидин) [Болдырев А.А., 1999].

#### **V.1. Влияние карнозина на гемолитическую устойчивость эритроцитов больных алкоголизмом.**

Предварительная оценка влияния карнозина и родственных соединений - гистидина, N-ацетил-гистидина, анзерина (N<sup>1</sup>-метил-карнозина), офидина (N<sup>3</sup>-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 клетки больных алкоголизмом. Однако этот эффект во всех случаях был менее выражен, чем у карнозина. Исключение составил N-Ас-карнозин, положительное действие которого на стабильность эритроцитов превышало действие карнозина. В дальнейшем мы сосредоточили внимание на исследовании эффектов двух соединений - карнозина и N-Ас-карнозина. В качестве препарата сравнения в данных исследованиях мы использовали синтетический буфер PIPES, обладающий близкими к гистидин-содержащим дипептидам буферной емкостью и рК.

В табл. 7 даны среднестатистические значения основных параметров кислотных эритрограмм больных в состоянии абстиненции в присутствии этих соединений и без них. Добавление PIPESa в среду инкубации несколько повышало устойчивость эритроцитов по сравнению с контролем - наблюдался рост  $T_{max}$ , снижалось среднее значение  $\%_{max}$ . Однако достоверных различий между контрольной эритрограммой (без добавок) и эритрограммой в присутствии PIPESa мы не обнаружили.

Таблица 7.

Влияние исследуемых соединений на параметры кислотных эритрограмм больных алкоголизмом.

Соединение, 2мМ	n	$T_{max}$ , мин	$\%_{max}$ , %
Контроль	32	3,20±0,27	22,4±5,3
PIPES	11	3,70±0,30	18,3±3,5
Карнозин	10	4,10±0,60*	14,1±4,5
N-Ас-карнозин	12	4,40±0,60*	12,2±2,5*

Примечание: n – количество обследованных доноров, \* - различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

Добавление в среду инкубации карнозина приводило к выраженным положительным изменениям эритрограммы: она становилась более пологой, достоверно увеличивалось  $T_{max}$ , снижался  $\%_{max}$ . В присутствии N-Ас-карнозина эти изменения становились еще более выраженными. 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 не объясняются их рН-буферными свойствами. Вероятно, такое изменение эритрограмм в присутствии карнозина и N-Ас-карнозина связано с изменением в их присутствии устойчивости эритроцитарных мембран к повреждающему действию кислоты за счет мембраностабилизирующего действия дипептидов.

## **V.2. Влияние карнозина на морфологию эритроцитов больных алкоголизмом.**

О том, что исследуемые дипептиды стабилизируют эритроциты, свидетельствуют и микроскопические данные, полученные при использовании крови 30 больных алкоголизмом, находившихся в момент забора крови в состоянии абстиненции. Инкубация эритроцитов таких больных в физиологическом растворе (контроль) в течение 5 мин (рН 5,5) приводила к повреждению морфологии клеток. Из всей популяции эритроцитов лишь  $15,27 \pm 4,35\%$  эритроцитов сохраняли нормальную форму двояковогнутого диска. У остальных клеток наблюдалось существенное повреждение формы – появлялось большое количество пойкилоцитов. В присутствии 5 мМ PIPESa нормальную форму сохраняли  $17,27 \pm 14,22\%$  клеток (различия с контролем не достоверны,  $p > 0,05$ ). Добавление к физиологическому раствору 5 мМ карнозина или N-Ас-карнозина при том же значении рН приводило к тому, что, соответственно,  $30,37 \pm 20,39\%$  и  $40,83 \pm 25,73\%$  эритроцитов сохраняли нормальную форму (различия с контролем достоверны,  $p < 0,01$ ). Таким образом, карнозин и N-Ас-карнозин оказывают стабилизирующий эффект на эритроциты больных алкоголизмом, предохраняют их от структурных повреждений.

## **V.3. Влияние карнозина на фагоцитарную активность и продукцию активных форм кислорода нейтрофилами больных алкоголизмом.**

В данном исследовании мы использовали две концентрации карнозина, различающиеся в 100 раз (0,01 мМ и 1 мМ). Кровь инкубировали в растворе Хенкса в присутствии соответствующей концентрации карнозина в течение 30 мин при 37°C. В фоновые пробы карнозин не добавляли.

Карнозин в концентрации 0,01 мМ стимулирует фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов как здоровых, так и больных алкоголизмом доноров до и после лечения, что хорошо видно на рис. 11Б.

Увеличение концентрации карнозина до 1 мМ приводит к подавлению фагоцитоза у больных алкоголизмом, а на состояние лейкоцитов здоровых доноров существенного эффекта не оказывает (рис. 11).

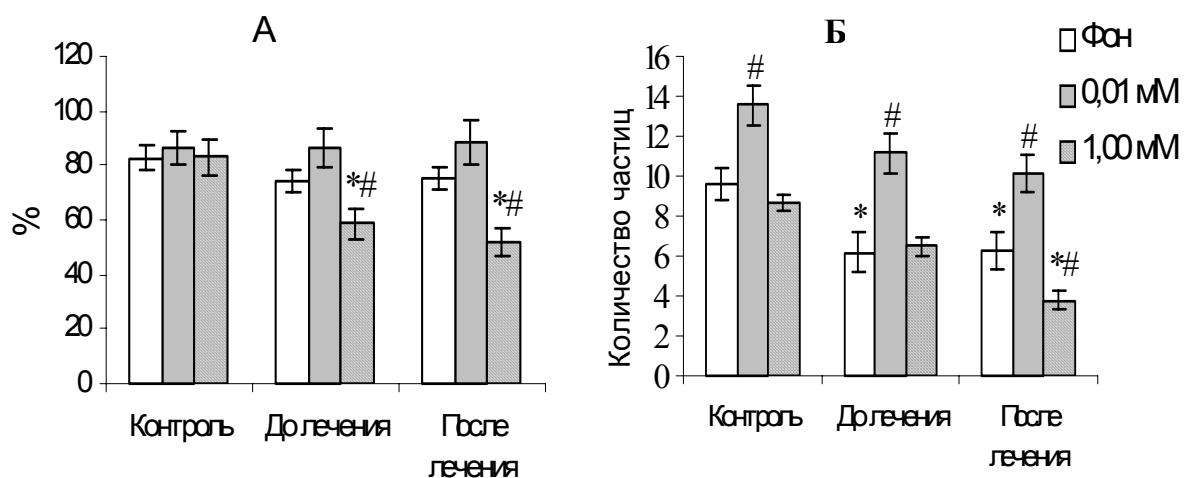


Рис. 11. Влияние карнозина (0,01 мМ и 1,00 мМ) на фагоцитарную активность нейтрофилов здоровых доноров (контроль) и больных алкоголизмом в стадии абстиненции (до лечения) и в стадии формирования ремиссии (после лечения). А - фагоцитарный индекс (% фагоцитирующих нейтрофилов); Б - фагоцитарное число (среднее количество частиц латекса, поглощенных одним фагоцитом). \* - различия достоверны по сравнению с соответствующим контролем,  $p < 0,05$ ; # - различия достоверны по сравнению с фоном,  $p < 0,05$ .

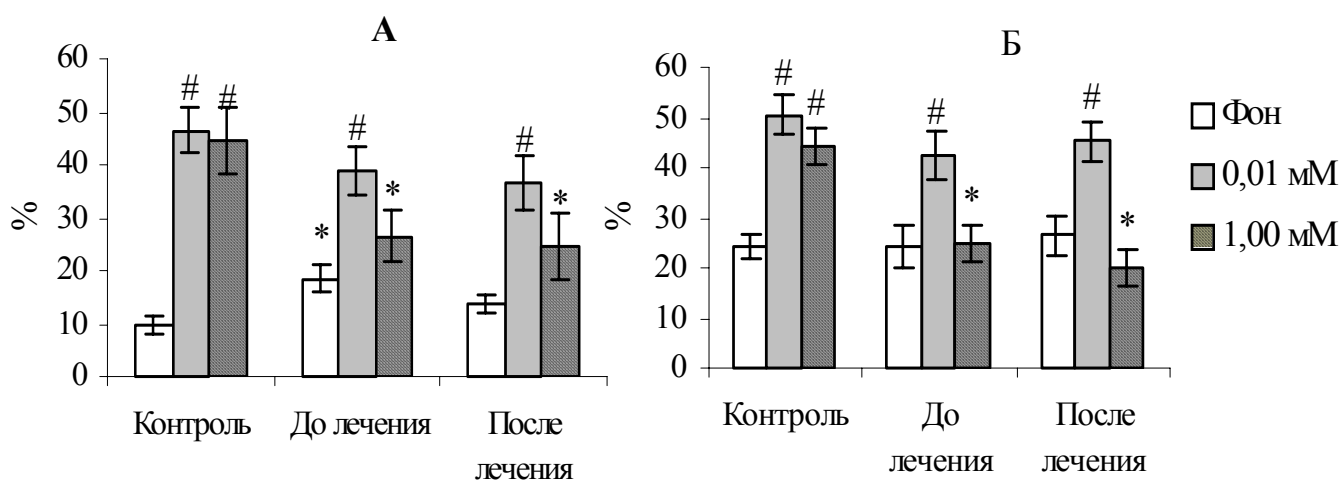


Рис. 12. Влияние карнозина (0,01 мМ и 1,00 мМ) на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами здоровых доноров (контроль) и больных алкоголизмом в стадии абстиненции (до лечения) и в стадии формирования ремиссии (после лечения). А - НСТ-тест спонтанный (процент клеток, образующих гранулы диформаза без стимуляции); Б - НСТ-тест стимулированный (процент клеток, образующих гранулы диформаза при стимуляции латексом). \* - различия достоверны по сравнению с соответствующим контролем,  $p < 0,05$ ; # - различия достоверны по сравнению с фоном,  $p < 0,05$ .

При оценке эффекта карнозина на продукцию активных форм кислорода в процессе дыхательного взрыва лейкоцитов в спонтанном и стимулированном НСТ-тестах обнаружено, что в концентрации 0,01 мМ карнозин увеличивает продукцию нейтрофилами активных форм кислорода в обоих видах НСТ-теста как у здоровых доноров, так и у больных алкоголизмом (рис. 12). Это свидетельствует о способности карнозина повышать "функциональный резерв" клеток. В концентрации 1 мМ карнозин не оказывает достоверного эффекта на продукцию активных форм кислорода у больных, и повышает ее, хотя и в меньшей степени, чем в концентрации 0,01 мМ, у здоровых лиц (рис. 12).

Полученные данные позволяют сделать заключение, что эффект карнозина *in vitro* на фагоцитарную и дыхательную активности нейтрофилов существенно зависит от концентрации: в концентрации 0,01 мМ (более физиологичной для крови) этот дипептид оказывает активирующее действие на клетки как больных, так и здоровых лиц. При повышении концентрации до 1 мМ наблюдается угнетение фагоцитарной активности и отсутствие эффекта на дыхательную активность нейтрофилов больных алкоголизмом. На показатели нейтрофилов здоровых доноров карнозин в концентрации 1 мМ действует иначе, нежели на клетки больных алкоголизмом: на фагоцитарную активность влияния не оказывает, а дыхательную активность стимулирует, но в меньшей степени, чем в концентрации 0,01 мМ.

Таким образом, карнозин обладает иммуномодулирующим действием, которое выражается в регулировании фагоцитоза и продукции активных форм кислорода нейтрофилами. В зависимости от концентрации карнозин может быть как антиоксидантом, так и прооксидантом. Разнонаправленные эффекты карнозина на клетки, находящиеся в разном функциональном состоянии, позволяют предполагать, что нагрузочный тест с карнозином может являться прогностически информативным при оценке состояния иммунокомпетентных клеток крови.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе установлено, что этанол и его метаболиты ацетальдегид и этиловые эфиры жирных кислот в модельных экспериментах *in vitro* способны индуцировать изменения биологических мембран и структурно-функциональных характеристик эритроцитов. Молекулярные эффекты этанола и ацетальдегида *in vitro* существенно различаются между собой.

Инкубация эритроцитов *in vitro* с этанолом приводит к снижению гемолитической устойчивости клеток в условиях как кислотного, так и окислительного гемолиза. В присутствии ингибитора каталазы – фермента, способного осуществлять окисление этанола до ацетальдегида в эритроцитах – этанол оказывает дестабилизирующее действие только в условиях кислотного гемолиза. В условиях окислительного гемолиза неметаболизированный этанол обладает слабым стабилизирующим действием. Этанол снижает микровязкость гидрофобной области липидного бислоя мембран эритроцитов, при этом модификации мембранных белков и белков цитоскелета не происходит.

Ацетальдегид снижает гемолитическую устойчивость эритроцитов в условиях окислительного, но не кислотного гемолиза. При этом также имеет место снижение микровязкости липидного бислоя. Кроме того, происходит окислительная модификация мембранных белков, затрудняется экстракция спектрина и актина из мембран эритроцитов.

Учитывая данные литературы о том, что скорость протекания кислотного гемолиза лимитируется скоростью проникновения протонов в цитозоль клеток,

которая в свою очередь определяется ионной проницаемостью мембраны [Ivanov I.T., 1999], а основным механизмом повреждения мембран эритроцитов в условиях окислительного гемолиза является индукция перекисного окисления липидов [Панасенко О.М. и др., 1998], можно сделать заключение, что преобладающим механизмом повреждающего действия неметаболизированного этанола на мембрану эритроцита является его влияние на липидный матрикс, приводящее к изменению физико-химического состояния мембраны, определяющего его ионную проницаемость. В то время как молекулярный механизм повреждающего действия ацетальдегида на мембрану связан со способностью ацетальдегида индуцировать окислительную модификацию белковой и липидной компонент мембран.

Этанол и ацетальдегид *in vitro* не приводят к нарушению морфологии клеток и кросс-линкингу эритроцитарных белков. После инкубации эритроцитов с глутаровым альдегидом – известным сшивающим агентом – был выявлен кросс-линкинг белков, который сопровождался нарушением морфологии эритроцитов. Эти данные позволяют заключить, что одной из причин морфологических нарушений эритроцитов является процесс кросс-линкинга белков.

Инкубация эритроцитов с этиловыми эфирами жирных кислот (линоленовой и пальмитиновой) приводит к встраиванию ЭЭЖК в мембраны эритроцитов. При этом происходит снижение стабильности клеток и перераспределение фосфатидилсерина с внутренней (цитоплазматической) стороны мембраны на наружную. Морфология клеток не нарушается.

У больных алкоголизмом в состоянии абстиненции (модель влияния этанола и его метаболитов на клеточные мембраны *in vivo*) имеют место выраженные структурно-функциональные изменения эритроцитов, часто выявляются морфологические нарушения. Патологические изменения морфологии клеток сочетаются со снижением их гемолитической устойчивости, кросс-линкингом и карбонилированием эритроцитарных белков. Обнаружено снижение гидрофобного объема мембран таких клеток, повышение упорядоченности их структуры, а также снижение чувствительности к хаотропному действию этанола и ацетальдегида по сравнению с мембранами эритроцитов здоровых доноров.

Гипотетически одной из причин изменения микровязкости мембран эритроцитов больных алкоголизмом и снижения устойчивости клеток к действию гемолизирующих агентов могло бы быть накопление в мембранах продуктов неокислительного превращения этанола - этиловых эфиров жирных кислот. Однако наши исследования продемонстрировали отсутствие ЭЭЖК в мембранах эритроцитов больных алкоголизмом.

В организме при хроническом поступлении высоких доз алкоголя эффекты этанола и его метаболитов, вероятно, суммируются. Кроме того, при действии этанола и его метаболитов *in vivo* происходят изменения практически во всех органах и системах, изменяется ионный состав крови, соотношение НАД/НАДН, развивается окислительный стресс, меняются реологические свойства крови, происходит нарушение эритропоэза и др. Все это оказывает дополнительное (по сравнению с влиянием этанола и его метаболитов *in vitro*) повреждающее действие на клеточные мембраны. Эритроциты «приспосабливаются» к функционированию в изменившихся условиях. Это обстоятельство, на наш взгляд, является основной причиной, по которой у больных алкоголизмом часто обнаруживаются структурно-функциональные нарушения клеток, не выявляемые (нарушение морфологии) или противоположные (снижение микровязкости гидрофобной области липидов при действии этанола и ацетальдегида *in vitro* с одной стороны и повышение этого параметра у больных алкоголизмом – с другой)

при изучении эффектов этанола и его метаболитов в модельных экспериментах *in vitro*.

Несмотря на более плотную упаковку жирнокислотных цепей липидов в мембранах эритроцитов больных алкоголизмом, выявлено существенное увеличение активности мембраносвязанного фермента Na/K-АТФазы и достоверное повышение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой  $\text{K}^+$ -проводимости клеточных мембран, что косвенно свидетельствует об увеличении проницаемости мембран эритроцитов для одновалентных катионов. Активация ион-транспортирующих систем мембран эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции может рассматриваться как один из механизмов, направленных на адаптацию клеток к новым условиям, которые формируются в организме при алкоголизме. Нарушение трансмембранных градиентов катионов в эритроцитах может являться одной из основных причин развития анемии при алкоголизме, поскольку такие нарушения способны приводить к изменению морфологии эритроцитов, снижению их устойчивости к гемолизу и способности к деформациям клеток [Dodson R.A. et al., 1987; Петрова И.В., 1999], а также к разрушению эритроцитов [Brugnara C., et al., 1995].

В наших экспериментах была обнаружена различная чувствительность  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов к изменению объема клеток при изменении осмолярности среды инкубации у здоровых доноров и больных алкоголизмом. После тепловой денатурации белков мембранного каркаса проводимость каналов падала как в клетках здоровых лиц, так и больных алкоголизмом, при этом исчезала чувствительность каналов к изменению объема эритроцитов. Эти данные позволили сделать заключение о важной роли белков мембранного каркаса в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой  $\text{K}^+$ -проницаемости мембран эритроцитов и об изменении свойств цитоскелета эритроцитов при алкоголизме.

Наряду со значительными нарушениями структуры и функции клеток красной крови у больных алкоголизмом имеет место частичная окислительная модификация сывороточных белков, накопление продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови, а также повышается продукция активных форм кислорода нейтрофилами. Данные результаты свидетельствуют в пользу того, что при алкоголизме в организме развивается состояние окислительного стресса.

После проведенного лечения у пациентов на стадии формирования ремиссии структурно-функциональные параметры эритроцитов частично нормализуются. Наблюдается некоторое повышение количества морфологически нормальных клеток (дискоцитов): от  $66,8 \pm 7,6\%$  (до лечения) до  $74,8 \pm 5,1\%$  (после лечения). Гемолитическая устойчивость эритроцитов больных на стадии формирования ремиссии не отличается от нормы. Обнаружена тенденция к повышению гидрофобного объема мембран эритроцитов, доступного для пирена. Мембраны эритроцитов вновь приобретают способность реагировать на добавленный этанол, однако чувствительность к ацетальдегиду у этих мембран не восстанавливается. Происходит нормализация активности Na/K-АТФазы и  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов. Эти данные свидетельствуют о частичной обратимости патологических процессов, приводящих к структурно-метаболическим и функциональным нарушениям биологических мембран при хронической алкогольной интоксикации.

Мембрана является динамичной системой, способной адаптироваться к изменению условий гомеостаза, вызванных влиянием внешних факторов, в частности, этанола и его метаболитов. Однако структурно-функциональные перестройки биологических мембран, как адаптационный ответ на хроническое

воздействие этанола, имеют ограниченный ресурс. Вероятно, их глубина и способность восстанавливаться после прекращения токсического воздействия этанола и его метаболитов зависит от стадии алкоголизма.

Несовершенство лекарственной терапии алкоголизма делает необходимыми поиск и разработку новых эффективных фармакологических средств профилактики и лечения этого заболевания. Поскольку мембранотропные эффекты этанола и его метаболитов весьма существенны, и так как при алкоголизме формируется состояние окислительного стресса, перспективными могут быть препараты, стабилизирующие биологические мембраны, защищающие их от повреждающего действия свободных радикалов. Препараты, улучшающие состояние биологических мембран, повышающие их резервы адаптации, безусловно, полезны в клинике алкоголизма. Наши исследования влияния карнозина – природного антиоксиданта и мембраностабилизатора – на эритроциты больных алкоголизмом показали, что данный препарат способен повышать устойчивость эритроцитов к действию гемолизирующих агентов, предохранять клетки от структурных повреждений.

Кроме того, нами обнаружено существенное иммуномодулирующее действие карнозина, которое выражается в регулировании фагоцитоза и продукции активных форм кислорода нейтрофилами больных алкоголизмом. Полученные данные позволяют сделать заключение, что карнозин может рассматриваться как перспективный препарат для включения его в арсенал фармакологических средств для лечения больных алкоголизмом.

## ВЫВОДЫ

1. Механизмы повреждающего действия этанола и ацетальдегида на эритроциты *in vitro* существенно различаются. Дестабилизирующий эффект неметаболизированного этанола на эритроциты проявляется в условиях кислотного, но не окислительного гемолиза. Ацетальдегид дестабилизирует эритроциты в условиях окислительного, но не кислотного гемолиза. Этанол не влияет на состояние эритроцитарных белков. Ацетальдегид приводит к окислительной модификации белков, снижению экстракции спектрина и актина из мембран эритроцитов.

2. Модификация белков эритроцитов под действием ацетальдегида, осуществляющаяся без кросс-линкинга, не приводит к нарушению формы клеток. Модификация белков под действием глутаральдегида, приводящая к кросс-линкину, сопровождается нарушением морфологии эритроцитов.

3. Этиловые эфиры линоленовой и пальмитиновой жирных кислот встраиваются в мембрану эритроцитов *in vitro*. При этом происходит перераспределение фосфатидилсерина с внутренней поверхности липидного бислоя на наружную и дестабилизация клеток без нарушения морфологии. В мембранах эритроцитов больных алкоголизмом этиловые эфиры жирных кислот не выявлены.

4. Состояние абстиненции при алкоголизме часто сопровождается увеличением дегенеративных форм эритроцитов со сниженной устойчивостью к гемолизирующему действию кислоты. Морфологические нарушения эритроцитов сочетаются с кросс-линкингом и карбонилированием белков. На стадии формирования ремиссии у больных алкоголизмом наблюдается повышение количества эритроцитов, имеющих нормальную морфологию, увеличивается гемолитическая устойчивость клеток. В эритроцитах больных алкоголизмом с нормальной морфологией кросс-линкинг белков не выявлен.

5. Этанол и ацетальдегид повышают гидрофобный объем мембран



эритроцитов здоровых лиц. Алкоголизм сопровождается модификацией физического состояния гидрофобной области липидного матрикса мембран эритроцитов: мембраны теряют чувствительность к хаотропному действию этанола и ацетальдегида. В процессе лечения больного его мембраны вновь приобретают способность реагировать на добавленный этанол, однако чувствительность к ацетальдегиду не восстанавливается.

6. При алкоголизме в период абстиненции активность Na,K-АТФазы эритроцитов повышается, меняется характер зависимости активности фермента от концентрации  $Mg^{2+}$  в инкубационной среде. В период ремиссии эти параметры нормализуются. Магний увеличивает эффективный гидрофобный объем липидного бислоя эритроцитов больных алкоголизмом.

7. Абстиненция при алкоголизме сопровождается увеличением  $Ca^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости эритроцитов. Белки мембранного каркаса эритроцитов контролируют работу  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов. При алкоголизме способность мембранного каркаса эритроцитов реагировать на изменение осмолярности среды модифицируется.

8. У больных алкоголизмом в период абстиненции происходит окислительная модификация сывороточных белков и липидов, увеличивается продукция активных форм кислорода нейтрофилами. После лечения содержание продуктов ПОЛ и образование активных форм кислорода лейкоцитами нормализуются, однако уровень окисленных белков остается повышенным.

9. Карнозин *in vitro* повышает устойчивость эритроцитов больных алкоголизмом к кислотному гемолизу и предохраняет клетки от структурных повреждений. Карнозин обладает существенным иммуномодулирующим действием, которое выражается в регуляции фагоцитоза и продукции активных форм кислорода нейтрофилами. Эффекты карнозина зависят от его концентрации и функционального состояния клеток.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Boldyrev A.A. Temperature-induced transitions in SR membranes detected by fluorescence methods / Boldyrev A.A., Lopina O.D., Prokopyeva V.D., Sarzala M.G. // Biochem. Int. – 1982.- V.5, № 2. - P.247-252.
2. Прокопьева В.Д. Влияние температуры на флуоресценцию меток и зондов различной локализации, встроенных в препараты саркоплазматического ретикулума / Прокопьева В.Д., Лопина О.Д., Болдырев А.А. // Биофизика. - 1983. - Т.28, № 1. - С.40-45.
3. Boldyrev A. Diphenylhexatriene and pyrene as tools for characterization of biological membranes / Boldyrev A., Lopina O., Prokopyeva V. // Biochem. Int. – 1984.- V.8, № 6. - P.851-856.
4. Болдырев А.А. Мембранные липиды как регуляторы межбелковых взаимодействий / Болдырев А.А., Лопина О.Д., Прокопьева В.Д. // Нейрохимия. - 1985. - Т.4, № 1. - С. 81-96.
5. Болдырев А.А. Как регулируется активность мембранных ферментов / Болдырев А.А., Прокопьева В.Д. // Биологические науки. – 1985. - № 9. - С.5-13.
6. Прокопьева В.Д. Сравнительная оценка кардиопротекторного действия природных антиоксидантов карнозина и аскорбиновой кислоты / Прокопьева В.Д., Лаптев Б.И., Афанасьев С.А., Свирко Ю.С. // Материалы межреспубликанской научно-практической конференции «Синтез, фармакология и клинические аспекты новых психотропных и сердечно-сосудистых веществ». – Волгоград, 1989. - С. 136-137.
7. Dorofeeva L. The Effect of Chronic Ethanol on NADPH-Dependent and Ascorbat-

- Dependent Lipid Peroxidation in Liver Microsomes and Brain Sinaptosomes of Rats / Dorofeeva L., Prokopieva V. // Int. Conf. "Regulation of Free Radical Reactions (Biomed. Aspects)". – Varna, 1989. - P.212.
8. Прокопьева В.Д. Перекисное окисление липидов в микросомах печени и синапсосомах мозга хронически алкоголизованных крыс / Прокопьева В.Д., Эверстова Т.Д., Ткаченко И.Б. // Сборник научных трудов «Медико-биологические аспекты охраны психического здоровья». – Томск, 1990. - С. 154-155.
  9. Савоненко А.В. Характеристика Na,K-АТФазы эритроцитов крыс с разным отношением к этанолу в норме и после хронической алкоголизации / Савоненко А.В., Прокопьева В.Д. // Вопросы наркологии. – 1993. - № 1. - С.41-44.
  10. Прокопьева В.Д. Влияние ионов магния на кислотные эритрограммы крови крыс в норме и после хронической алкоголизации / Прокопьева В.Д., Мезенцева И.Б. // Сборник научных трудов "Региональные аспекты современной аддиктологии". – Томск, 1994. - С. 99-101.
  11. Прокопьева В.Д. Клинико-динамические особенности эритрограмм при алкоголизме / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. // Сборник материалов 7 научной отчетной сессии НИИ ПЗ "Актуальные вопросы психиатрии".- Томск. 1995.- Вып.7. - С.151-153.
  12. Прокопьева В.Д. Влияние сыворотки крови хронически алкоголизованных крыс на очищенную Na,K-АТФазу / Прокопьева В.Д., Савоненко А.В.// Материалы XII съезда психиатров России. - Москва.1995. - С.814-815.
  13. Прокопьева В.Д. Влияние ионов магния на кислотные эритрограммы больных алкоголизмом / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. // Материалы конференции, посвященной 15-летию НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН, "Современные проблемы пограничных и аддиктивных состояний". – Томск, 1996. - С.109-110.
  14. Прокопьева В.Д. Изучение молекулярных механизмов регуляции активности Na,K-АТФазы при алкоголизме // Труды конференции, посвященной 35-летию ЦНИЛ, "Медико-биологические аспекты нейрогуморальной регуляции". – Томск, 1997. - С. 20-22.
  15. Прокопьева В.Д. Сравнительная характеристика Mg-зависимых свойств Na,K-АТФазы эритроцитов хронически алкоголизованных крыс и больных алкоголизмом / Прокопьева В.Д., Савоненко А.В., Бохан Н.А. // Сборник материалов 8 научной отчетной сессии НИИ ПЗ "Актуальные вопросы психиатрии".- Томск. 1997.- Вып.8. - С.115-116.
  16. Прокопьева В.Д. Изменение чувствительности Na,K-АТФазы к ионам магния в эритроцитах больных алкоголизмом на разных этапах лечения / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. // Сибирский медицинский журнал. – 1998. - № 3-4. - С.60-64.
  17. Прокопьева В.Д. Влияние карнозина и его N-ацетильного производного на стабильность эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А., Джонсон П., Болдырев А.А. // Вопросы медицинской химии. – 1998. - Т.44. № 5. - С.474-478.
  18. Прокопьева В.Д. Защитное действие карнозина и родственных соединений на эритроциты больных алкоголизмом / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. // Сборник научных трудов "Реабилитация в психиатрии (клинические и социальные аспекты)" – Томск, 1998. - С.146-147.
  19. Солонский А.В. Нейроморфологические, нейрохимические и поведенческие характеристики экспериментального изучения алкогольной зависимости / Солонский А.В., Бохан Н.А., Галактионов О.К., Дорофеева Л.И., Мельникова

- Т.Н., Савоненко А.В., Прокопьева В.Д. // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 1998. - №1-2. - С.43-48.
20. Prokopenva V.D. Modulation of the erythrocyte Na,K-ATPase from alcoholic patients by Mg<sup>2+</sup>-ions / Prokopenva V.D., Bohan N.A. // Alcohol & Alcoholism (J of the European Society for Biomedical Research of Alcoholism (ESBRA). – 1999. - V.34. №3 - P.475. (N 218)
  21. Прокопьева В.Д. Регуляция Na,K-АТФазы эритроцитов больных алкоголизмом ионами магния / Прокопьева В.Д. // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 1999 - № 4 - С.38-40.
  22. Prokopenva V.D. Effects of carnosine and related compounds on the stability and morphology of erythrocytes from alcoholics / Prokopenva V.D., Bohan N.A., Johnson P., Abe H., Boldyrev A.A. // Alcohol & Alcoholism. – 2000 - Vol.35. № 1. - P.44-48.
  23. Тюлина О.В. Влияние этанола на гемолитическую устойчивость эритроцитов / Тюлина О.В., Хантельманн М.Дж., Прокопьева В.Д., Джонсон П., Болдырев А.А. // Биохимия. – 2000. - Т.65. №2. - С. 218-224.
  24. Прокопьева В.Д. Влияние этанола и ацетальдегида на микровязкость мембран эритроцитов больных алкоголизмом на разных этапах лечения / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А., Кондакова И.В. // Бюл. Экспер. Биол. – 2000. - Т. 129, приложение N 1. - С. 90-92.
  25. Tyulina O.V. Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis? / Tyulina O.V., Huentelman M.J., Prokopenva V.D., Boldyrev A.A., Johnson P. // Biochem. Biophys. Acta. – 2000. - V.1535. - P. 69-77.
  26. Тюлина О.В. Влияние метаболизма этанола на гемолитическую устойчивость эритроцитов./ Тюлина О.В., Хантельманн М.Дж., Прокопьева В.Д., Джонсон П., Болдырев А.А. // Материалы симпозиума “Молекулярные основы заболеваний XXI века” – В сб.: Актуальные вопросы кардиологии. – Томск, 2000.- Раздел VI. - С. 266-267.
  27. Прокопьева В.Д. Динамика структурно-функциональных характеристик эритроцитов больных алкоголизмом / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. // Материалы симпозиума “Молекулярные основы заболеваний XXI века” – В сб.: Актуальные вопросы кардиологии. – Томск, 2000. - Раздел VI. - С. 260.
  28. Прокопьева В.Д. Гидрофобный объем мембран эритроцитов больных алкоголизмом: влияние этанола и ацетальдегида / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. // Материалы XIII съезда психиатров России. – Москва, 2000. - С. 263.
  29. Прокопьева В.Д. Ацетальдегид и мембрана эритроцита / Прокопьева В.Д., Тюлина О.В., Додд Р., Куликов Е.В., Джонсон П.) // Бюл. Экспер. Биол. – 2001. - Приложение 1. - С.39-42.
  30. Рязанцева Н.В. Структурные особенности мембран эритроцитов у больных шизофренией / Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Прокопьева В.Д., Степовая Е.А., Баскаков М.Б. // Бюл. Экспер. Биол. – 2001. - Приложение 1. - С. 81-84.
  31. Кремено С.В. Исследование Ca<sup>2+</sup>-активируемых калиевых каналов мембран эритроцитов человека при нервно-психических патологиях. / Кремено С.В., Петрова И.В., Прокопьева В.Д. // Сборник научных трудов «Современные технологии психиатрического и наркологического сервиса». – Томск, 2001. - С. 57-59.
  32. Прокопьева В.Д. Сравнительная оценка гидрофобного объема мембран эритроцитов больных алкоголизмом в периоды абстиненции и формирования ремиссии / Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. // Актуальные вопросы психиатрии и наркологии. – Томск, 2001. - Вып. 10. - С.214-215.
  33. Джонсон П. Эффекты этанола, ацетальдегида и этиловых эфиров жирных кислот на эритроциты человека / Джонсон П., Тюлина О.В., Прокопьева В.Д.,

- Додд Р.Д., Хокинс Дж. Р., Клэй С.В., Уилсон Д.О., Болдырев А.А. // Актуальные вопросы психиатрии и наркологии. – Томск. 2001.- Вып. 10. – С.188-189.
34. Prokopenko V.D. Disturbances of structure and functions of alcoholics' erythrocytes / Bohan N.A. // The World Journal of Biological Psychiatry.- 2001. - V.2. - P. 276. (Abstracts of 7 World Congress of Biol.Psychiatry. 1-6 July 2001, Berlin, Germany).
35. Dodd R. Acetaldehyde and glutaraldehyde effects on erythrocyte proteins and resistance to oxidative hemolysis. / Dodd R., Tyulina O.V., Prokopenko V.D., Johnson P., Boldyrev A.A. // Abstr. of 27<sup>th</sup> Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS). – Lisbon. 2001. - P.227.
36. Прокопьева В.Д. Исследование влияния карнозина на  $Ca^{2+}$ -активируемые  $K^+$ -каналы эритроцитов человека при разной осмолярности среды инкубации / Прокопьева В.Д., Ситожевский А.В., Кремено С.В., Корюкин В.И., Петрова И.В. // Тез. VI Международной конференции «Биоантиоксидант». – Москва, 2002. - С. 477-478.
37. Tyulina O.V. In vitro effects of ethanol, acetaldehyde and fatty acid ethyl esters on human erythrocytes / Tyulina O.V., Prokopenko V.D., Dodd R.D., Hawkins J.R., Clay S.W., Wilson D.O., Boldyrev A.A., Johnson P. // Alcohol & Alcoholism. – 2002 - V.37. №2. - P.179-186.
38. Прокопьева В.Д. Исследование роли липидного матрикса и белков мембранного каркаса в регуляции  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов эритроцитов у больных алкоголизмом и сахарным диабетом II типа. / Прокопьева В.Д., Петрова И.В., Ситожевский А.В., Кремено С.В., Корюкин В.И., Баскаков М.Б., Бохан Н.А., Новицкий В.В. // Бюл. Экспер. Биол. – 2002. - №10. - С.401-404.
39. Тюлина О.В. Гистидин-содержащие дипептиды и форменные элементы крови / Тюлина О.В., Бычкова О.Н., Прокопьева В.Д., Болдырев А.А. // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2002. - №4. - С. 53-63.
40. Невидимова Т.И. Иммуноактивные свойства дипептидов / Невидимова Т.И., Прокопьева В.Д., Найденова Н.Н., Кокконова Д.Н., Скрипка Н.Н. // Сборник тезисов. Всероссийской конференции «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии». - Томск, 2003. - С. 154-155.

#### ИЗОБРЕТЕНИЕ

41. Прокопьева В.Д. Патент на изобретение “Способ повышения устойчивости к гемолизу эритроцитов и восстановления их поврежденной формы” № 2162698. / Прокопьева В.Д., Болдырев А.А., Бохан Н.А., Семке В.Я., Кулагин Е.М. Положительное решение о выдаче патента от 14.09.2000.