

9. *Matthews D.E.* Observations of branched-chain amino acid administration in humans // *J Nutr.* — 2005. — Vol. 135, № 6. — P. 1580–1584.

10. *Millward D.J.* An adaptive metabolic demand model for protein and amino acid Requirements // *Br J Nutr.* — 2003. — Vol. 90, № 2. — P. 249–260.

11. *Yoshizawa F.* Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2004. — Vol 313, № 2. — P. 417–422.

Поступила 20.02.2006

УДК 616.155.13: 612.127.4

**ОСОБЕННОСТИ ПОЙКИЛОЦИТОЗА,
ВЫЗВАННОГО ДЕЙСТВИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ АЗОТА**

**М.Н. Стародубцева, Т.Г. Кузнецова, Т.А. Кузнецова,
Дж.К. Эллори, С.Н. Черенкевич, С.О. Абетковская**

**Гомельский государственный медицинский университет
Институт тепло-массообмена НАН Беларуси им. А.В. Лыкова
Оксфордский университет
Белорусский государственный университет**

В работе методами световой, электронной сканирующей и атомно-силовой микроскопии были изучены изменение формы, структуры и механических свойств мембраны эритроцита после обработки цельной человеческой крови пероксинитритом. Установлено, что первичными механизмами изменения формы эритроцита (акантоцитоз и сфероцитоз) при действии активных форм азота являются фазовое разделение липидов, связанное с перекисным окислением липидов, и агрегация спектрина.

Ключевые слова: пероксинитрит, пойкилоцитоз, акантоцит, мембранные домены

**PECULIARITIES OF POIKILOCYTOSIS INDUCED
BY REACTIVE NITROGEN SPECIES ACTION**

**M.N. Starodubtseva, T.G. Kuznetsova, T.A. Kuznetsova,
J.C. Ellory, S.N. Cherenkevich, S.O. Abetkovskaya**

**Gomel State Medical University
Institute Heat-and-mass Transfer of NAS of Belarus of a name A.V. Likov
Oxonian University
Belarussian State Medical University**

The changes in a shape, a structure and mechanical properties of erythrocyte membrane after the treatment of whole human blood with peroxy-nitrite were studied by the methods of light, electron scanning and atomic force microscopy. The primary mechanisms of the changes in erythrocyte shape (acanthocytosis and spherocytosis) at the action of reactive nitrogen species state to be lipid phase separation as a result of lipid peroxidation and spectrin aggregation.

Key words: peroxy-nitrite, poikilocytosis, acanthocyte, membrane domains.

Введение

Активные формы азота могут участвовать как в физиологических, так и патологических процессах в организме [9, 12]. Такие активные формы азота, как пероксинитрит и диоксид азота, в основном, участвуют в развитии патологических состояний организма человека [2, 6, 8]. Активные фор-

мы азота реагируют с белками и липидами мембраны эритроцита, изменяя ее механические и транспортные свойства, а также форму клетки [7, 10, 13, 14]. Часто невозможно выделить роль конкретной активной формы азота в этих процессах, так как в реакциях активных форм одного типа с другими молекулами образуются новые

типы активных форм азота. Так, при действии пероксинитрита на белки одновременно присутствуют несколько активных форм азота: HOONO , ONOO^- , ONOOCO_2^- , NO_2 [1, 12].

Пойкилоцитоз является характерной чертой ряда заболеваний (диабет, нервно-дегенеративные заболевания), в числе ключевых факторов развития которых называют активные формы азота [3, 4, 5].

Цель работы — установление форм эритроцитов цельной крови после ее обработки пероксинитритом, а также механизмов, ответственных за пероксинитрит-индуцированный пойкилоцитоз.

Материалы и методы

Пероксинитрит получали в реакции NaNO_2 и H_2O_2 в кислых водных растворах с последующим быстрым их защелачиванием [15]. В работе использовали NaNO_2 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 производства «Реахим» (Россия, ч.д.а.). Остальные реактивы (х. ч.) были производства России и Беларуси. Избыток H_2O_2 в растворах пероксинитрита удаляли фильтрацией раствора через гранулированный MnO_2 . Пероксинитрит добавляли в кровь здоровых добровольцев (1 мл) в виде капли объемом 5 $\mu\text{л}$ при постоянном перемешивании при комнатной температуре (опытные образцы). За контроль брали образцы крови, которые не обрабатывали пероксинитритом. Степень развития окислительного стресса в опытных образцах контролировали по степени окисления внутриэритроцитарного гемоглобина. Эритроциты подвергали химической фиксации 1% раствором глутарового альдегида, после чего отмывали в трех сменах фосфатного буфера, а затем — в трех сменах дистиллированной воды. Взвесь эритроцитов наносили на стеклянную подложку для дальнейшего их изучения с помощью световой, электронной сканирующей и атомно-силовой микроскопии. Световая микроскопия и анализ полученных изображений был выполнен с использованием светового микроскопа «Olympus» с увеличением $\times 800$ и аппаратно-программного комплекса «Хромосома 1». Сканирующая электронная микроскопия была выполнена на напыленных образцах на приборе «Cam Scan» (Oxford Instruments, Англия).

Атомно-силовая микроскопия. Исследования проводили с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь). Был вы-

бран контактный режим сканирования. Использовались стандартные зонды NSC11 (Micromash Co., Россия). В данном режиме регистрировали изображения топографии, угла кручения и отклонения консоли АСМ. Изображения угла кручения интерпретировались как карта неоднородности механических свойств и состава объекта на участке сканирования. Исследования проводили первоначально на участках 25×25 мкм, где выбирались дискоциты, а затем на участках их поверхности размером 5×5 мкм. Расчет модуля Юнга проводили по стандартной методике ОДО «Микротестмашины», Беларусь. Анализировали $8 \div 16$ изображений пространственного распределения угла кручения зонда микроскопа для образцов каждого типа (16 мкм^2).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по стандартным методикам программы Excel ($n=3 \div 8$, $\alpha = 0.05$). Результаты статистического анализа представлены в виде границ доверительного интервала с доверительной вероятностью 0,95. Сравнение средних выборочных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение.

Морфология эритроцитов при обработке цельной крови пероксинитритом

Введение пероксинитрита в цельную кровь вызывает морфологические изменения эритроцитов. В крови, обработанной пероксинитритом, присутствуют эритроциты в форме спущенного мяча, акантоциты, эхиноциты, овалоциты и сфероциты. Минимальная концентрация пероксинитрита, при которой наблюдается пойкилоцитоз, изменяется от донора к донору и приблизительно равна 300 мМ . При этих концентрациях внутриклеточный гемоглобин уже частично переходит в мет-форму, что указывает на развитие окислительного стресса в клетке. Изменение формы эритроцита начинается с появления одного или нескольких выпячиваний на поверхности дискоцита (рис. 1, а и б). С увеличением концентрации пероксинитрита выпячивания мембраны увеличиваются в размере, их число растет (рис. 1, в), дискоидная форма переходит в овальную или сферическую. Наблюдаются выпячивания разного размера, и они неравномерно распределены по поверхности мембраны. Подобные особенности формы характерны для акантоцита [3].

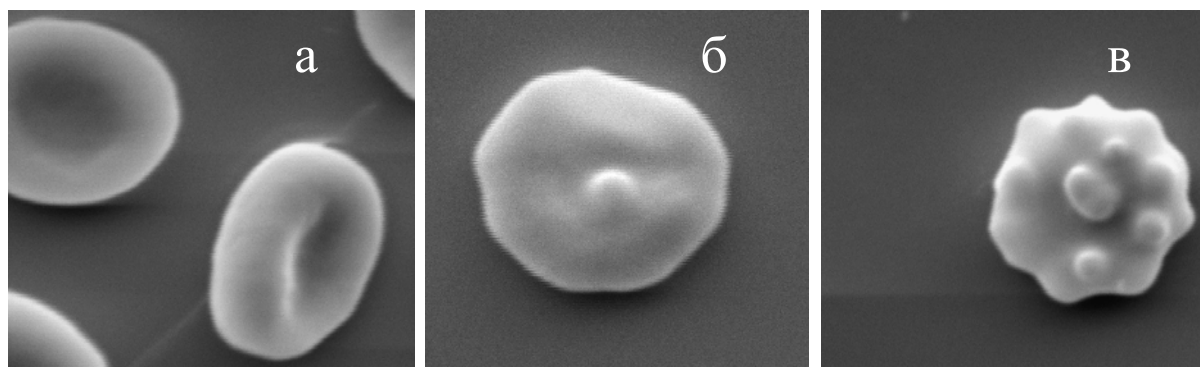


Рис. 1. Формы эритроцитов (сканирующая электронная микроскопия, ув. $\times 5000$). На рисунке (а) представлены эритроциты контрольного образца, на рисунках (б) и (в) — эритроциты крови, обработанной 2 мМ пероксинитритом

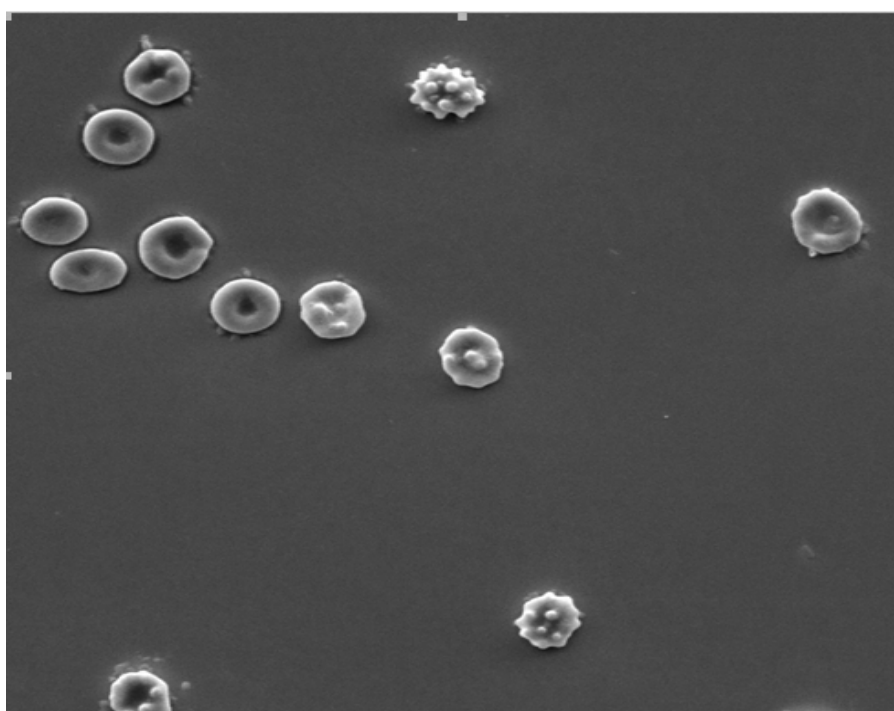
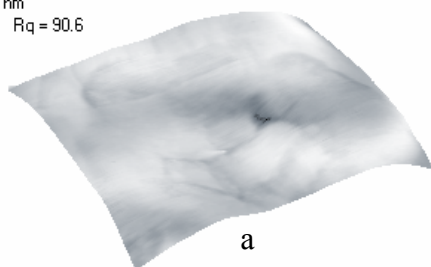


Рис. 2. Эритроциты крови, обработанной 2 мМ пероксинитритом (сканирующая электронная микроскопия, ув. $\times 1000$).

4.4 x 4.4 μm
 $\Delta = 483.9 \text{ nm}$
 $Ra = 75.4 \quad Rq = 90.6$



4.4 x 4.4 μm
 $\Delta = 726.8 \text{ nm}$
 $Ra = 128.2 \quad Rq = 155.2$

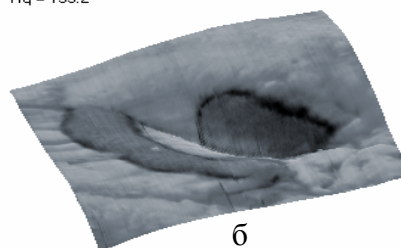


Рис. 3. Трехмерное изображение участков мембраны эритроцита с наложенным пространственным распределением угла вращения консоли (атомно-силовая микроскопия). Темные области соответствуют областям с более жесткими участками мембраны. На рисунке (а) представлен участок мембраны эритроцита из контрольных образцов, а на рисунке (б) — участок мембраны эритроцита крови, обработанной 2,5 мМ пероксинитритом.

Недавно итальянскими учеными было обнаружено образование (до 40% от общего числа клеток) подобной формы эритроцита (акантоцита) при обработке суспензии эритроцитов 50 μM пероксинитритом и показано, что в подобных выростах скапливаются такие белки эритроцитарной мембраны, как белок полосы 3 и спектрин [10]. В наших опытах (при использовании цельной крови) количество акантоцитов было меньше 40% от общего числа эритроцитов и возрастало с увеличением концентрации пероксинитрита. Так, по данным световой микроскопии, в контрольных образцах и в крови, обработанной 300 μM и 2 mM пероксинитритом, процентное соотношение акантоцитов и общего числа эритроцитов в крови было $1,0 \pm 0,8\%$, $7,4 \pm 4,0\%$ ($p=0,009$), $22,0 \pm 12,0\%$ ($p=0,01$). При высоких концентрациях пероксинитрита наблюдается также рост числа сфероцитов.

Реорганизация мембраны эритроцитов при обработке цельной крови пероксинитритом

По данным атомно-силовой микроскопии после обработки крови пероксинитритом наблюдается реорганизация структуры мембраны эритроцита — появляются микрообласти с повышенной жесткостью (рис. 3). Модуль Юнга мембран эритроцитов, фиксированных 1% глутаровым альдегидом, для контрольных образцов равнялся $18,7 \pm 7,5$ МПа ($n=8$), а для аномальных областей, обработанных пероксинитритом эритроцитов, — $29,2 \pm 2,6$ МПа ($p < 0,001$, $n=6$).

Фазовое разделение липидов и изменение формы эритроцитов

Форма эритроцита определяется двумя компонентами его мембраны — липидным бислоем с включенными в него белками и цитоскелетом. Пероксинитрит, как следует из литературных данных, реагирует с молекулами обеих компонент мембраны [8, 9, 10, 12, 13]. Пероксинитрит в концентрации 300 μM вызывает 50% агрегацию молекул спектрин в буферном растворе [7]. В суспензии эритроцитов в буферном растворе при действии 50 μM пероксинитрита наблюдается также скопление спектрин в местах выпячиваний мембраны [10]. По нашим данным, пероксинитрит в высоких концентрациях в цельной крови вызывает сфероцитоз. Сфероцитоз, как известно, наблюдается при денатурации спектрин (напри-

мер, вызванной увеличением температуры среды до 49–50°C). Таким образом, спектрин, как компонент цитоскелета, играет важную роль в пероксинитрит-индуцированных изменениях формы эритроцита. Агрегация спектрин и скопление его в местах выпячиваний мембраны были изучены в модельных системах. В цельной крови часть пероксинитрита расходуется в реакциях с молекулярными компонентами плазмы, а также с другими клетками крови. В наших экспериментах концентрация пероксинитрита, реагирующего с эритроцитами (следовательно, и со спектрин эритроцитов), меньше, чем рассчитанная для цельной крови. Поэтому вклад спектринового компонента в процессы изменения формы эритроцита при действии пероксинитрита уменьшается. Мы полагаем, что пероксинитрит - индуцированная трансформация формы эритроцита может быть также обусловлена изменениями в липидном бислое мембраны эритроцита. Из анализа данных, полученных методами атомно-силовой микроскопии, следует, что пероксинитрит вызывает фазовое разделение липидов в результате их перекисного окисления уже при концентрации 300 μM в цельной крови. Образуются домены разной толщины мембраны с различным липидным составом и механическими свойствами. Благодаря образованию доменов, в состав которых входят липиды либо с насыщенными, либо ненасыщенными жирными кислотами, происходит перераспределение белков мембраны. Некоторые белки исключаются из определенных липидных доменов, другие, наоборот, включаются в их состав. Липиды с хвостами из ненасыщенных и насыщенных жирных кислот различаются по пространственной конфигурации [11, 14]. Поэтому образование доменов с различным липидным составом приводит к изменению топографии участков поверхности эритроцита. Именно искривление мономолекулярного слоя билипидной мембраны считается причиной образования акантоцитов при различных заболеваниях, обусловленных изменениями в липидном составе, связанных, в основном, с повышением содержания холестерина [3, 4, 5]. В рассматриваемом случае пероксинитрит вызывает образование микрообластей с различным липидным составом, что приводит к вспучиванию мембраны в различных местах эритроцита.

Заключение

На основе анализа данных световой, сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии предлагаются механизмы, ответственные за индуцированный активными формами азота пойкилоцитоз в цельной крови человека. Первичными механизмами изменения формы эритроцита при действии активных форм азота является фазовое разделение липидов в результате перекисного окисления липидов и агрегация спектрина, следствием которых является акантоцитоз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стародубцева М.Н., Черенкевич С.Н. Механизмы реакций гемоглобина с пероксинитритом в водно-солевом растворе // Весці НАН Беларусі (News of Biomedical Sciences). — 2003. — № 2. — С. 86–90.
2. Стародубцева М.Н. Двойственная роль пероксинитрита в организме // Проблемы здоровья и экологии. — 2004. — № 1. — С. 35–41.
3. Шиффман Ф.Дж. Патофизиология крови // СПб., 2001. — С. 78–81.
4. Danek A., Walker R.H. Neuroacanthocytosis // Curr. Opin. Neurol. — 2005. — Vol. 18, № 4. — P. 386–392.
5. De Franceschi L., Olivieri O., Corrocher R. Erythrocyte aging in neurodegenerative disorders // Cell. Mol. Biol. — 2004. — Vol. 50, № 2. — P. 179–185.
6. Denicola A., Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity // Toxicolog. — 2005. — Vol. 208, № 2. — P. 273–288.
7. Mascio P. Di., Dewez B., Garcia C.R.S. Ghost protein damage by peroxynitrite and its protection by melatonin // Braz. J. Med. Biol. Research. — 2000. — Vol. 33. — P. 11–17.
8. Ebadi M., Sharma S.K., Ghafourifar P., Brown-Borg H., ReFaey H.E. Peroxynitrite in pathogenesis of Parkinson's disease and the neuroprotective role of metallothioneins // Method Enzymol. — 2005. — Vol. 396. — P. 276–297.
9. Frein D., Schildknecht S., Bachschmid M., Ullrich V. Redox regulation: a new challenge for pharmacology // Biochemical Pharmacology. — 2005. — Vol. 70. — P. 811–823.
10. Matarrese P., Straface E., Pietraforte D., Gambardella L., Vona R., Maccaglia A., Minetti M., and Malorni W. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases // FASEB J. — 2005. — Vol. 19, № 3. — P. 416–418.
11. Membrane dynamics and domains. In: Subcellular biochemistry. Ed. P.J. Quinn. Kluwer Academic. Plenum Publishers. — New York, 2004. — 500 p.
12. Pryor W.A., Squadrito G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitrite with superoxide // American Journal of Physiology. — 1995. — Vol. 268, № 5. — P. 699–722.
13. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // Arch Biochem Biophys. — 1991. — Vol. 288, № 2. — P. 481–487.
14. Red cell membrane transport in health and disease. Eds.: Ingolf Bernhart // J Clive Ellory, Stringer. — London. 2003. — 748 p.
15. Robinson K.M., Beckman J.S. Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide // Method Enzymol. — 2005. — Vol. 396. — P. 207–214.

Поступила 02.03.2006

УДК: 611.438-013:591.443

**РАЗВИТИЕ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ БЕЛОЙ КРЫСЫ
В ПРЕНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

П.Г. Пивченко, А.А. Пасюк

Белорусский государственный медицинский университет

На сериях срезов эмбрионов и плодов белой крысы определены источники развития вилочковой железы. Установлены основные этапы гистогенеза, определены морфометрические параметры тимуса в различные сроки эмбриогенеза. Проанализирована динамика изменения морфометрических характеристик и выявлены критические периоды развития тимуса.

Ключевые слова: белая крыса, тимус, эмбриогенез, вилочковая железа, гистогенез.

**DEVELOPMENT OF THE THYMUS OF A WHITE RAT
IN PRENATAL ONTOGENESIS**

P.G. Pivtchenko. A.A. Pasiuk

Belarusian State Medical University

On series of cuts of embryos and fetals of a white rat there are determined sources of development of the thymus. The basic stages histogenesis are allocated, determined morphometrical