

УДК 577.3

© А. А. Зинченко, В. М. Шаталов
**ВЛИЯНИЕ ДЕГАЗАЦИИ ПРИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИИ
НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ**

*Донецкий национальный университет; 83050, г. Донецк, ул. Щорса, 46
e-mail: alinazina@gmail.com*

Зинченко А. А., Шаталов В. М. Влияние дегазации при центрифугировании на содержание глюкозы в крови. – Показано, что дегазация, вызванная центрифугированием крови при проведении анализа на содержание глюкозы, приводит к перераспределению глюкозы между плазмой и эритроцитами, что искажает результаты анализов. После 10 минут центрифугирования крови по стандартной методике содержание глюкозы в плазме снижается на 10%, увеличение продолжительности либо повторное центрифугирование может вывести этот показатель за границы нормы для здоровых людей или перевести его в норму для больных. Показано, что снижение содержания глюкозы в плазме после центрифугирования сопровождается немонотонным изменением количества гликозилированного гемоглобина в эритроцитах.

Ключевые слова: глюкоза, гликозилирование, кровь, плазма, центрифуга, дегазация.

Введение

В наших предыдущих работах [1, 2] показано, что центрифугирование образцов крови, которое является неотъемлемым звеном при определении содержания глюкозы, существенным образом изменяет такие показатели крови, как скорость оседания эритроцитов, влияет на протромбиназную активность, увеличивает активность ионов кальция, запускающих систему свертывания крови. Мы полагаем, что наблюдаемые эффекты обусловлены дегазацией крови при центрифугировании, то есть выходом из крови растворенных в ней газов воздуха.

Эффекты, связанные с растворенными в биожидкостях газами, широко исследовались в связи с ультразвуковым воздействием при медицинской диагностике [3]. В многочисленных работах показано, что при используемых в диагностике интенсивностях и частотах ультразвука кавитация пузырьков – наиболее опасное для клеток тканей и внутренних органов явление – не наблюдается [4, 5]. В то же время роль растворенных газов в биожидкостях в настоящее время изучена достаточно слабо. Имеющиеся публикации связаны в основном со звуковым воздействием. Например, в опытах на морских млекопитающих [6] было показано, что короткие низкочастотные (<1 kHz) колебания приводят к обширному выделению пузырьков в перенасыщенных воздухом крови и тканях. Авторы считают, что звук нарушает условия равновесия для существующих в тканях микроскопических пузырьков газа и локальное перенасыщение воздухом биожидкости ведет к росту зародышей до макроскопических размеров через квазистатическую диффузию. Данных по изменению свойств крови в зависимости от продолжительности центрифугирования при лабораторных исследованиях нам найти не удалось. В тоже время сопутствующая дегазация образцов крови при центрифугировании может приводить к искажению результатов анализов [2] и, следовательно, к некачественной диагностике.

Целью данной работы было выявление изменений концентрации глюкозы в плазме крови здоровых и больных сахарным диабетом доноров при сверхнормативном или повторном центрифугировании образцов, а также в самих эритроцитах, инкубированных в плазме после центрифугирования.

В результате сложной цепочки реакций углеводного обмена в организме человека поддерживается относительно постоянный уровень глюкозы в циркулирующей крови 3,3-5,5 ммоль/л, что обеспечивает нормальное функционирование органов и тканей. Когда уровень глюкозы превышает верхний порог, диагностируется сахарный диабет, лечение которого является одной из актуальных проблем современной биологии и медицины в связи с высокой степенью инвалидизации больных, сложностью ранней диагностики и неизученностью механизмов развития осложнений. На сегодняшний день доказано [7], что красные кровяные клетки вовлечены в патогенетический процесс и их структура существенно изменяется при заболеваниях различного генеза, в том числе и при сахарном диабете. Метаболические

процессы, индуцированные гипергликемией, сопровождаются активацией процессов перекисного окисления липидов мембран эритроцитов, что вызывает их дестабилизацию и изменение форм клеток красного ряда, а развитие синдрома эндогенной интоксикации приводит к адсорбции на эритроцитарных мембранах токсических продуктов [8]. В настоящей работе мы исследуем также влияние дегазации на скорость гликозилирования гемоглобина.

Материалы и методы исследования

Определение содержания газов, растворенных в плазме крови, проводилось на модульном анализаторе OMNI C фирмы Roche (Швейцария) в отдельных пробах без доступа воздуха при атмосферном давлении 743 mmHg. Для этого плазма здоровых доноров предварительно отделялась от эритроцитарной массы путем 15-минутного центрифугирования при 3000 об./мин и температуре 4°C. Затем при комнатной температуре часть плазмы выдерживалась в центрифуге при 3000 об./мин, а другая часть оставалась в качестве контроля. Опыт выполнялся в двух повторностях. Как видно из рис. 1, с увеличением продолжительности центрифугирования содержание растворенного кислорода в плазме существенно уменьшается относительно значений в контрольных образцах, не подвергавшихся центрифугированию. При этом содержание углекислого газа уменьшается с большей скоростью, что объясняется большей растворимостью CO₂. Таким образом, продолжительность центрифугирования t_d однозначно определяет степень дегазации плазмы крови в соответствии с кривыми на рис. 1. Как видно из градуировочных кривых на рис. 1, содержание растворенного воздуха в плазме коррелирует со временем сверхнорматированного центрифугирования, изменяясь от 13,5 до 0,1% для растворенного кислорода и от 6,8 до 0,01% для углекислого газа при температуре 25°C.

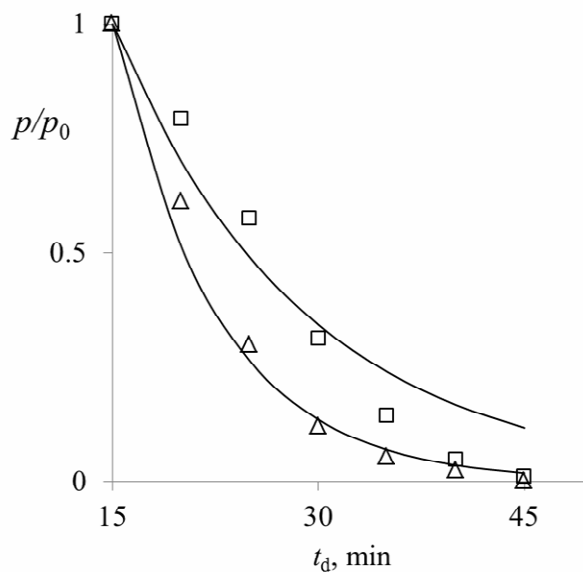


Рис. 1. Парциальное давление растворенного кислорода (квадраты) и углекислого газа (треугольники) в образцах плазмы крови в зависимости от продолжительности центрифугирования t_d при 3000 об./мин относительно давления в контрольных образцах p_0 .

Далее измерялось содержание глюкозы в крови 24 больных сахарным диабетом, из них 12 мужчин и 16 женщин в возрасте от 15 до 36 лет, длительность болезни от 4 до 16 лет. Сравнение исследуемых показателей проводили с группой из 10 практически здоровых людей в возрасте от 18 до 30 лет. Забор крови осуществлялся из локтевой вены в утреннее время, натощак. Определение содержания глюкозы проводили глюкозо-оксидазным методом с использованием наборов реактивов фирмы «Плива-Лахема», Чехия. Для получения плазмы по стандартной методике 0,1 мл цельной крови перемешивали с 0,9 мл раствора

антикоагулянта и центрифугировали 10 минут при 2000 об./мин для осаждения эритроцитов. Для анализа использовали надосадочную жидкость. Экспериментальные пробы с кровью центрифугировали по 15, 20, 25, 30, 35, 40 минут, после чего отбирали надосадочную жидкость и проводили определение концентрации глюкозы в плазме.

Содержание гликозилированного гемоглобина HbA1c определялось в соответствии с диагностическими критериями [9, 10]. Измерения проводились с помощью наборов «Гемоглобин» и «Гликозилированный гемоглобин» («Плива-Лахема», Чехия). В качестве антикоагулянта использовали раствор гепарина (гепарин/цельная кровь = 1/100). Эритроциты трижды отмывали (3000 об./мин, 10 мин) в Na⁺, K⁺ фосфатном буфере 0,167 M, рН=7,3, затем инкубировали в плазме с различным содержанием воздуха после выдержки в центрифуге и снова отмывали, после чего проводили измерение содержания HbA1c.

К эритроцитам добавляли 3 мл физиологического раствора, смесь осторожно перемешивали стеклянной палочкой и центрифугировали. После отсоса надосадочной жидкости к осадку эритроцитов добавляли 3 мл дистиллированной воды, смесь интенсивно встряхивали и оставляли стоять 10 мин, потом снова центрифугировали. Для проведения анализов использовали надосадочную жидкость.

Для определения общего гемоглобина рабочий раствор, приготовленный из набора «Гемоглобин», смешивали в соотношении 50:1 с гемолизатом и отстаивали 10 мин. Оптическую плотность измеряли при 546 нм против трансформационного раствора.

Для определения количества образовавшегося гликогемоглобина 1,50 мл гемолизата смешивали с 0,25 мл 85%-ной фосфорной кислоты. Пробирки закрывали резиновыми пробками с вколотой инъекционной иглой и нагревали 30 мин на глицериновой бане при (100 ± 1)°С. После 10 мин нагревания инъекционные иглы из пробирок вынимали. По окончании дегидратации пробирку охлаждали в проточной воде 10 мин. После охлаждения в каждую пробу добавляли 0,50 мл трихлоруксусной кислоты с концентрацией 2,45 ммоль/л. Содержимое пробирок встряхивали и центрифугировали в течение 20 мин. Затем в сухие пробирки отмеряли пипеткой 1 мл надосадочной жидкости и смешивали с раствором тиобарбитуровой кислоты. Перемешивали встряхиванием и инкубировали точно 40 мин на водяной бане при 37°С. Оптическую плотность проб, подвергавшихся центрифугированию, контрольных растворов 1 и 2 и стандарта измеряли против воды в диапазоне длин волн 430-450 нм. Содержание глюкозы определялось путем пересчета изменений оптической плотности в образцах.

Результаты и обсуждения

На рис. 2 представлены результаты воздействия экспериментальной дегазации *in vitro* на образцы плазмы крови здоровых и больных доноров. После 10 минут центрифугирования (по стандартной методике) содержание глюкозы в плазме снижается на 10%. Увеличение продолжительности либо повторное центрифугирование может вывести этот показатель за границы нормы для здоровых людей или перевести его в норму для больных, а значит, диагноз, основанный на таких данных, будет ошибочным. Таким образом, измерение содержания глюкозы в крови недостаточно эффективно для диагностики сахарного диабета и мониторинга результатов терапии.

Можно предположить, что глюкоза вступает в неферментативное взаимодействие с белками, что ускоряет их гликозилирование, а также в избыточном количестве проникает через мембрану эритроцитов, образуя гликозилированный гемоглобин. Естественно, что при присоединении глюкозы функции белка могут нарушаться из-за изменения заряда белковой молекулы, нарушения ее конформации или блокирования ее активного центра. При сахарном диабете гликозилирование белков приводит к многочисленным осложнениям. От того, какие именно белки и в какой степени гликозилированы, и зависит, какие именно осложнения возникнут и насколько тяжелыми они будут. Нам представляется более перспективным при гипергликемии оценивать степень и скорость гликозилирования белков, таких как гемоглобин, белки мембран эритроцитов, альбумин, трансферин, аполипопротеины,

коллаген, белки эндотелия, белки хрусталика, некоторые ферменты (алкогольдегидрогеназа) и измерять концентрацию растворенных газов крови. Однако такой специфический подход непригоден для рутинной оценки индивидуального риска различных осложнений, связанных с сахарным диабетом, скорее, это дело будущего. В данный момент для оценки такого риска применяется измерение обобщенного показателя гипергликемии – уровня HbA1c неконтролируемым содержанием растворенного воздуха в образцах плазмы.

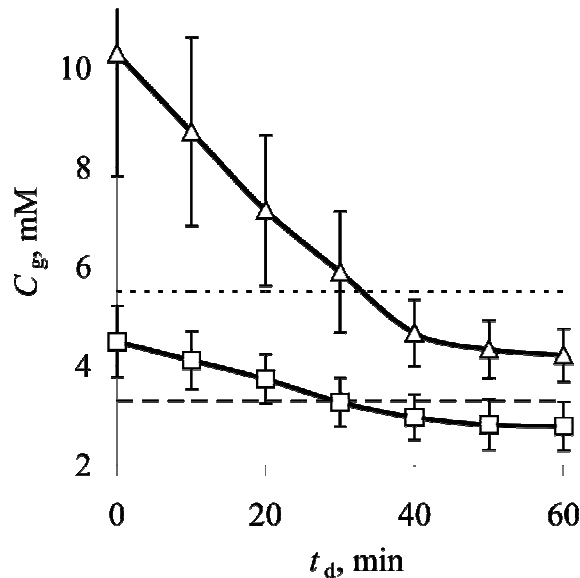


Рис. 2. Концентрация глюкозы C_g в плазме крови здоровых (квадраты) и больных (треугольники) доноров после центрифугирования в течение t_d минут; результаты получены как средние значения по 24 образцам для больных и по 10 образцам для здоровых доноров, погрешности – соответствующие стандартные отклонения; значения в точке $t_d=0$ мин получены линейной экстраполяцией двух соседних значений; пунктир и штриховая линия – верхняя и нижняя границы нормы.

Уровень гликозилированного гемоглобина крови – HbA1 или его количественно наибольшей фракции – HbA1c является наиболее точным объективным интегральным и прогностическим показателем среди биохимических параметров контроля степени компенсации и характера течения сахарного диабета [11]. Гликозилированный гемоглобин – это гемоглобин, в котором молекула глюкозы конденсируется с β -концевым валином В-цепи молекулы HbA (A – adultus – взрослый). Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) образуется в результате медленной, неферментативной реакции между гемоглобином А, содержащемся в самих эритроцитах, и глюкозой сыворотки крови. Скорость гликозилирования и, следовательно, его уровень определяется концентрацией глюкозы, сохраняющейся на протяжении жизни эритроцита.

При сахарном диабете содержание гликозилированного гемоглобина растет, в результате чего изменяется сродство гемоглобина к кислороду, что усиливает гипоксию в тканях организма и является неспецифическим компонентом в развитии диабетических ангиопатий [12]. Как видно из рис. 3, в условиях экспериментального удаления растворенных газов с увеличением времени обработки до 25 минут содержание HbA1c повышается в образцах плазмы как больных, так и здоровых доноров.

Повышенное содержание гликогемоглобина свидетельствует о том, что вероятность связывания глюкоза-белок после центрифугирования плазмы повышается примерно в 2,5-3 раза. При дальнейшем центрифугировании наблюдается снижение содержания HbA1c до начальных значений. Можно предположить, что относительное увеличение HbA1c свидетельствует об уровне компенсации «активной глюкозы» белками самих клеток.

Удаление растворенного воздуха из плазмы нарушает функционирование плазматической мембраны эритроцитов, поскольку в нормальных условиях повышение уровня HbA1c невозможно без повышения концентрации глюкозы в среде. Поскольку неферментативному гликозилированию подвергаются любые белки [11], можно говорить о воздействии дегазации на общий метаболизм.

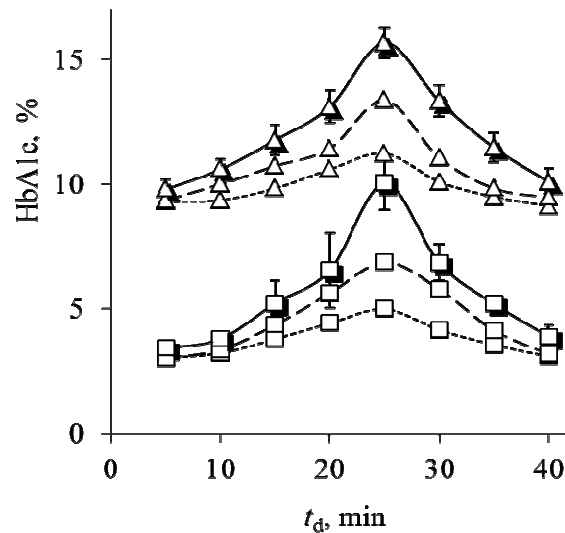


Рис. 3. Доля глікозильованого гемоглобіну HbA1c в еритроцитах крові здорових (квадрати) і хворих (трикутники) донорів після 10 (пунктирні), 20 (штрихові) і 30 (суцільні) хвилин інкубування в плазмі, попередньо обробленій в центрифугі в течение t_d хвилин (еритроцити були відделені від плазми в точці $t_d=5$ min); кожна точка – результат усереднення по трьох зразках, межі погрешностей вказані тільки для точок з тінню на суцільній лінії.

Выводы

Проведенні дослідження показали, що повітря, розчинений в плазмі крові, суттєво впливає на результати діагностики цукрового діабету. Найбільш різкі зміни показателя вмісту глюкози в крові після центрифугування плазми спостерігаються в зразках крові хворих цукровим діабетом. Очевидно, наднормативне або повторне центрифугування аналізованих зразків може привести або до передозування лікувальних препаратів, або до необґрунтованого зменшення їх кількості. Необхідна відповідна корекція лабораторного аналізу крові на глюкозу, особливо при ранній діагностиці і ліченні цукрового діабету.

При цукровому діабеті дезорганізація плазматическої мембрани червоних кров'яних кліток призводить до дефіциту енергопродукції, а також до посилення процесів перекисного окислення ліпідів [8], і в умовах дегазації цей процес може усугублятися. По-видимому, причиною тому являється універсальний шлях пошкодження кліток під впливом різних факторів [7].

Швидкість зниження концентрації глюкози при дегазації в плазмі хворих донорів була значно вище, ніж у здорових людей. В контрольних зразках, де плазма не підвергалась центрифугуванню, зміна рівня глюкози і вмісту HbA1c виявити не вдалося. Таким чином, дегазація плазми збільшує швидкість глікозилювання і, як ми вважаємо, може привести до хімічної модифікації білків, оскільки робить їх більш підверженими окисленню навіть при практично нормальному рівні глюкози в крові.

Список литературы

1. Зинченко А. А. Влияние дегазации при центрифугировании на некоторые показатели крови / А. А. Зинченко, И. В. Нога, В. М. Шаталов // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2009. – № 9. – С. 250-255.
2. Зинченко А. А. Влияние растворенного в крови воздуха на динамику свертывания *in vitro* / А. А. Зинченко, В. М. Шаталов // Физика Живого. – 2010. – Т. 18, № 1. – С. 37–43.
3. Apfel R. E. Acoustic cavitation: a possible consequence of biomedical uses of ultrasound / R. E. Apfel // Br. J. Cancer. – 1982. – Vol. 45, Suppl. V. – P. 140–146.
4. Crum L. A. Acoustic Cavitation Generated by Microsecond Pulses of Ultrasound / L. A. Crum, J. B. Fowlkes. – London: Nature, 1986. – Vol. 319. – P. 52–54.
5. Crum L. A. Is acoustic cavitation produced by diagnostic ultrasound devices / L. A. Crum // IEEE Sonics and Ultrasonic Symposium. – 1987. – Vol. 1. – 997 p.
6. Crum A. L. Monitoring bubble growth in supersaturated blood and tissue *ex vivo* and the relevance to marine mammal bioeffects / A. L. Crum, M. R. Bailey, J. Guan, P. R. Hilmo, S. G. Kargl, T. J. Matula, O. A. Sapozhnikov // Acoustics Research Letters Online. – 2005. – Vol. 6, N 3. – P. 214–220 [DOI: 10.1121/1.1930987].
7. Рязанцева Н. В. Эритроцит при патологии: размышления у электронного микроскопа / Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, Е. А. Степовая // Арх. Патологии. – 2004. – № 3. – С. 53–61.
8. Люта М. А. Наружная архитектоника эритроцитов крыс в условиях экспериментального сахарного диабета и при введении L-аргинина и ингибиторов NO-синтазы / М. А. Люта, О. Р. Кулачковский, М. Л. Барская, Н. О. Сибирная // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 40. – С. 63–68.
9. Гриншпун М. Н. Сравнительный анализ методов определения гликозированного гемоглобина / М. Н. Гриншпун, В. А. Галенок, А. Г. Мазовецкий, В. Е. Диккер // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С. 51–54.
10. Данилова Л. А. Колориметрический метод определения гликозилированных гемоглобинов / Л. А. Данилова, Н. И. Лопатина // Лаб. дело. – 1986. – № 5. – С. 281–283.
11. Вельков В. В. Гликозилированный гемоглобин в диагностике сахарного диабета и в оценке риска его осложнений / В. В. Вельков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 44. – С. 65–75.
12. Бондарь Т. П. Морфофункциональные состояния эритроцитов периферической крови при поздних сосудистых осложнениях сахарного диабета 2 типа (обзор литературы) / Т. П. Бондарь, Г. И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 12. – С. 22-25.

Зинченко А. О., Шаталов В. М. Вплив дегазації при центрифугуванні на вміст глюкози в крові. – Показано, що дегазація, яка викликана центрифугуванням крові при проведенні аналізу на вміст глюкози, призводить до перерозподілу глюкози між плазмою та еритроцитами, що спотворює результати аналізів. Після 10 хвилин центрифугування крові за стандартною методикою вміст глюкози в плазмі знижується на 10%, збільшення тривалості або повторне центрифугування може вивести цей показник за межі норми для здорових людей або перевести його в норму для хворих. Показано, що зниження вмісту глюкози в плазмі після центрифугування супроводжується немонотонною зміною кількості глікозильованого гемоглобіну в еритроцитах.

Ключові слова: глюкоза, глікозильовання, кров, плазма, центрифуга, дегазація.

Zinchenko A. A., Shatalov V. M. Effect of degassing in a centrifuge at the level of glucose in the blood. – It is shown that degassing induced by centrifugation of blood in the analysis on the content of glucose, leads to a redistribution of glucose between plasma and red blood cells, which distorts the test results. After 10 minutes centrifugation of blood in the standard test the content of glucose in the plasma is reduced by 10%, so extending or re-centrifugation can you keep the figure for the normal ranges for healthy people, or put it to the norm for patients. Show, but that the decrease in glucose content in plasma after centrifugation followed by a nonmonotonic change in the amount of glycosylated hemoglobin in red blood cells.

Key words: glucose, glycosylation blood, plasma, centrifuge degassing.