

УДК 612.014.46/612.118.221.3

С. Б. МОЛДАКАРИМОВ

ВЛИЯНИЕ 1,1-ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА НА СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

(Институт физиологии человека и животных МОН РК)

Исследовано влияние 1,1-диметилгидразина на гемолиз эритроцитов в изотонических и гипотонических средах, перекисную резистентность эритроцитов, проницаемость эритроцитарных мембран, активность каталазы эритроцитов человека в условиях *in vitro*. Показано увеличение степени гемолиза в изотонических и гипотонических растворах хлорида натрия под воздействием токсиканта. Установлено, что низкие концентрации 1,1-ДМГ снижают проницаемость эритроцитарных мембран, повышают перекисную резистентность эритроцитов, активность каталазы, а высокие концентрации вызывают обратные эффекты.

В настоящее время в окружающей среде насчитывается огромное количество различных химических соединений, многие из которых неблагоприятно воздействуют на здоровье населения. В Казахстане в связи с деятельностью космодрома Байконур потенциальную опасность представляет используемое в качестве ракетного топлива высокотоксичное соединение 1,1-диметилгидразин (1,1-ДМГ) [1–4]. НДМГ и его производные опасны при любых путях поступления в организм. Исследования на животных показывают, что гидразины одинаково быстро всасываются в кровь независимо от способа воздействия и легко распределяются в тканях. Кроме того, выявлено, что гидразины способствуют появлению злокачественных новообразований [5,6].

В основе целого ряда патологических состояний лежат изменения свойств клеточных мембран, вызываемые факторами внешней среды. Имеются данные, что повреждающее действие многих неблагоприятных факторов реализуется на клеточном и молекулярном уровнях [7,8]. В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям мембран эритроцитов как модели, отражающей состояние мембран всего организма [1,9].

В связи с изложенным целью нашей работы явилось исследование состояния мембран эритроцитов при действии 1,1-ДМГ в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Донорскую кровь получали в Республиканском центре крови. Кровь центрифугировали 10 мин при 1000 г. Плазму и лейкоциты удаляли, а эритроциты дважды промывали средой инкубации, содержащей 150 мМ NaCl, 5 мМ Na_2HPO_4 (рН 7,4). Степень гемолиза эритроцитов определяли в растворах NaCl 0,5 г/100 мл и 0,9 г/100 мл при действии 1,1-ДМГ, регистрируя оптическую

плотность при длине волны 540 нм. Уровень гемолиза клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-ному гемолизу, вызванному раствором Na_2CO_3 в концентрации 0,1 г/100 мл.

Перекисную резистентность эритроцитов определяли, помещая эритроциты в среду, содержащую перекись водорода в концентрации 0,5%, с дальнейшей 2-часовой инкубацией при 37 °С. После центрифугирования оптическую плотность надосадочной жидкости регистрировали при длине волны 540 нм.

Проницаемость эритроцитарных мембран устанавливали по методу, описанному в работе [10], с использованием растворов мочевины (18 г/л) и NaCl (0,9 г/100 мл) в соотношении 60:40.

Активность каталазы определялась по методу [11].

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel, рассчитывая среднюю арифметическую параметра, среднее квадратическое отклонение, ошибку средней арифметической. С учетом критерия Фишера–Стьюдента зарегистрированные изменения показателей считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены результаты экспериментов по определению гемолиза эритроцитов человека в растворе NaCl 0,9 г/100 мл при действии 1,1-ДМГ. Из рисунка видно, что концентрации 1,1-ДМГ 1,3–2,6 мМ не оказывают влияния на степень гемолиза эритроцитов и количество гемолизированных клеток остается на уровне контроля. Повышение концентрации токсиканта приводит к постепенному увеличению выхода гемоглобина из эритроцитов до 3,2% в 65 мМ растворе. При концентрации 1,1-ДМГ 130 мМ повышается гемолиз до 18,9%, а в 650 мМ растворе уро-

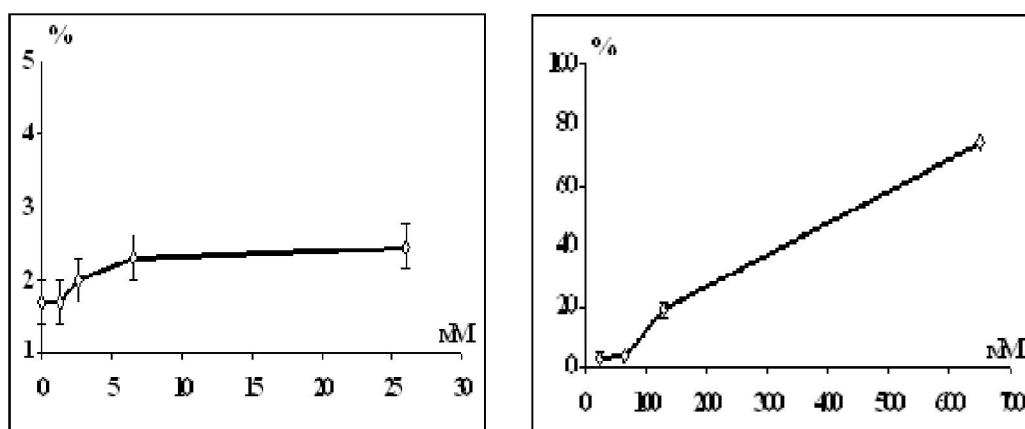


Рис. 1. Влияние 1,1-диметилгидразина на осмотическую резистентность эритроцитов человека (раствор NaCl 0,9 г/100мл). По оси абсцисс – концентрация 1,1-ДМГ, мМ; по оси ординат – величина гемолиза, %

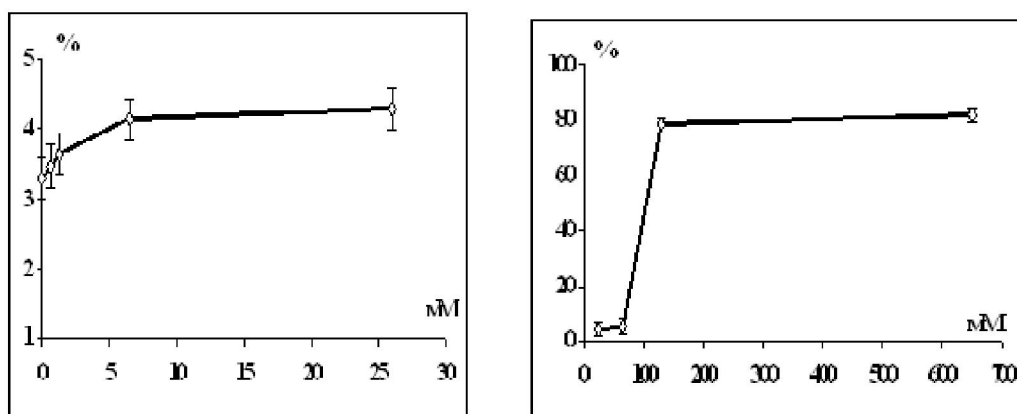


Рис. 2. Влияние 1,1-диметилгидразина на осмотическую резистентность эритроцитов человека (раствор NaCl 0,5 г/100мл). По оси абсцисс – концентрация 1,1-ДМГ, мМ; по оси ординат – величина гемолиза, %

вень гемолиза достигает максимального значения и составляет 74,7 %.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние 1,1-ДМГ на осмотическую резистентность эритроцитов в растворе NaCl 0,5 г/100 мл (рис. 2). Как видно из рисунка, в контроле гемолиз составляет 3,3%. В растворе с содержанием 1,1-ДМГ в концентрации 0,65 мМ выход гемоглобина из эритроцитов практически не изменяется. С повышением концентрации токсиканта до 65 мМ гемолиз постепенно увеличивается до 5%. Дальнейшее увеличение количества 1,1-ДМГ до 130 мМ приводит к резкому повышению гемолиза до 79%, а при 650 мМ отмечается максимальное количество гемолизированных эритроцитов – 82%.

Результаты экспериментов по исследованию действия 1,1-ДМГ на перекисную резистентность эритроцитов представлены на рис. 3. Уровень гемолиза в контроле составляет 30%. При наличии в среде инкубации 1,1-ДМГ в концентрации от 0,65 до 2,6 мМ

перекисная резистентность эритроцитов повышается относительно контрольной величины и гемолиз снижается до 2%. Минимальный уровень гемолиза сохраняется до концентрации 1,1-ДМГ 26 мМ. При дальнейшем увеличении концентрации токсиканта выход гемоглобина из эритроцитов повышается, а при концентрациях от 65 до 130 мМ гемолиз эритроцитов резко увеличивается – от 3,9 до 33,5%.

На рис. 4 представлены результаты экспериментов по определению влияния 1,1-ДМГ на проницаемость эритроцитарных мембран. Контрольный уровень гемолиза 14,1%. При добавлении в среду инкубации 1,1-ДМГ до концентрации 6,5 мМ проницаемость мембран эритроцитов постепенно снижается, выход гемоглобина из клеток уменьшается до 2%, что сохраняется и в 26 мМ растворе. При дальнейшем повышении концентрации токсиканта до 65 мМ уровень гемолиза постепенно увеличивается. При высоких концентрациях 1,1-ДМГ (от 65 до 130

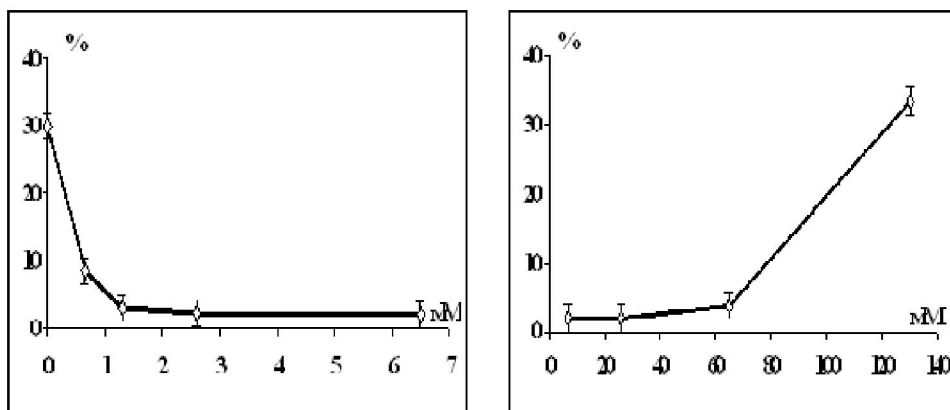


Рис. 3. Влияние 1,1-диметилгидразина на перекисный гемолиз эритроцитов человека. По оси абсцисс – концентрация 1,1-ДМГ, мМ; по оси ординат – величина гемолиза, %

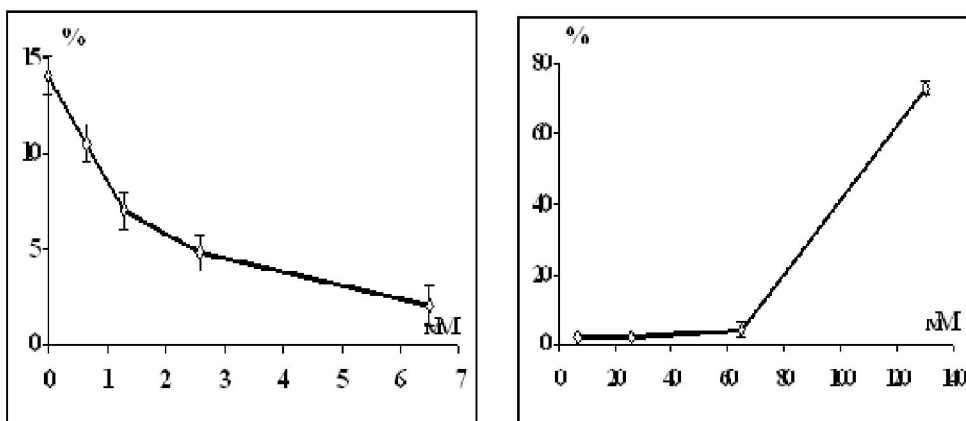


Рис. 4. Влияние 1,1-диметилгидразина на проницаемость эритроцитарных мембран человека. По оси абсцисс – концентрация 1,1-ДМГ, мМ; по оси ординат – величина гемолиза, %

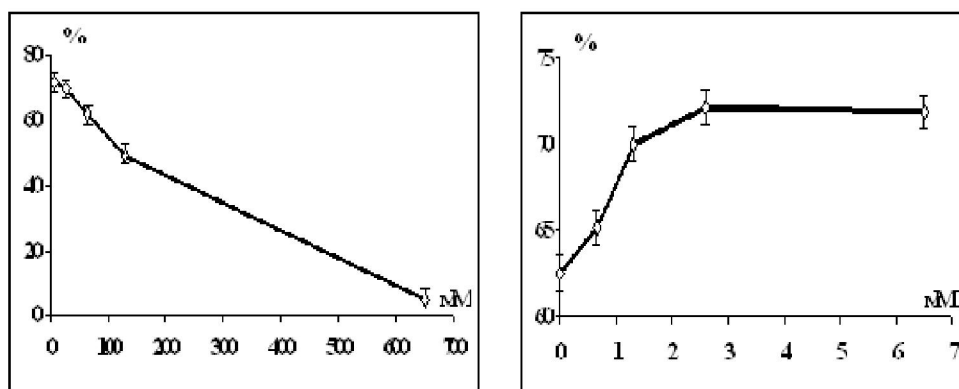


Рис. 5. Влияние 1,1-диметилгидразина на активность каталазы эритроцитов человека. По оси абсцисс – концентрация 1,1-ДМГ, мМ; по оси ординат – активность каталазы, %

мМ) количество гемолизированных клеток возрастает и достигает 73,2%.

В следующей серии экспериментов, результаты которых приведены на рис. 5, исследовали активность каталазы эритроцитов в зависимости от со-

держания в среде 1,1-ДМГ. Как видно из рисунка, в контроле активность каталазы составляет 62,5%. При увеличении концентрации 1,1-ДМГ в среде инкубации от 0,65 до 2,6 мМ наблюдается повышение активности фермента, которая достигает максималь-

ной величины 72%. Такая величина активности антиоксидантного фермента сохраняется до концентрации 1,1-ДМГ 6,5 мМ. При более высоких концентрациях 1,1-ДМГ отмечается небольшое снижение активности фермента, которая в растворе 1,1-ДМГ 26 мМ составляет 69,7% и остается выше контроля, а в 65 мМ практически равняется контрольной величине, составляя 62%. Дальнейшее увеличение содержания в среде 1,1-ДМГ снижает активность каталазы, которая составляет 49,3 и 5,1% при концентрации токсиканта 130 и 650 мМ соответственно.

Таким образом, результаты наших экспериментов показывают, что при увеличении концентрации 1,1-ДМГ повышается гемолиз эритроцитов в растворах NaCl. При этом гемолиз в 0,5 г/100 мл растворе NaCl, выше чем в 0,9 г/100 мл. Это можно объяснить тем, что раствор хлорида натрия 0,5 г/100 мл является гипотоническим, где гемолизу подвергаются эритроциты, обладающие низкой осмотической резистентностью, тогда как 0,9 г/100 мл – изотонический раствор, осмотическое давление которого равно осмотическому давлению крови, и в таком растворе гемолиз практически отсутствует. Как показали наши эксперименты, 1,1-ДМГ повышает гемолиз и в изотонической среде. По-видимому, это связано с интенсификацией перекисного окисления липидов мембран, так как имеются данные, что под влиянием гидразинов увеличивается концентрация супероксидных радикалов, которые способны усиливать процессы ПОЛ [12]. Следовательно, перекисное окисление липидов является причиной интенсификации гемолитических процессов при действии 1,1-ДМГ как в изотонической, так и в гипотонической среде.

Перекисная резистентность эритроцитов тесно связана с активностью каталазы – антиоксидантного фермента, функцией которого является преобразование токсичной для клетки перекиси водорода до воды и молекулярного кислорода. Наши эксперименты показали четкую зависимость между этими показателями. При низких концентрациях 1,1-ДМГ повышается активность каталазы, следовательно, концентрация перекиси водорода в среде уменьшается, что и приводит к снижению уровня гемолиза эритроцитов. С повышением концентрации 1,1-ДМГ уменьшение способности каталазы утилизировать субстрат приводит к увеличению количества H_2O_2 в среде, следствием которого является усиление процесса гемолиза.

С увеличением активности каталазы при действии низких концентраций 1,1-ДМГ, вероятно, связано и снижение уровня гемолиза в экспериментах по определению проницаемости эритроцитарных мембран. Можно полагать, что повышение активности антиоксидантных ферментов приводит к подавлению перекисных процессов в мембране и снижению проницаемости мембраны для мочевины. При увеличении концентрации токсиканта выше 65 мМ резко увеличивается гемолиз эритроцитов, что, по-видимому, обусловлено изменением проницаемости мембран. Результаты по определению активности каталазы тоже показали, что при концентрациях 1,1-ДМГ 65 мМ и выше активность фермента резко снижается. При этих же концентрациях токсиканта было зарегистрировано резкое снижение осмотической резистентности эритроцитов в растворе 0,5 г/100 мл хлорида натрия.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что при действии высоких концентраций токсиканта антиоксидантная система не способна защитить клеточную мембрану от повреждающего действия 1,1-ДМГ. Следовательно, при концентрации 1,1-ДМГ 65 мМ и выше происходят изменения физико-химического состояния мембран эритроцитов, в основе которых лежит интенсификация процессов перекисного окисления мембранных фосфолипидов, что и является причиной изменения проницаемости клеточных мембран и увеличения выхода гемоглобина из клетки.

Работа поддержана грантом К-451.2 ISNC.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акылбаев Ж.К., Бактыбеков К.С., Быйстро В.К., Рамазанова Р.А., Чунаева В.Д. Несимметричный диметилгидразин и продукты его превращения как фактор загрязнения окружающей среды // Вестн. КарГУ. 2001. №1(21). С.54-56.
2. Наурызбаев М.К., Батырбекова С.Е., Зебрева А.И. и др. Основные аспекты экологической оценки районов падения отделяющихся частей ракет-носителей // Там же. С.134-137.
3. Hess E.V. Environmental chemicals and autoimmune disease: cause and effect // Toxicology. 2002. V.181-182. P.65-70.
4. Zelnick SD., Mattie DR., Stepaniak PC. Occupational exposure to hydrazines: treatment of acute central nervous system toxicity // Aviat Space Environ Med. 2003. V.74, N 12. P.1285-1291.
5. Choudhary G., Hansen H., Links. Human health perspective on environmental exposure to hydrazines: a review // Chemosphere. 1998. V. 37, N 5. P.801-843.
6. Morgenstern H., Ritz B. Effects of radiation and chemical exposures on cancer mortality among Rocketdyne workers: a review of three cohort studies // Occup Med. 2001. V.16, N 2. P.219-237.
7. Оксенгендлер Г.И. Яды и противоядия. Л.: Наука, 1982. 192 с.

8. Ершов Ю.А., Плетенева Т.В. Механизмы токсического действия неорганических соединений. М.: Медицина, 1989. 272 с.

9. Акмамбетова К.М., Айтуганов К.А., Абиева Г.Б. Ландшафтно-геохимические исследования Центрального Казахстана // Вестн. КарГУ. 2001. №1(21). С.67-69.

10. Колмаков В.Н., Радченко В.Г. Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) в диагностике хронических заболеваний печени // Терапевтический архив. 1982. Т.54, №2. С.59-62.

11. Чеваари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. 1991. №10. С.9-13.

12. Авакян А.Х. Новые молекулярные критерии оценки токсического действия производных гидразина. Активные формы кислорода как ключевые агенты в механизме токсичности // Фармакология и токсикология. 1990. Т.53, №1. С.70-73.

Резюме

1,1-диметилгидразиннің (1,1-ДМГ) адам эритроциттерінің изотоникалық және гипотоникалық орталарындағы гемолизіне,

асқын тотығу төзімділігіне, мембрана өткізгіштігіне, каталаза белсенділігіне *in vitro* жағдайында әсері зерттелді. Токсиканттың әсерінен натрий хлоридінің изотоникалық және гипотоникалық ертінділерінде гемолиздің артуы көрсетілді. 1,1-ДМГ-нің төменгі концентрациялары эритроцит мембраналарының өткізгіштігін төмендетіп, асқын тотығу төзімділігі мен каталаза белсенділігін арттыруы, ал жоғары концентрацияларда кері әсер тудыратындығы анықталды.

Summary

Influence of 1,1-dimethylhydrazine (1,1-DMH) on the hemolysis in isotonic and hypotonic environments, peroxyde resistance of red blood cells, permeability of erythrocyte membranes, activity of catalase of erythrocytes has been investigated at *in vitro* conditions. Increasing of hemolysis in isotonic and hypotonic solutions of sodium chloride under action of toxicant was shown. It is established that low concentrations of 1,1-DMH decrease permeability of erythrocyte membranes, increase peroxyde resistance of erythrocyte and activity of catalase of red blood cells, and high concentrations cause opposite effects.