

## Біохімія

УДК 557,158,1: 616.379-008.64

### ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЕРИТРОНУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДІАБЕТУ

В.Бурда, Н.Біронт, Н.Сибірна, Г.Клевета

*Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна*

На підставі виявлених змін кількісних показників гемолітичних процесів (кількості ретикулоцитів, вмісту HbF), а також перекисного окиснення ліпідів оцінено динамічний стан еритроноу за умов експериментального стрептозотоцинового діабету та введення нікотинаміду.

*Ключові слова:* еритропоез, еритроно, діабет, нікотинамід.

У хворих на цукровий діабет стан еритропоезу й гематологічні показники периферичної крові суттєво не відрізняються від норми, що свідчить про здатність клітин еритроїдного ряду синтезувати звичайні кількості гемоглобіну також за умов недостатнього утворення інсуліну. У процесі еволюції системи крові сформувалися механізми множинної гуморальної регуляції еритропоезу, які забезпечують високу надійність системі еритроноу; в крові хворих на цукровий діабет простежується підвищений вміст гормону росту й еритропоетину. Утворення еритропоетину посилюється внаслідок гіпоксії нирок, яка виникає у зв'язку з розвитком діабетичних мікроангіопатій. У разі діабету, ускладненого нефропатією і хронічною нирковою недостатністю, можна очікувати пригнічення утворень еритропоетину й одночасно сповільнення еритропоезу та розвитку анемії [8]. Незважаючи на те, що вміст гемоглобіну й еритроцитів у крові хворих на цукровий діабет, звичайно, не відрізняється від норми, транспортна функція цих клітин, яка пов'язана з постачанням кисню до периферійних тканин і органів, усе ж порушена. У випадку цукрового діабету збільшується ригідність еритроцитів і знижується здатність змінювати форму, що допускає можливу патологію мембран. Зафіксована також підвищена здатність еритроцитів до агрегації. Цьому сприяє підвищення концентрації у сироватці крові фібриногену,  $\alpha_2$ - і  $\beta$ -глобулінів, а також зміни електростатичних властивостей еритроцитів і зміна їхньої деформації. Як схильність до агрегації, так і зменшення деформації еритроцитів призводить до збільшення в'язкості крові й ускладнення її руху по мікроциркуляторному руслі

[5, 7].

У хворих на цукровий діабет в еритроцитах виявлено підвищення вмісту глікозилизованого гемоглобіну, який утворюється внаслідок приєднання глюкозо-6-фосфату до ланцюгів гемоглобіну. Патогенетичне значення високого вмісту глікозилизованого гемоглобіну в еритроцитах полягає в тому, що він утворює міцний зв'язок із киснем і сприяє розвитку тканинної гіпоксії у разі цукрового діабету [6].

Дослідження проводили на щурах–самцях масою 120-150 г. Експериментальний цукровий діабет спричиняли внутрішньочеревним уведенням стрептозотоцину з розрахунку 7 мг на 100 г маси. Розвиток діабету контролювали за зростанням рівня глюкози в крові, яку визначали глюкозооксидазним методом. Для досліду брали тварин через 14 днів із рівнем глюкози 9–14 ммоль/л.

Терапевтичний ефект нікотинаміду досліджували у разі його внутрішньом'язового введення щоденно впродовж 14 днів щурам із розвиненою гіперглікемією дозою 200 мг на 1 кг маси.

Кістковий мозок виділяли зі стегнових і великогомілкових кісток. У периферійній крові підраховували кількість ретикулоцитів, визначали вміст фетального гемоглобіну (HbF) та проводили цитологічні дослідження клітин кісткового мозку [11]. Кислотну резистентність еритроцитів досліджували за Терсковим і Гітельзоном [14]. Крім цього, у кістковому мозку й еритроцитах визначали вміст ТБК-позитивних (тіобарбітурова кислота) продуктів [12].

Унаслідок морфологічного аналізу периферійної крові щурів за умов стрептозотоцинового діабету виявлено збільшення ретикулоцитів порівняно з нормою (табл. 1). Метаболічні порушення, які розвиваються за умов інсулінової недостатності в разі стрептозотоцинового діабету значно утруднюють функціонування системи підтримання гомеостазу, важливою ланкою якого є еритроцити периферійної крові. У випадку цукрового діабету змінюються фізичні, біохімічні, морфофункціональні властивості еритроцитів, які потрапляють у кров'яне русло на стадії ретикулоцитів. Зміни еритроцитів пов'язані з особливостями еритропоезу. З'ясовано, що інсулін стимульовально впливає на проліферацію еритроїдних колонієутворювальних клітин кісткового мозку незалежно від наявності еритропоетину. Висловлено припущення, що колонієутворювальні клітини кісткового мозку мають рецептори зі зниженою спорідненістю до інсуліну, і зв'язування інсуліну з рецепторами цих клітин може стимулювати їхній поділ навіть без еритропоетину [8]. За умов цукрового діабету часто виявляється симптоматична поліцитомія, яка є компенсаторною реакцією, спрямованою на збільшення кисневої ємності крові у відповідь на тканинну гіпоксію, яка виникає внаслідок збільшення в еритроцитах глікозилизованого гемоглобіну з підвищеною спорідненістю до кисню.

Дослідження вмісту фетального гемоглобіну в еритроцитах контрольних і діабетичних щурів (див. табл. 1) засвідчили, що розвиток стрептозотоцинового діабету призводить до підвищення вмісту фетального гемоглобіну в еритроцитах. Такі зміни є компенсаторно-приспосувальними за умов гіпоксії, яка виникає внаслідок цього захворювання, для поліпшення постачання тканин киснем з

огляду на його вищу спорідненість до кисню порівняно з НвА. Перехід синтезу гемоглобіну від одного типу до іншого відбувається під контролем еритропоєтину. Причому формування гетерогенної системи гемоглобіну пов'язане з диференціацією еритроїдних елементів і перебудовою, що зумовлює експресію певних глобінових генів [12].

Таблиця 1

Гематологічні показники периферійної крові щурів у разі стрептозотоцинового діабету,  $M \pm m, n = 9$

Умови досліджу	Ретикулоцити, %	Фетальний гемоглобін, %	Загальний гемоглобін, г %	Кількість еритроцитів, $10^6/\text{мкл}$
Контроль	24,0±0,60	9,70±0,30	8,90±0,20	7,45±0,24
Діабет	30,0±0,70*	13,2±0,40*	8,90±0,10	5,20±0,12*
Діабет+НАм (200мг на 1кг маси)	37,0±0,40**	20,0±0,40**	14,5±0,10**	5,16±0,19

\* Різниця вірогідна порівняно з контролем;  $p < 0,05$ .

\*\* Різниця вірогідна порівняно з діабетом,  $p < 0,05$ .

Для підтвердження картини динамічних змін еритроноу на клітинному рівні виконано цитологічні дослідження препаратів кісткового мозку щурів у нормі й за умов стрептозотоцинового діабету. Аналізуючи показники табл. 2, можна виявити зниження процентного вмісту поліхроматофільних та оксифільних нормоцитів у разі стрептозотоцинового діабету. Це можна пояснити сповільненим дозріванням еритрокаріоцитів і швидкими темпами елімінації ретикулоцитів у русло периферійної крові. Ці дані узгоджуються із підвищенням вмісту ретикулоцитів у периферійній крові щурів за умов експериментального стрептозотоцинового діабету, про що зазначено вище.

Таблиця 2

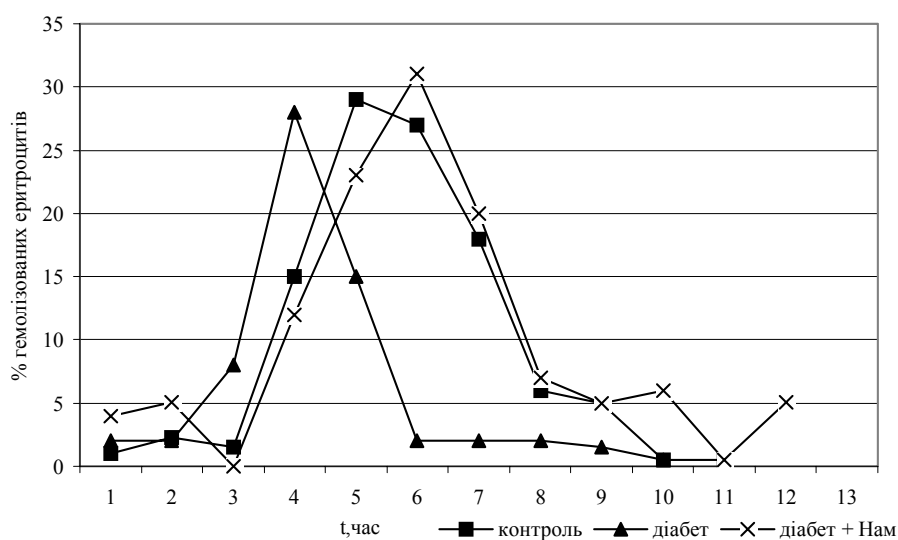
Морфологічні показники препаратів кісткового мозку щурів у разі експериментального стрептозотоцинового діабету, %,  $M \pm m, n = 11$

Варіанти Досліджу	Еритробласти	Пронормоцити	Нормоцити		
			базофільні	поліхроматофільні	Оксифільні
Контроль	4,10± 0,01	10,30±0,10	18,60±0,30	51,60±0,50	16,10±0,04
Діабет	8,00±0,20*	11,80±0,10	30,50±0,20*	38,60±0,20*	9,30±0,40*
Діабет + НАм (200мг на 1кг маси)	6,10±0,10**	7,80±0,80**	17,00±0,10**	48,00±0,40**	21,20±0,10**

\* Різниця вірогідна порівняно з контролем;  $p < 0,05$ .

\*\* Різниця вірогідна порівняно з діабетом,  $p < 0,05$ .

У результаті досліджень еритроцитів крові щурів методом кислотних еритрограм за умов експериментального цукрового діабету отримано криві гемолізу, які відображають динаміку змін якісного складу еритроцитів (див. рисунок). Аналіз одержаних даних засвідчив, що якісний склад еритроцитів крові щурів у разі цукрового діабету змінюється. Еритрограма зміщується вліво, що свідчить про знижену стійкість еритроцитів за умов діабету порівняно з контролем унаслідок старих еритроцитів, кількість яких збільшується в разі цієї патології.



Типові еритрограми еритроцитів щурів за умов стрептозотоцинового діабету.

Дослідженнями останніх років підтверджена важлива роль процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у структурно-функціональній модифікації біологічних мембран, зміні їхніх фізико-хімічних властивостей і проникності. З'ясовано, що активація процесів ендogenous ПОЛ, яка відіграє головну роль у розвитку стресорних та ішемічних пошкоджень в організмі, є типовим мембранним механізмом для багатьох патологічних станів [9]. Це підтверджують наші результати. Наприклад, вміст ТБК-позитивних продуктів і дієнових кон'югатів збільшується, що свідчить про посилення ПОЛ (табл. 3). Накопичення продуктів ПОЛ призводить до зменшення деформованості й пришвидшує старіння еритроцитів, призводить до збільшення в'язкості крові, що в сукупності сприяє потовщенню базальної мембрани судинної стінки, сповільненню кровотоку в дрібних і середніх судинах, порушенню реологічних властивостей крові, погіршенню мікроциркуляції [5, 7].

Деякі автори, враховуючи пошкоджувальну дію продуктів ПОЛ на біологічні мембрани, припускають, що ліпоперекиси беруть участь у розвитку судинних пошкоджень уже на ранніх стадіях захворювання. Як відомо, продукти ПОЛ гальмують синтез простагліну та сприяють розвитку гіперкоагуляції, що прискорює розвиток судинних пошкоджень [9]. Кінцеві продукти ПОЛ, незалежно від того, які індуктори спричиняють цей процес, призводять до деструктивних змін у клітині, до нагромадження в судинній стінці атерогенних ліпопротеїдів. Продукти ПОЛ знижують деформацію еритроцитів, пошкоджують судини, сприяють розвитку атеросклерозу. Такі зміни зумовлюють хронічні ускладнення за умов цукрового діабету, зокрема, діабетичні ангіопатії. Як свідчать дані літератури, є позитивна кореляція між інтенсивністю процесів ПОЛ, накопиченням перекисів у тканинах і ступенем важкості діабетичних ангіопатій та функціонуванням системи антиоксидантного захисту. Це свідчить про необхідність введення в лікування цукрового діабету препаратів, які мають антиоксидантні властивості.

З цієї метою ми проводили двотижневе щоденне введення нікотинаміду дозою 200 мг на 1 кг маси тварин. Картина показників крові в разі введення нікотинаміду, який спрямовано впливає на систему нікотинамідних коферментів, значно змінюється. Після введення нікотинаміду спостерігали підвищення вмісту фетального гемоглобіну й ретикулоцитів у щурів (див. табл. 1). Це свідчить про те, що введення нікотинаміду в разі діабету стимулює еритропоез. Це своєрідна адаптація організму до гіпоксичного стану, який розвивається внаслідок такої патології. Введення нікотинаміду нормалізувало показники мієлограми, що можна пояснити прискореним дозріванням клітин червоного ряду з паралельним підвищенням їхнього виходу із синусів кісткового мозку (табл. 2).

Таблиця 3

Вміст ТБК–позитивних продуктів у кістковому мозку й еритроцитах крові щурів за умов стрептозотоцинового діабету,  $M \pm m$ ,  $n = 8$

Умови досліджу	Еритроцитів, мкмоль/мл	Білок червоного кісткового мозку, мкмоль/мг	Білок білого кісткового мозку, мкмоль/мг
Контроль	67,10±8,50	79,50±5,00	27,90±2,90
Діабет	124,30 ±11,70*	114,10±11,50*	104,20±11,00*
Діабет+НАм (200 мг на 1кг маси)	68,80±7,60**	58,60±7,70**	65,30±8,20**

\* Різниця вірогідна порівняно з контролем;  $p < 0,05$ .

\*\* Різниця вірогідна порівняно з діабетом,  $p < 0,05$ .

Під час дослідження кислотних еритрограм за умов введення нікотинаміду виявлено зміщення кривої гемолізу вправо, що свідчить про підвищення стійкості еритроцитів, зумовленої збільшенням кількості молодих форм еритроцитів (див. рисунок). Введення нікотинаміду супроводжується зниженням процесів ПОЛ, а саме, зменшується вміст ТБК-позитивних продуктів, знижується рівень

глікозильованого гемоглобіну (табл. 3). В основі протиперекисної дії нікотинаміду (НАм) є його здатність безпосередньо взаємодіяти з гідроперекисами ліпідів із утворенням оксиду нікотинаміду. Крім цього, НАм гальмує процеси ліполізу в клітинах, знижуючи активність монооксигеназної системи мікросом шляхом взаємодії з цитохромом Р-450. Гіполіпідемічний ефект нікотинаміду після двотижневого курсу введення виявляється в зниженні рівня атерогенних ліпопротеїнів, триацилгліцеринів і холестерину плазми крові.

Нікотинамід, в основі біохімічного механізму дії якого є значне посилення біосинтезу в тканинах і селективна зміна окисно-відновного стану вільних нікотинамідних коферментів, виявляє гіпоглікемічний ефект у разі інсулінзалежного цукрового діабету (ІЗЦД) [1, 3]. У щурів із стрептозотоциновим діабетом, мишей з генетично детермінованим діабетом і в людей, хворих на цукровий діабет, після курсу введення НАм знижується рівень глюкози, зв'язаних із білками гексоз, атерогенних ліпопротеїнів, холестерину та нормалізується співвідношення ліпопротеїнів крові. Зміни в низці ланок метаболічного контролю, опосередковані НАм, реалізуються на рівні зміни активності ключових ферментів вуглеводного та ліпідного обміну та ферментних систем, які забезпечують високий пул відновних еквівалентів у реакціях біосинтезу [2, 10].

1. Бурда В.А., Великий М.М., Обросова І.Г., Федик М.Я. Вплив нікотинаміду на процеси глікозилювання гемоглобіну при стрептозотоциновому діабеті // Вісник Львів. ун-ту, сер. біол. 1994. Вип. 23. С. 104-109.
2. Великий Н.Н., Бурда В.А., Обросова І.Г. и др. Корректирующий эффект никотинамида на процессы гликозилирования гемоглобина при стрептозотоциновом диабете у крыс // Вопр. мед. химии. 1995. Т. 38. № 1. С. 36-38.
3. Великий Н.Н., Обросова І.Г. и др. Никотинамидные коферменты в регуляции клеточного метаболизма при разных типах диабета // Вопр. мед. химии. 1992. Т. 38. № 4. С. 45-58.
4. Великий М.М., Обросова І.Г., Федик М.Я. та ін. Регуляція клітинного метаболізму нікотинамідними коферментами за різних типів діабету // Вісник Львів. ун-ту. Сер.біол. 1992. Вип. 22. С. 82-95.
5. Выдыборец С.В. Изменение эритроцитов при сахарном диабете // Врач. дело. 1990. № 2. С. 56-61.
6. Галенок В.А., Боднар П.Н., Диккер В.Е. Гликозилированные протеины.- Новосибирск: Наука. 1989. 225 с.
7. Галенок В.А., Гостинская Е.В., Диккер В.Е., Колбман Б.Л. и др. Реологические свойства крови и кислородный баланс тканей при экспериментальном аллоксановом диабете // Пробл. эндокрин. 1983. № 3. С. 68-72.
8. Козлов Ю.А., Лаврова В.С. Система крови при сахарном диабете // Успехи совр.биол. 1988. Т. 105. № 3. С. 505-519.
9. Мамедгасанов Р.М., Рахмани С.А. Динамика перекисного окисления липидов у больных инсулиннезависимым типом сахарного диабета // Пробл.

- ендокринологии. 1989. № 1. С. 19–21.
10. *Mendola G., Gasamitycana R., Gomis R.* Effect of nicotinamide therapy upon – cells functions in insulin dipendent diabetic paciens //Diabetologia. 1989. Vol. 3. P. 160–162.
  11. *Сибірна Н.О., Великий М.М.* Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: Метод. посібник.– Львів: ЛДУ, 1997. 69 с.
  12. *Стародуб Н.Ф., Назаренко В.И.* Гетерогенная система гемоглобина: структура, свойства, синтез, биологическая роль.– К.: Наук. думка, 1987. 200 с.
  13. *Тимирбулатов Р.А., Селезнев Е.И.* Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 209–211.
  14. *Терсков И.А., Гутельзон М.И.* Эритрограммы как метод клинического исследования крови.– Красноярск: Изд-во Сиб. Отдел. АН СССР, 1959. 246 с.

## INVESTIGATION OF ERYTRONE FUNCTIONAL STATE UNDER THE CONDITIONS OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

**V.Burda, N.Byront, N.Sybirnay, G.Kleveta**

*Ivan Franko National University of L'viv,  
Hrushevskoho st., 4, L'viv 79005, Ukraine.*

Basing on variation of quantitative figures in hemolytic processes the evaluation of erythrone dynamic state was made under the conditions of streptozotocin-induced diabetes and nicotinamide influence.

*Keywords:* erutropoeses, erytrone, diabetes, nicotinamide.

Стаття надійшла до редколегії 22.06.2001

Прийнята до друку 18.07.2001