

3. Показатель качества жизни может способствовать ранней диагностике рецидивоопасных клинических состояний ремиссионного периода в наркологии с целью оказания экстренной, адресной (в зависимости от структуры показателя качества жизни), комплексной, противорецидивной терапии и быть средством контроля эффективности превентивных, краткосрочных терапевтических интервенций.

Заключение

В результате исследования установлено, что возникающие на фоне ремиссии рецидивоопасные клинические ситуации ухудшают качество жизни пациентов с алкогольной зависимостью. Тест «Показатель качества жизни» позволяет своевременно обнаруживать изменения качества жизни пациентов, дифференцированно выбрать лечение и служит методом контроля эффективности профилактических терапевтических интервенций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бараненко А.В. Оценка субъективного качества жизни у лиц с зависимостью от алкоголя // Украинс. вестн. психоневрологии. — 2002. — Т. 10. — Вып. 2 (31). — С. 113–114.
2. Валентик Ю.В. Континуальная психотерапия больных с зависимостью от психоактивных веществ: Лекции по наркологии / Под ред. Н.Н. Иванца. — М., 1999. — С. 269–287.
3. Громыко Д.И. Уровни мотивации к лечению и их зависимость от клинико-психологических характер-

ристик больных алкоголизмом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.45. — СПб., 2002. — 22 с.

4. Ерышев О.Ф., Рыбакова Т.Г., Шабанов П.Д. Алкогольная зависимость: формирование, течение, противорецидивная терапия. — СПб.: ЭЛБИ, 2002. — 192 с.

5. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — Киев: МОРИОН, 2001. — 408 с.

6. Максимчук В.П. Перспективы развития наркологической службы в республике Беларусь // Рецент. — 2001. — № 6. — С. 27–31.

7. Мизерене Р.В. Оценка и прогноз длительности ремиссии при лечении алкоголизма методом эмоционально-эстетической психотерапии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.18; 14.00.45. — СПб., 2000. — 18 с.

8. Сосин И.К., Лазирская Л.В., Сквира И.М. и др. Рецидивоопасные клинические ситуации ремиссионного периода в наркологии // Новые подходы к психотерапии и фармакотерапии состояний зависимости от психоактивных веществ: Матер. 5-й Укр. конф. с межд. участ., посвящ. 86-й год. со дня рожд. Заслуженного врача Украины, народного врача СССР А.Р. Довженко 6–7 апреля 2004 г. — Харьков, 2004. — С. 153–159.

9. Mezzich J.E., Cohen Neal, Lin Jason, Ruiperez Maria, Joon Ghyon, Igbal Saeed, Perez Carlos. Validation an efficient quality life index // Abstracts 11 World Congress psychiatry «Psychiatry on new Thresholds». — Hamburg, Germany, 6–11 August 1999. — P. 427–428.

Поступил 10.11.2005

УДК 577.322+616-018.1]:577.121.7

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ВЗРЫВ В ЭРИТРОЦИТАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИСТЕМЫ « $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ »

М.Н. Стародубцева, С.Н. Черенкевич

Гомельский государственный медицинский университет
Белорусский государственный университет

В работе хемилюминесцентными методами изучены условия стремительного развития окислительного стресса в эритроцитах (окислительного взрыва), вызванного их взаимодействием с реагентами системы « $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ » при участии гемоглобина. Выявлено, что при концентрациях реагентов выше 500 мкМ наблюдается лавинообразное накопление активных продуктов взаимодействия гемоглобина и реагентов системы « $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ », предположительно, феррилгемоглобина, диоксида азота и пероксинитрита, что и инициирует окислительный взрыв в эритроцитах. Сопровождающее окислительный стресс закисление цитозоля до pH 6,5 активирует производство этих активных агентов в реакциях с внутриклеточным гемоглобином. Выдвинута гипотеза о наличии положительной обратной связи в механизме развития окислительного стресса в клетках с участием гемсодержащих белков.

Ключевые слова: окислительный взрыв, активные формы азота, гемоглобин, эритроциты.

**OXIDATIVE BURST IN RED BLOOD CELLS
UNDER THE ACTION OF « $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ » SYSTEM**

M.N. Starodubtseva, S.N. Cherenkevich

**Gomel State Medical University
Belarus State University**

The conditions of development of impetuous oxidative stress in red blood cells (oxidative outburst) caused by red blood cell interaction with reagents of system « $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ » with hemoglobin participation were studied. The avalanche accumulation of reactive species such as ferrylhemoglobin, nitrogen dioxide, and peroxynitrite in the reaction of hemoglobin with reagent of the system « $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ » was revealed at reagent concentration higher than 500 μM . The intracellular acidosis down to pH 6,5 which accompanies the cellular oxidation stress activates the reactive species production in the hemoglobin reactions. Hypothesis of positive feedback presence in the mechanism of oxidative stress development with hemeprotein participation in cells was advanced.

Key words: oxidative stress, reactive nitrogen species, hemoglobin, red blood cell.

Введение

Гемсодержащие белки широко распространены и выполняют важные функции в живых организмах. Сочетание комплексов протопорфирина с ионами железа и сложного аминокислотного состава белковых компонентов определяет разнообразие реакций, в которые эти белки вступают. Гемсодержащие белки могут участвовать в контроле динамического равновесия окислительно-восстановительных реакций в клетке. При определенных условиях гемсодержащие белки удерживают это равновесие на уровне редокс-регулирования клеточных процессов, а при других — смещают его в сторону окислительного стресса [4]. Окислительный стресс клеток и тканей сопровождает многие болезни человека, называемые редокс-ассоциированными заболеваниями, включающими в себя диабет, атеросклероз, гипертензион, нейро-дегенеративные заболевания.

В работе обсуждаются условия, вызывающие стремительное развитие окислительного стресса в эритроцитах (окислительного взрыва), при участии гемоглобина и активных форм азота и кислорода.

Материалы и методы

В работе использовали NaNO_2 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , («Реахим», Россия, ч.д.а.), люминол («Sigma», США). Остальные реактивы были производства России и Беларуси. Растворы NaNO_2 и H_2O_2 готовили непосредственно перед опытом. Эритроцитарную массу получали из крови здоровых добровольцев. Эритроциты трижды отмывали и ресусцинировали в фосфатном буфере.

Хемилюминесценцию изучали на биохемилюминометре БХЛ-1 (БГУ, Минск, Беларусь) при комнатной температуре. Инициирование реакций, сопровождающихся свечением, осуществляли введением H_2O_2 в темноте в кювету, содержащую 2 мл подготовленной суспензии эритроцитов или раствора гемоглобина (фосфатный буфер или буфер Эрла, pH 6,3 или 7,4). При анализе кинетики хемилюминесценции использовали следующие характеристики: I_1 и I_2 — максимальные интенсивности первой и второй стадий развития свечения соответственно, t_{lag} — значение лаг-периода и t_{max} — время достижения второго максимума интенсивности свечения (рис. 1, кричая 1). При изучении люминол-зависимой хемилюминесценции суспензий эритроцитов или водных растворов гемоглобина в среду, содержащую эритроциты (32 000 клеток в кювете, буфер Эрла, pH 6,3) или гемоглобин (фосфатный буфер), непосредственно перед измерением интенсивности хемилюминесценции вводили люминол и в темноте практически одновременно — NaNO_2 и H_2O_2 . При изучении люминол-зависимой H_2O_2 -индуцированной хемилюминесценции суспензий эритроцитов концентрированные суспензии эритроцитов (гематокрит — 20–40%) подвергали действию системы « $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ » в течение 5 мин (фосфатный буфер, pH 6,3), после чего суспензии трехкратно отмывали буферным раствором (pH 7,4) и измеряли интенсивность их люминол-зависимой H_2O_2 -индуцированной хемилюминесценции (буфер Эрла, pH 7,4).

Концентрацию форм гемоглобина в гемолизатах определяли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра СФ-18 (Россия).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по стандартным методикам программы Excel ($n=3\div 8$, $\alpha=0.05$).

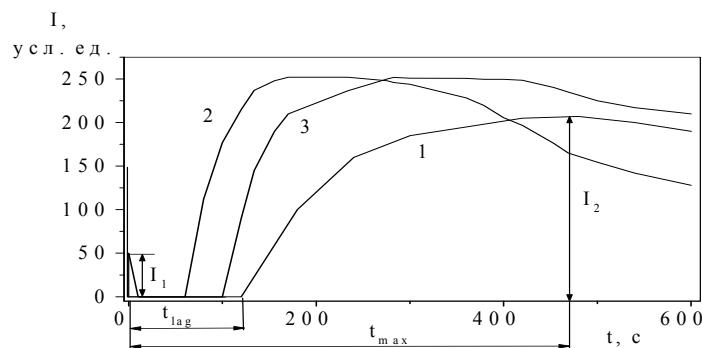


Рис. 1. Кинетические кривые интенсивности (I) люминол-зависимой хемилюминесценции супензии эритроцитов (1) и водного раствора гемоглобина (2 и 3) при действии системы $\text{«NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$. Супензии эритроцитов содержали: 2,5 мМ NaNO_2 , 2,5 мМ H_2O_2 и 25 мкМ люминола, буфер Эрла, pH 6,3. Водные растворы гемоглобина содержали: 36 мкМ гемоглобина, 5 мМ NaNO_2 , 5 мМ H_2O_2 и 12,5 мкМ люминола, фосфатный буфер, pH 6,3 (2), pH 6,7 (3). Параметры хемилюминесценции описаны в разделе «Материалы и методы».

Результаты и их обсуждение

Реакции гемсодержащих белков с нитритом и активными формами азота и кислорода. Нитротиозин, нитротриптофан и окисленные тиольные группы белков являются хорошо известными маркерами окислительного стресса клеток и тканей организма человека и выявляются в повышенных количествах при редокс-ассоциированных заболеваниях [8, 12]. Гемсодержащие белки, такие как миоглобин, гемоглобин и некоторые пероксидазы могут катализировать образование нитротиозина и нитротриптофана также хорошо, как и окислять тиольные группы белков в реакции с пероксинитритом или при превращении нитрита в нитрат с участием пероксида водорода [5, 10, 13]. Пероксинитрит является продуктом реакции монооксида азота с супероксиданион-радикалом, вырабатываемых при различных патологических процессах многими клетками одновременно [7], или реакции пероксида водорода с нитритом. В организме человека уровни пероксида водорода и нитритов повышаются при различных патологиях, в особенности, при сопутствующем курении, терапии азотсодержащими лекарствами, неблагоприятной экологической обстановке. Мы изучили условия генерирования активных агентов, способных модифицировать структуру других молекул, в реакции гемоглобина с нитритом и пероксидом водорода с помощью хемилюминес-

центных методов. В качестве молекулы-мишени действия активных агентов реакции был использован люминол. В реакциях люминола с такими активными агентами, как пероксинитрит, супероксиданион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, феррилгемоглобин и образуются возбужденные интермедиаты, переход которых в основное состояние сопровождается высокой интенсивностью свечением [11].

Кривая хемилюминесценции раствора, содержащего гемоглобин, NaNO_2 , H_2O_2 и люминол, характеризуется наличием лаг-периода и длительным высокоинтенсивным свечением (рис. 1, кривые 2 и 3). В основном свечение возникает благодаря производству пероксинитрита, диоксида азота и феррилгемоглобина в этой реакции [10]. Интенсивность и длительность свечения максимальны при значениях pH среды, ниже физиологических (pH 6,5–7,0) (рис. 2а и 2б). Полученные данные сходны с результатами работы Kilinc K. с соавторами [6], в которой анализировалось производство нитротиозина и потребление нитрита в реакции миоглобина с системой $\text{«NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$. Очевидно, что производство активных продуктов в реакциях гемоглобина с системой $\text{«NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ уменьшается при увеличении значений pH среды вплоть до физиологических значений: увеличивается лаг-период и уменьшаются интенсивность и длительность свечения (рис. 2а и 2б).

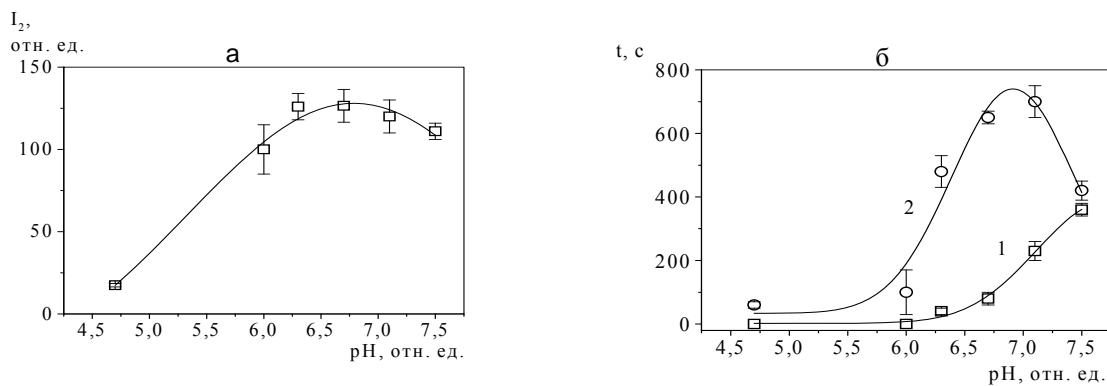


Рис. 2. а) pH-зависимость максимальной интенсивности (I_2) второй стадии развития люминол-зависимой хемилюминесценции раствора гемоглобина при действии системы $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$; б) pH-зависимость длительности лаг-периода (t_{lag} , кривая 1) и времени достижения второго максимума интенсивности (t_{max} , кривая 2) люминол-зависимой хемилюминесценции раствора гемоглобина при действии системы $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$.

Фосфатный буфер. 36 μM HbO_2 , 5 mM NaNO_2 , 5 mM H_2O_2 , 12.5 μM люминола.

Взаимодействие эритроцитов с системой $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$. Производство активных агентов эритроцитами при действии на них системы $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$, оцениваемое нами по параметрам люминол-зависимой хемилюминесценции супензий эритроцитов, зависит от начальной концентрации реагентов (рис. 3а и 3б). Анализ зависимостей параметров люминол-зависимой хемилюминесценции супензии эритроцитов от начальной концентрации реагентов позволил выявить три важных диапазона концентраций: до 250–500 мкМ, 500 мкМ–1 мМ, выше 1 мМ (рис. 2а и 2б). Первый диапазон

концентраций реагентов характеризуется низкоинтенсивной хемилюминесценцией с заметно выраженным лаг-периодом. Во втором диапазоне длительность лаг-периода уменьшается, а интенсивность свечения возрастает. Высокоинтенсивное свечение характерно для третьего диапазона концентраций. Параметры кинетической кривой люминол-зависимой хемилюминесценции супензии эритроцитов в этом диапазоне концентраций близки к параметрам кинетической кривой люминол-зависимой хемилюминесценции раствора гемоглобина при избытке NaNO_2 и H_2O_2 (рис. 3, кривые 1–3).

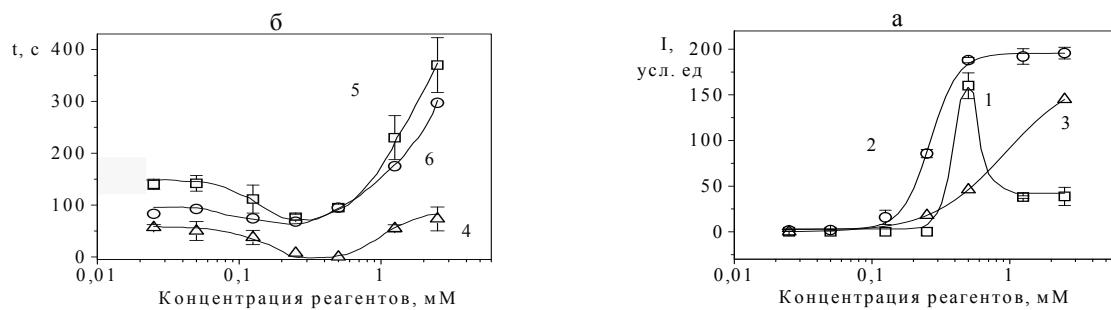


Рис. 3. а) Зависимость параметров люминол-зависимой хемилюминесценции супензии эритроцитов (I_1 и I_2) от концентрации реагентов системы $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$. Кривая 3 представляет зависимость параметра I_2 от концентрации H_2O_2 при отсутствии в растворе NaNO_2 ;

б) Зависимость длительности лаг-периода (t_{lag}), времени достижения второго максимума (t_2) интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции супензии эритроцитов и параметра $\Delta t=t_2-t_{lag}$ от концентрации реагентов системы $\text{NaNO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$.

Буфер Эрла содержал 25 мкМ люминола, pH 6,3.

Мы изучили также люминол-зависимую H_2O_2 -индуцированную хемилюминесценцию эритроцитов, обработанных системой « $NaNO_2+H_2O_2$ ». Люминол-зависимая H_2O_2 -индуцированную хемилюминесценцию клеток отражает, в основном, редокс-статус клетки: уровень развития процессов перекисного окисления липидов, активности антиокислительных ферментов (глутатион-пероксидазы, каталазы и др.) и концентрации низкомолекулярных антиоксидантов [1, 2]. Зависимость интенсивности хеми-

люминесценции от начальной концентрации реагентов системы « $NaNO_2$ и H_2O_2 », действующих на эритроциты, характеризуется наличием двух стадий: реагенты в концентрации до 500 мкМ — 1 мМ вызывают низкоинтенсивное свечение, а в концентрациях выше 1 мМ — высокоинтенсивное свечение (рис. 4, кривые 1 и 2). Подобного типа концентрационные зависимости характерны для окисления оксигемоглобина, глутатиона и изменения уровня АТФ в клетке при действии пероксинитрита [3, 9].

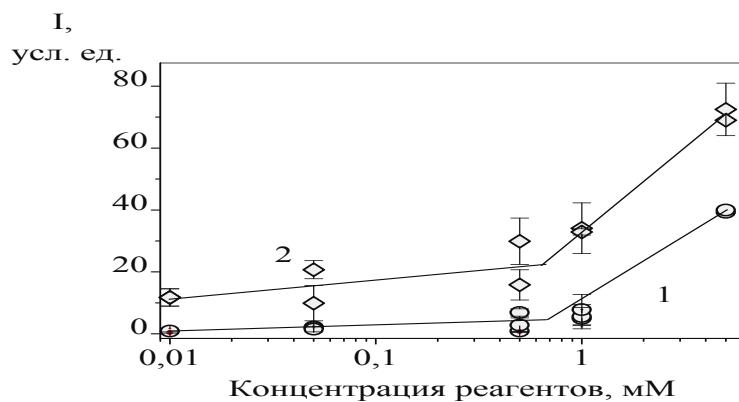


Рис. 4. Зависимость максимальной интенсивности люминол-зависимой H_2O_2 -индуцированной хемилюминесценции супензии эритроцитов (I_1) от концентрации реагентов системы « $NaNO_2+H_2O_2$ ». Супензии эритроцитов содержали: 12,5 μ M люминола и 25 μ M H_2O_2 (1); 5 μ M люминола и 0,25 mM H_2O_2 (2). Буфер Эрла, pH 7,4.

При низких концентрациях активные реагенты изучаемой системы взаимодействуют исключительно с ферментами и низкомолекулярными антиоксидантами системы антиокислительной защиты клетки: каталаза расщепляет H_2O_2 , глутатион реагирует с H_2O_2 и формами пероксинитрита, глюкоза реагирует с пероксинитритом [4], что и обуславливает наличие лаг-периода и низкоинтенсивное свечение в диапазоне концентраций реагентов до 500 мкМ. Реагенты в концентрациях выше 500 мкМ вызывают широкомасштабное вступление в реакции с активными реагентами системы « $NaNO_2+H_2O_2$ » гемоглобина — основного белка эритроцитов. Это способствует лавинообразному увеличению количества активных продуктов взаимодействия эритроцитов с системой « $NaNO_2+H_2O_2$ »: дополнительно образуются феррилгемоглобин, диоксид азота и пероксинитрит [10]. Это вызывает не просто окислительный стресс, а окислительный взрыв в эритроцитах.

Заключение

Окислительный стресс клетки и гемсодержащие белки. Как известно, окислительный стресс клеток сопровождается их ацидозом. Уменьшение внутриклеточного pH до 6,5, экспериментально определяемое при окислительном стрессе для различных клеток, приводит к включению сложного механизма положительной обратной связи. С одной стороны, уменьшение pH ниже 6,8 смещает равновесие форм пероксинитрита в сторону высокореакционноспособной формы пероксинитрита — пероксиазотистой кислоты. В закислении цитозоля могут играть важную роль и гемсодержащие белки. Например, окисление гемоглобина способствует уменьшению значения внутриклеточного pH (эффект Бора). С другой стороны, согласно нашим данным и данным литературы, уменьшение внутриклеточного pH активирует реакцию катализа гемсодержащим белком превращений кислородсодержащих соединений азота, продуктами которой являются высокоактивные агенты, главными из

которых являются феррил-форма гемсодержащего белка и диоксид азота. В обоих случаях создаются условия для дальнейшего лавинообразного развития окислительного стресса, что приводит к быстрой ликвидации клетки через некроз или иные механизмы удаления клеток с дефектами структур в организме. Действительно, в эритроцитах окислительный взрыв вызывает широкомасштабное перекисное окисление липидов, образование сшивок липидных макромолекул, нарушение структуры цитоскелета и увеличение жесткости мембранны клетки, что способствует быстрому разрушению эритроцитов в селезенке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Суханова Л.Я., Каменская В.В. Хемилюминесценция разновозрастных групп эритроцитов у больных сахарным диабетом // Лабораторное дело. — 1989. — № 12. — С. 33–36.
2. Шерстнёв М.П., Ли В.С., Хагалов Э.М., Сергеенко В.И., Лопухин Ю.М. Хемилюминесценция эритроцитов разного возраста в присутствии H_2O_2 // Проблемы гематологии и переливания крови. — 1982. — № 10. — С. 50–52.
3. Denicala A., Souza J.M., Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes // Proceeding of National Academy of Sciences of USA. — 1998. — Vol 95. — P. 3566–3571.
4. Frein D., Schildknecht S., Bachschmid M., Ullrich V. Redox regulation: a new challenge for pharmacology // Biochemical Pharmacology. — 2005. — Vol 70. — P. 811–823.
5. Grzelak A., Balcerzyk A., Mateja A., Bartosz G. Hemoglobin can nitrate itself and other proteins // Biochimica et Biophysica Acta. — 2001. — Vol. 1528. — P. 97–100.
6. Kilinc K., Kilinc A., Wolf R.E., Grisham M.B. Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration: no need for peroxy nitrite // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2001. — Vol. 285. — С. 273–276.
7. Pryor W.A., Squadrito G.L. The chemistry of peroxy nitrite: a product from the reaction of nitrite with superoxide // American Journal of Physiology. — 1995. — Vol. 268. — P. 699–722.
8. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples // Drug metabolism review. — 2000. — Vol. 32. — P. 307–326.
9. Soszynski M., Bartosz G. Effects of peroxy nitrite on erythrocytes // Biochimica et Biophysica Acta — 1996. — Vol. 1291. — P. 107–114.
10. Starodubtseva M.N., Cherenkevich S.N., Semenkova G.N. Chemiluminescence analysis of interaction between hemoglobin and sodium nitrite and hydrogen peroxide In Chemiluminescence at the turn of the Millennium: An indispensable tool in modern chemistry, biochemistry and medicine, Ed.: Albrecht S., Zimmermann Th., Brandl H., Dresden: Schweda-Werbedruck GmbH // Druckerei & Verlag. — 2001. — P. 76–81.
11. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxy nitrite // Circulation Research. — 2001. — Vol. 89. — P. 224–236.
12. Turko I.V., Murad F. Protein Nitration in Cardiovascular Diseases // Pharmacological Review. — 2002. — Vol. 54. — P. 619–634.
13. Witting P.K., Mauk A.G., Douglas D.J., Stocker R. Reaction of human myoglobin and peroxy nitrite: characterizing biomarkers for myoglobin-derived oxidative stress // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2001. — Vol. 286. — P. 352–356.

Поступила 06.12.2005

УДК: 61:378 «312»

ВЗГЛЯД НА ОСОБЕННОСТИ МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

А.П. Шмаков, А.Э. Питкевич, А.А. Янушкевич, Н.Н. Зуев

Витебский государственный медицинский университет

В статье обсуждаются проблемы высшего медицинского образования в современных условиях. Дается оценка качеству подготовки выпускников и пути ее улучшения в контексте реформирования образовательной системы.

Ключевые слова: образование, профессиональная подготовка, умения и навыки.

THE VISION OF FEATURES OF THE MEDICAL EDUCATION IN MODERN CONDITIONS

А.П. Shmakov, A.Е. Pitkevich, A.А. Yanushkevich, N.N. Zuev

Vitebsk State Medical University

Problems of higher medical education in modern condition are discussed in our article. We give thoughts about its improvement.

Key words: education, professional preparation, skills.