

УДК 616.61-002: 616.155.1: 612.394.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НОРСУЛЬФАЗОЛА НАТРИЯ НА ГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ И КИСЛОТНУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

© 2005 г. Т.В. Тонких, И.А. Лавриненко, С.Г. Резван, Г.А. Вашанов

Воронежский государственный университет

На основании анализа данных по кислотной и осмотической резистентности эритроцитов крови доноров в присутствии широкого диапазона концентраций норсульфазола натрия ($5 \cdot 10^{-6} \div 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) показано, что указанное соединение как комплексируется с белковыми структурами клеточных мембран, так и проникает внутрь различных по стойкости дискоцитов, индуцируя их сфероцитоз с последующим гемолизом.

ВВЕДЕНИЕ

В современной клинической практике сульфаниламиды нашли широкое применение при лечении ряда заболеваний. Одним из наиболее активных сульфаниламидных препаратов является норсульфазол натрия [1-2]. Он активно используется при пневмонии, церебральном менингите, гонорее, стафилококковом и стрептококковом сепсисе и других инфекционных заболеваниях, его назначают как антисептическое и противовоспалительное средство при тонзиллитах, фарингитах, ларингитах, афтозных и язвенных стоматитах. Норсульфазол обладает высокой антимикробной активностью в отношении стрептококков, менингококков, кишечной палочки, сальмонелл, пастерелл и других микроорганизмов.

С другой стороны, использование норсульфазола натрия ограничено рядом побочных эффектов, которые могут приводить к тяжелым нарушениям в функционировании различных систем организма. Многие из негативных последствий связаны с взаимодействием препарата с белковыми структурами. Так, норсульфазол натрия связывается с белками плазмы на 60—70 %, в результате чего затрудняется проникновение препарата в органы и ткани и замедляется его выведение [3], интенсифицируются процессы метгемоглобинообразования [4]. Кроме того, повышается уровень приобретенной резистентности штаммов микроорганизмов, против которых ранее эффективным было использование данного сульфаниламида. В связи с вышеизложенным актуальным является вопрос изучения молекулярно-клеточных основ процесса взаимодействия норсульфазола натрия с биологическими структурами, особенно с компонентами плазматических мембран соматических клеток организма. Это позволит не только дополнить существующие теоретические знания, но

и разработать практические рекомендации по более эффективному его применению в медицине. Для решения поставленной проблемы наиболее предпочтительным в качестве объекта исследования является использование эритроцитарных клеток, поскольку их структура к настоящему времени достаточно полно изучена и отражает состояние мембранолитических процессов в организме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модифицирующего агента мы использовали коммерческий препарат норсульфазола натрия (NF-Na) в широком диапазоне концентраций ($5 \cdot 10^{-6} \div 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Суспензии эритроцитов получали по методу Л.А. Блюменфельда [5]. Содержание клеток в образцах контролировали спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

Структурное состояние эритроцитов, модифицированных NF-Na, оценивали по изменению их осмотической резистентности в гипоосмотическом растворе, содержащем 0,55 % NaCl (критическая точка резистентности эритроцитов донорской крови).

Кинетику индуцированного NF-Na гемолиза эритроцитов изучали с помощью разработанной на кафедре биофизики и биотехнологии ВГУ установки для автоматической регистрации интегральных эритрограмм [6], которая включает в себя фотокориметр ФЭК-56М, объединенный с двухкоординатным регистратором ЛКД4-003 и цифровым вольтметром В7-20. Для термостатирования кювет с исследуемыми образцами ($t^{\circ} = 24^{\circ}\text{C}$, $l = 10$ мм) использовали ультратермостат УТУ-8.

Степень влияния модификатора на физико-химические свойства белково-липидных комплексов плазматических мембран оценивали на модельной системе NF-Na – эритроциты – HCl по изменению

химической резистентности эритроцитарных клеток к воздействию соляной кислоты (0,08 моль/л) в изотоническом растворе NaCl (0,85 %). В качестве основных параметров, характеризующих осмотическую и кислотную резистентность эритроцитов, использовались следующие показатели: время латентного периода гемолиза ($t_{\text{лат}}$), константа максимальной скорости (K_{max}) и величина G (%), характеризующая количество гемолизированных клеток в момент времени t или через заданный промежуток времени $t_{\text{инк}}$. (G_{max} , %). Для оценки уровня сферуляции эритроцитов использовали отрицательное приращение значения G , соответствующее $G_{\text{сф}}$ (%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов (рис. 1, рис. 2) свидетельствуют о снижении осмотической резистентности эритроцитарных клеток в гипо- и изотонической среде при последовательном накоплении в них NF-Na ($5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Анализ кинетических кривых (рис. 1) показывает, что при повышении концентрации NF-Na в гипоосмотической среде наблюдается монотонное отрицательное приращение параметра G (рис. 1, кривая 3), соответствующее переходу 12 % эритроцитов в фазу сферуляции за время $t = 120$ с. При более длительной инкубации ($t = 30$ мин) количество сфероцитов возрастает до 46 %, 92 % и 54 % (рис. 2) при минимальной, средней и максимальной концентрациях модификатора соответственно. Установленная экспериментально зависимость $G_{\text{сф}} = f(C_{\text{мод}})$ позволяет констатировать, что NF-Na, во-первых, характеризуется как слабый гемолитический агент, так как индуци-

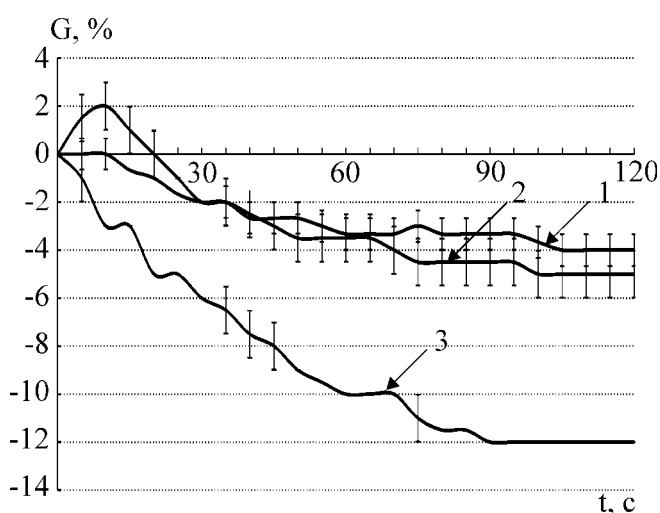


Рис. 1. Кинетика гипоосмотического гемолиза эритроцитов, модифицированных норсульфазолом натрия в различных концентрациях. Здесь и далее: 1–3 — концентрация модификатора, соответственно, $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

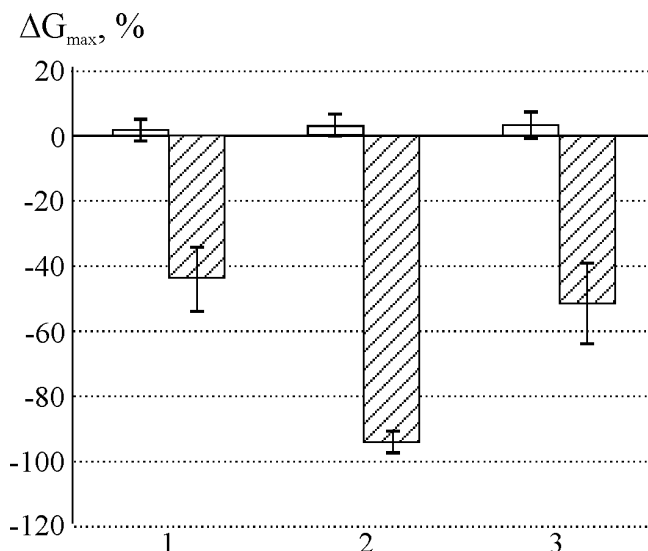


Рис. 2. Изменение величин G_{max} для гипо- и изотонического гемолиза эритроцитов, модифицированных норсульфазолом натрия в различных концентрациях.

□ — 0,85 % NaCl;
▨ — 0,55 % NaCl.

рует, в основном, лишь сфероцитоз дискоцитов. Во-вторых, мембраны как старых, так и молодых эритроцитов легко проницаемы для NF-Na, накопление которого в цитоплазме сопряжено с пропорциональным увеличением объема внутриклеточной воды. Из этого следует, что при достижении в организме человека даже минимальной из использованных нами концентраций NF-Na через 30 мин может развиваться не только процесс сферуляции эритроцитов, но также и отечность внутренних органов.

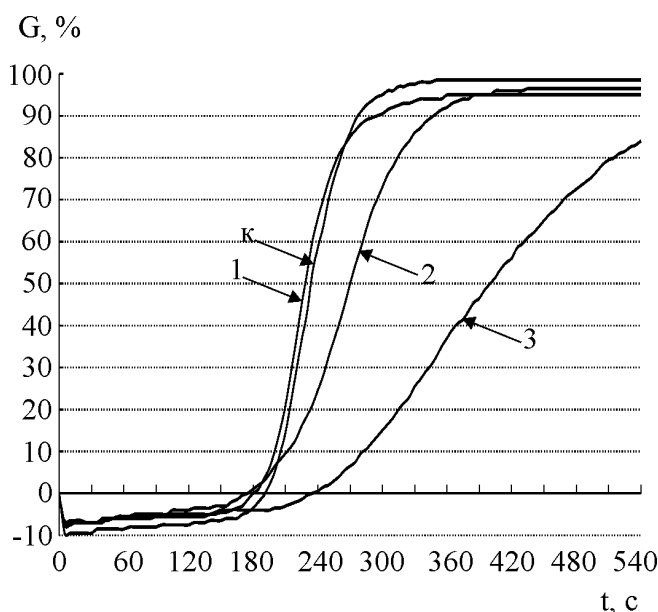


Рис. 3. Кинетика кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных норсульфазолом натрия в различных концентрациях. Здесь и далее: К — контроль.

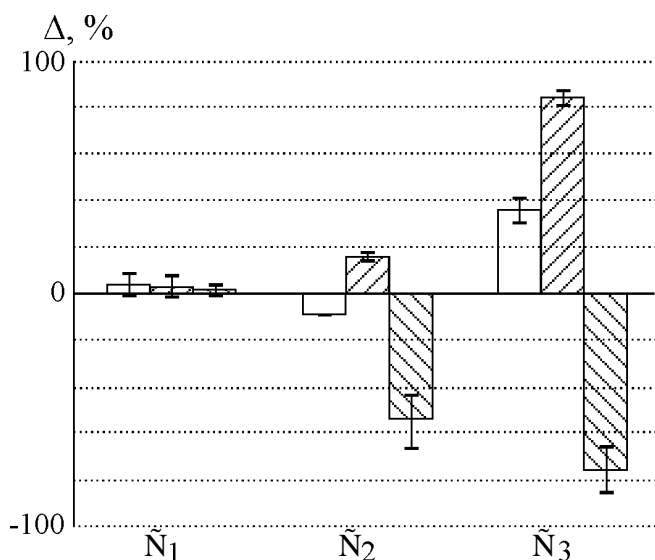


Рис.4. Изменение основных показателей кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных норсульфазолом натрия в различных концентрациях.

□ – $t_{\text{лат}}$;
 ▨ – t_{50} ;
 ▩ – K_{max} .

Исследование изменения химической резистентности ($t_{\text{лат}}$) и мембранотропных свойств (t_{50} , K_{max}) эритроцитов донорской крови при их взаимодействии с NF-Na в изоосмотическом растворе NaCl позволило выявить увеличение устойчивости клеток к действию кислоты (рис. 3). При этом установленная зависимость повышения барьера проницаемости мембраны эритроцита для ионов водорода от концентрации NF-Na на 54 % и 76 % для $5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л соответственно без инкубации свидетельствует о протекании процессов комплексообразования модификатора с ионогенными группами белков, преимущественно с остатками глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. Количество и доступность этих групп и определяет уровень проницаемости мембран для протонов.

Увеличение времени латентной фазы ($t_{\text{лат}}$) на 36 % при максимальной концентрации NF-Na (рис. 4) позволило нам сделать заключение о химической модификации мембранных белков эритроцитарных клеток, различающихся по стойкости к действию кислоты. При этом регистрация кислотных эритрограмм после 30-минутной инкубации в изоосмотическом растворе NaCl при концентрации в среде модификатора в $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л выявила повышение доступности мембранных акцепторов к молекулам NF-Na (рис. 5). Увеличение времени инкубации до 60 мин не вызывает последующего существенного изменения количества доступных ионогенных групп: приращение составляет менее 5 %.

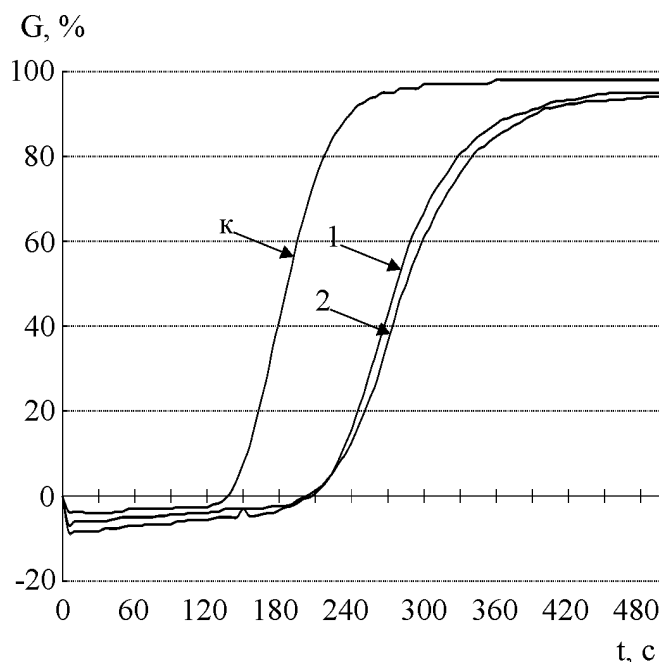


Рис.5. Кинетика кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных норсульфазолом натрия ($C=5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) при различных временах инкубации: 1 – 30 мин, 2 – 60 мин

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов нами установлено, что мембраны эритроцитов характеризуются не только высокой проницаемостью для молекул норсульфазола натрия, но и доступностью белковых компонентов к неспецифической химической модификации данным соединением. Следствием рассмотренных выше физико-химических процессов, индуцированных NF-Na, является не только аккумуляция сульфаниламида на поверхности мембран и внутри клеток, но и развитие отеков и, в конечном итоге, интоксикация организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Падейская Е.Н. Комбинированные антибактериальные препараты на основе производных сульфаниламида и диаминопиримидина // Новые лекарственные препараты: сб. трудов ВНИХФИ / Е.Н. Падейская. – М., 1991. – С.94-104.
2. Падейская Е.Н. Новые сульфаниламидные препараты длительного действия для лечения инфекционных заболеваний / Е.Н. Падейская, Л.М. Полунина. – М.: Медицина, 1974.
3. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова – М.: Боргес, 2002. – 384 с.
4. Куценко С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко. – СПб.: Фолиант, 2004. – 717 с.
5. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода / Л.А. Блюменфельд. — М.: Советская наука, 1957. — 140 с.

6. Резван С.Г. Анализ молекулярных механизмов взаимодействия синтетических гомологов ретинола₁ с компонентами эритроцитарной мембраны и свободным гемоглобином: Дис. ... канд. биол. наук. – Воронеж, 1996. – 240 с.