

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЕТОРОЛАКА ТРОМЕТАМИНОМ

Д. Б. Холодов, В. А. Николаевский, С. Г. Резван

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 06.03.2009 г.

Аннотация. В данной статье представлены результаты исследования влияния кеторолака трометамин на клетки организма с использованием модели лекарственный препарат — клетка. Авторами установлено, что кеторолака трометамин в различных концентрациях при контакте с клетками живого организма активно взаимодействует предположительно с белками мембраны, образуя комплексы лекарственный препарат — белок. Данный лекарственный препарат вызывает изменение структуры мембраны клетки. Также авторами показано значение времени контакта препарата с клетками.

Ключевые слова: кеторолака трометамин, эритроцит, клетка, мембрана, гемолиз.

Abstract. The article concerns the research's results, deals by the ketorolak trometamine's influence on the cells, using the model "drug — cell". Authors established that ketorolak trometamine in various concentrations during the contact by the live cells can probably interact with the membrane's proteins forming complexes "drug — protein". This drug can cause the membrane's structural changes. Also, it was determined the time value on the preparation's effects.

Keywords: ketorolak trometamine, erythrocyte, cell, membrane, hemolysis.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема эффективного обезболивания стоит очень остро. В связи с этим анальгетики являются одной из самых часто используемых групп препаратов. В данной фармакологической группе большое значение придается нестероидным противовоспалительным средствам (НПВС).

Однако даже кратковременный прием этих препаратов в небольших дозах может приводить к развитию побочных эффектов, которые встречаются примерно в 25 % [1].

В предыдущих исследованиях нами установлено, что при увеличении концентрации Диклофенака натрия в инкубационной среде увеличивается повреждающее действие его на эритроциты, данный препарат обладает непосредственным повреждающим действием на биологические мембраны, механизмом которого является денатурация белковых глобул, выявлен дозозависимый эффект повреждающего действия Диклофенака натрия.

В связи с вышеизложенным актуальным является вопрос изучения молекулярно-клеточных механизмов взаимодействия Кеторолака тромета-

мина с биологическими структурами, особенно с компонентами плазматических мембран соматических клеток организма.

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.

Целью исследования являлось изучить воздействие Кеторолака трометамин в концентрациях $4,98 \cdot 10^{-7}$; $9,96 \cdot 10^{-7}$; $19,92 \cdot 10^{-7}$ моль/л на структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве модифицирующего агента мы использовали коммерческий препарат Кеторолака трометамин (К-т) (Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.) в концентрациях $4,98 \cdot 10^{-7}$ моль/л, $9,96 \cdot 10^{-7}$ моль/л, $19,92 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Данные концентрации были получены в результате определения анальгетической активности на модели химического перитонита, вызванного уксусной кислотой — тест «Уксусные корчи» [2]. В опытах было использовано 50 беспородных белых мышей. С использованием метода «Наименьших квадратов» (пробит анализ) определены ED_{25} , ED_{50} , ED_{100} , что соответствует концен-

трациям $4,98 \cdot 10^{-7}$ моль/л, $9,96 \cdot 10^{-7}$ моль/л, $19,92 \cdot 10^{-7}$ моль/л (C_1, C_2, C_3 соответственно) [3].

Суспензии эритроцитов получали по методу Л. А. Блюменфельда [4]. В опытах использовали кровь, полученную из хвостовых вен белых беспородных крыс ($n = 28$), в количестве 1 мл., с соблюдением требований по гуманному обращению с животными. Содержание клеток в образцах контролировали спектрофотометрически.

Кинетику индуцированного К-т гемолиза эритроцитов изучали с помощью прибора КФК-3 (ОАО Загорский оптико-механический завод, Загорск).

Степень влияния модификатора на физико-химические свойства белково-липидных комплексов плазматических мембран оценивали на модельной системе «К-т — эритроциты — HCl» по изменению химической резистентности эритроцитарных клеток к воздействию соляной кислоты в изотоническом растворе NaCl [5,6]. В качестве основных показателей, характеризующих осмотическую резистентность эритроцитов, использовали: константу максимальной скорости гемолиза (K_{max}), величину $G_{сф}$ эритроцитов (%), характеризующая относительное количество клеток находящихся в стадии сферуляции и тлат — отражающий длительность латентной стадии гемолиза. Результаты исследования обработаны с помощью пакета статистических программ SPSS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ кинетических кривых кислотного гемолиза проводился по следующим показателям:

1. Константа максимальной скорости кислотного гемолиза (K_{max}), которая характеризует количество эритроцитов одновременно вступивших в стадию гемолиза. Чем больше K_{max} тем большее количество эритроцитов вступает в процесс гемолиза.

Рабочие суспензии эритроцитов инкубировали в течение 240 минут с К-т в концентрации C_1, C_2, C_3 .

По результатам исследования нами построен график зависимости K_{max} от времени инкубации (рис. 1).

При добавлении в суспензию эритроцитов К-т в концентрации C_1 (рис. 1) и отсутствии инкубации происходит снижение показателя K_{max} относительно контроля до 1,881 (то есть на 42,5 %). Это обусловлено химическим связыванием ЛП с белково-липидными комплексами мембраны клеток эритроцитов и нейтрализацией части ионов водорода за счет двух центров основности в структуре К-т, а как следствие из этого увеличение порога проницаемости для ионов водорода.

Повышение данного показателя до 5,145 (или на 173,5 %) при инкубации рабочей суспензии эритроцитов в течение 15 минут свидетельствует

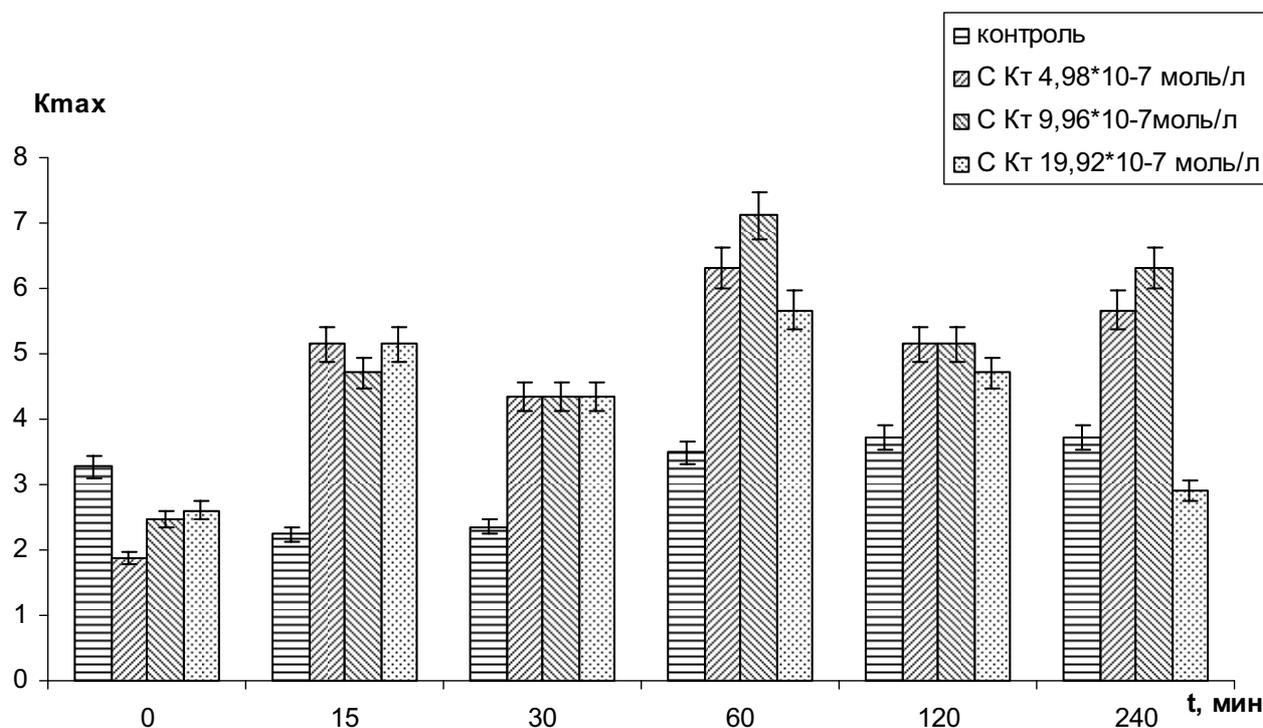


Рис. 1. Зависимость K_{max} кислотного гемолиза эритроцитов, индуцированного К-т от времени инкубации ($p < 0,05$)

об увеличении доли эритроцитов, вовлеченных в процесс гемолиза, что в свою очередь обусловлено увеличением доли эритроцитов со сходными структурными изменениями.

Увеличивая время инкубации рабочей суспензии эритроцитов до 30 минут регистрировали снижение значения K_{max} — 4,331 (или на 15,8 %). Это свидетельствует о повышении степени дифференцировки более стойких эритроцитов, то есть о модификации более «молодых» эритроцитов, что по нашему мнению связано с увеличением количества комплексов «К-т — белок». Это приводит к повышению порога проницаемости мембраны к ионам водорода.

При увеличении времени инкубации до 60 минут зарегистрировано повышение показателя K_{max} — 6,314 (на 45,8 %), что объясняется увеличением доли более стойких эритроцитов, вовлеченных в процесс собственно гемолиза.

При инкубации суспензии эритроцитов в течение 120 минут происходит очередное снижение K_{max} — 5,145 (на 18,5 %) за счет увеличения степени дифференцировки еще более стойких эритроцитов вследствие распространения на них модифицирующего действия К-т и снижение порога проницаемости для ионов водорода в результате образования комплексов «К-т — белок».

На завершающем этапе при инкубации в течение 240 минут регистрировали увеличение K_{max} — 5,671 (или на 10,2 %), что объясняется повышением количества еще более стойких эритроцитов, вовлеченных в процесс гемолиза, вследствие повышения структурной однородности эритроцитарных клеток.

При добавлении в рабочую взвесь эритроцитов К-т в концентрации C_2 (без инкубации) регистрировали повышение значения K_{max} относительно C_1 (K_{max} — 2,475 или 31,5789 %), что может быть связано с более выраженным модифицирующим действием К-т на мембраны эритроцитов. Но значение K_{max} менее контроля. По нашему мнению здесь аналогично концентрации C_1 имеется связывание с белково-липидными комплексами мембран, нейтрализация части ионов водорода, но вследствие встраивания большего количества молекул К-т образуется больше дефектов в мембране эритроцитов через которые и проникают ионы водорода внутрь клеток.

При инкубации суспензии эритроцитов в течение времени 15 минут регистрировали увеличение показателя K_{max} — 4,705 (или на 90,1 %), что свидетельствует об увеличении доли эритроцитов,

вовлеченных в процесс собственно гемолиза, вследствие увеличения эритроцитов со сходными структурными изменениями. В данном случае происходит накопление более стойкой субпопуляцией эритроцитов, чем при использовании К-т в концентрации C_1 , что отражается на рис. 1 сдвигом столбца вниз.

При увеличении времени инкубации рабочей взвеси эритроцитов до 30 минут происходит снижение показателя K_{max} — 4,331 (или на 7,9 %). Это объясняется увеличением степени дифференцировки более стойких эритроцитов по отношению к кислотному гемолитику, и снижением порога проницаемости для ионов водорода вследствие большего образования комплексов «К-т — белок».

Инкубируя суспензию эритроцитов в течение 60 минут регистрировали увеличение K_{max} — 7,115 (или на 64,3 %), что объясняется увеличением доли эритроцитов, вовлеченных в процесс гемолиза. В данном случае происходит накопление эритроцитов со сходными структурными изменениями мембран.

Увеличивая время инкубации суспензии эритроцитов до 120 минут, было зарегистрировано снижение показателя K_{max} — 5,145 (или на 27,7 %). Это объясняется увеличением дифференцировки более стойких субпопуляций эритроцитов по отношению к кислотному гемолитику, что связано с образованием большего количества комплексов «К-т — белок» и снижением порога проницаемости для ионов водорода.

При максимальном времени инкубации рабочей суспензии эритроцитов в течение 240 минут установлено увеличение значения K_{max} — 6,314 (или на 22,7 %), что объясняется увеличением количества эритроцитов, вовлеченных в процесс гемолиза, в результате накопления доли эритроцитов со сходными структурными изменениями мембран под действием К-т.

При использовании концентрации C_3 регистрировали увеличение K_{max} относительно концентраций C_1 C_2 (K_{max} — 2,605 или на 5,3 %), но не более контроля ($K_{max} = 3,271$), что можно объяснить еще большей модификацией мембраны. В данном и предыдущих случаях при отсутствии инкубации имеет место нейтрализация части ионов водорода и связывание с мембранными белками, что снижает порог проницаемости для ионов водорода.

Увеличивая время инкубации рабочей суспензии эритроцитов до 15 минут регистрировали увеличение K_{max} — 5,145 (или на 97,5 %), что свидетельствует о увеличении доли эритроцитов,

вступивших в стадию гемолиза. В данном случае происходит накопление более стойкой субпопуляцией эритроцитов, чем при отсутствии инкубации рабочей суспензии эритроцитов.

При инкубации суспензии эритроцитов в течение 30 минут происходит снижение K_{max} — 3,331 (или на 15,8 %), что объясняется увеличением степени дифференцировки более «молодых» эритроцитов. Можно предположить, что происходит образование большего количества комплексов Кт — белок и как следствие этого — снижение порога проницаемости для ионов водорода.

Увеличивая время инкубации рабочей взвеси эритроцитов до 60 минут регистрировали увеличение K_{max} — 5,671 (или на 30,9 %). В данном случае также происходит увеличение количества эритроцитов со сходными структурными изменениями, вовлеченных в процесс собственно гемолиза.

На завершающем этапе, при инкубации суспензии эритроцитов в течение 120 ÷ 240 минут происходит постепенное снижение показателя K_{max} — 4,705; 2,904 (или на 17,034032; 38,278427 соответственно), что свидетельствует о вовлечении в процесс еще более высокостойких субпопуляций эритроцитов, в результате увеличения степени дифференцировки. Можно предположить, что и здесь увеличивается количество комплексов «К-т

— белок» и соответственно снижается порог проницаемости для ионов водорода.

2. Анализ результатов обработки данных сферулита эритроцитов, ($G_{сф}$), вовлекаемых в стадию сферуляции (рис. 2.) показал что: при инкубации рабочей взвеси эритроцитов на протяжении 240 минут с К-т в концентрации C_1 (рис. 2) отчетливой стадии сферуляции зарегистрировано не было. При инкубации рабочей суспензии эритроцитов в течение времени от 0 до 30 мин. преобладает процесс деструкции мембраны эритроцитов ($G_{сф}$ 0; 0,62; 1,2), далее в интервал времени от 30 до 60 мин. процесс модификации преобладает над деструкцией мембраны ($G_{сф}$ 1,2; 0,3). А при инкубации взвеси эритроцитов в течение времени от 60 до 240 мин. процессу деструкции подвергается среднестойкие эритроциты ($G_{сф}$ 0,29; 1,00; 1,65).

При использовании К-т в концентрации C_2 регистрировали снижение $G_{сф}$ относительно контроля ($G_{сф} = -1,97$ или до 29,78 %). Это свидетельствует о вовлечении в процесс сферуляции большего количества эритроцитов, что связано с большим модифицирующем действием К-т на мембраны эритроцитов.

При инкубации рабочей суспензии эритроцитов в течение 15 минут зарегистрировано увеличение $G_{сф}$ ($G_{сф} = 0,19$ или до 72,21 %), что указывает на

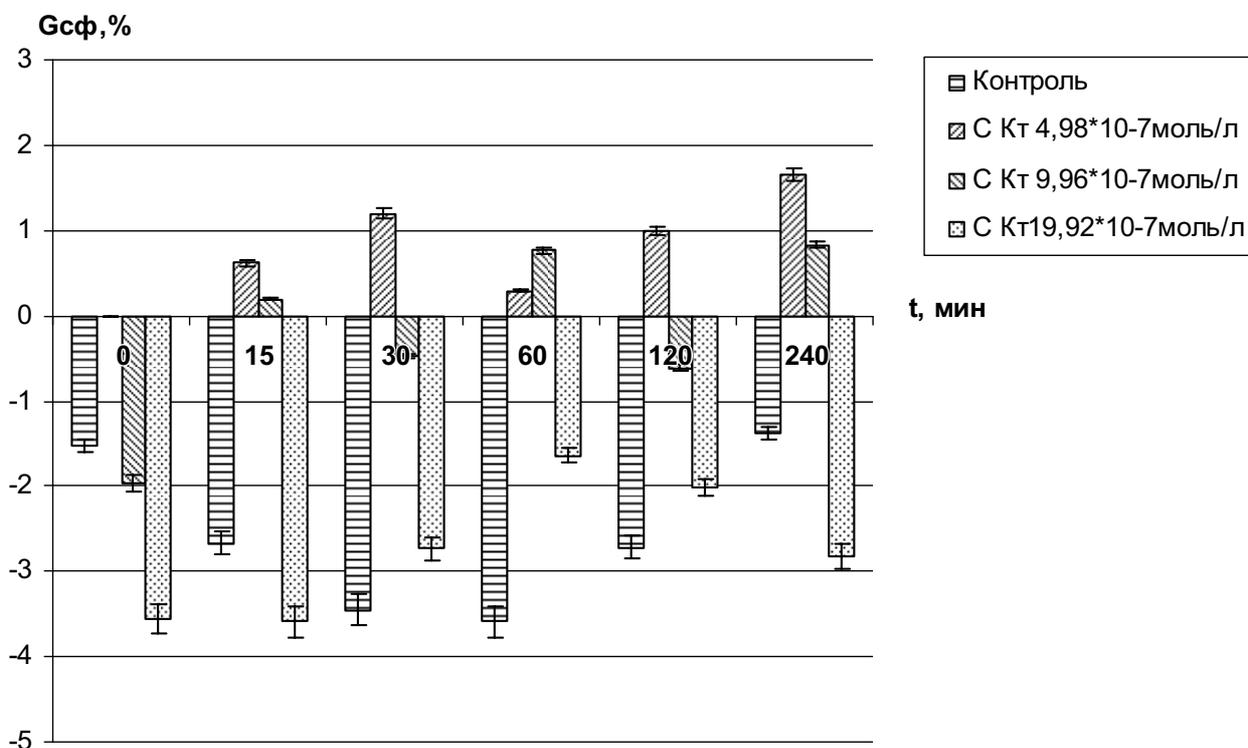


Рис. 2. Зависимость $G_{сф}$ кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных К-т в различных концентрациях от времени инкубации ($p < 0,05$)

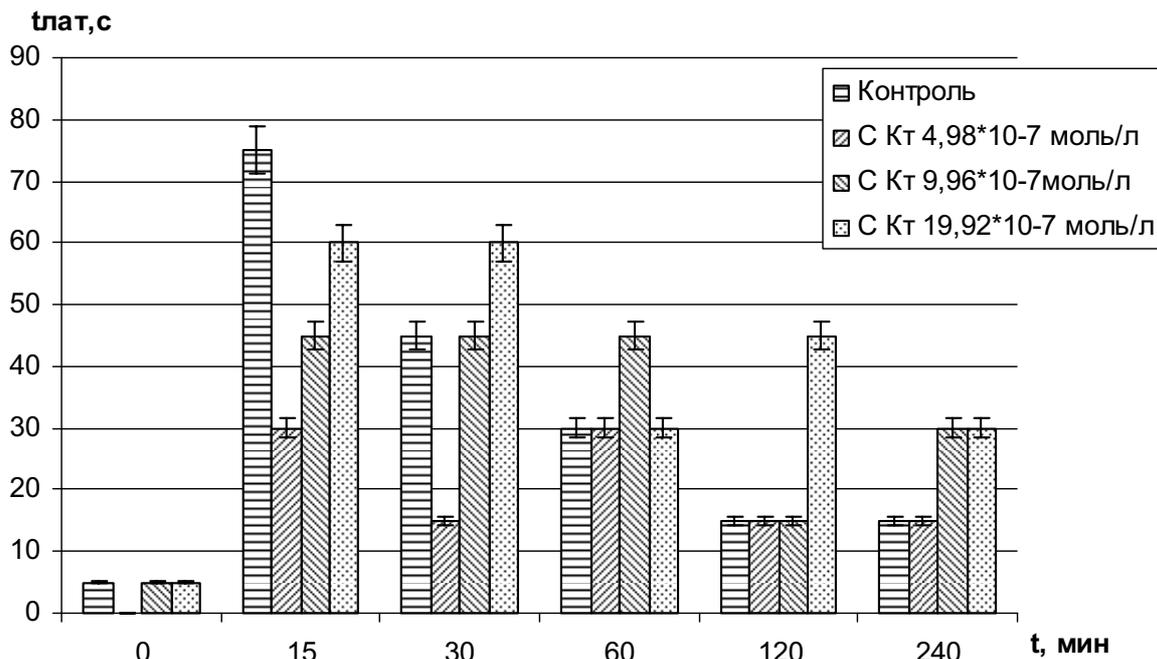


Рис. 3. Зависимость $t_{\text{лат}}$ кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных К-т в различных концентрациях от времени инкубации ($p < 0,05$)

более быстрый переход из стадии сферуляции к процессу собственно гемолиза.

При инкубации взвеси эритроцитов в течение 30 минут происходит снижение $G_{\text{сф}}$ ($G_{\text{сф}} = -0,48$ или до 13,97), что может свидетельствовать о вовлечении среднестойких и соответственно более устойчивых к кислотному гемолизу эритроцитов. Но при увеличении времени инкубации до 60 минут происходит более быстрый переход от стадии сфероцитоза к стадии собственно гемолиза, что нашло свое отражение увеличением значения показателя $G_{\text{сф}}$ ($G_{\text{сф}} = 0,77$ или до 21,44 %). При инкубации 120 минут регистрировали очередное снижение $G_{\text{сф}}$ ($G_{\text{сф}} = -0,61$ или до 22,46 %), что свидетельствует о вовлечении в процесс сферуляции и соответственно о распространении модифицирующего действия К-т на популяцию высокостойких эритроцитов, которые затем при инкубации в течении 240 минут более быстро переходят в стадию собственно гемолиза, что отражается увеличением значения $G_{\text{сф}}$ ($G_{\text{сф}} = 0,83$ или до 60,38 %).

При использовании К-т в концентрации C_3 и времени инкубации от 0 до 15 минут регистрировали снижение показателя $G_{\text{сф}}$ ($G_{\text{сф}} = -3,55; -3,59$) относительно контроля и концентраций C_1, C_2 , что свидетельствует о увеличении числа эритроцитов, вовлеченных в стадию сфероцитоза, в следствии большего модифицирующего действия К-т. Причем

происходит, по нашему мнению, вовлечение более стойких эритроцитов. Затем при 30÷60 минутной инкубации повышение $G_{\text{сф}}$ ($G_{\text{сф}} = -2,73; -1,64$; или на 24,11 %; 54,46 %) указывает на более быстром переходе эритроцитов из стадии сфероцитоза в стадию собственно гемолиза. При длительности инкубации в течение 120÷240 минут происходит постепенное снижение значения $G_{\text{сф}}$ ($G_{\text{сф}} = -2,02; -2,82$ или на 23,53 %; 72,55 %), что свидетельствует о вовлечении следующей более стойкой субпопуляции эритроцитарных клеток.

3. Анализ показателя $t_{\text{лат}}$, который отражает время пребывания эритроцитов в стадии сфероцитоза то есть до начала фазы собственно гемолиза (рис. 3) показал, что при добавлении к рабочей суспензии эритроцитов К-т в концентрации C_1 наблюдается два пика значения $t_{\text{лат}}$ при 15 и 60 (30 и 30 секунд) минутах, что связано с более длительной фазой сферуляции. Это в свою очередь связано с модифицирующим действием К-т на мембранные белки. А снижение значения $t_{\text{лат}}$ при 30 и 120÷240 ($t_{\text{лат}} = 15, 15, 15$ секунд) минутной инкубации показало укорочение фазы сферуляции, то есть установлен более быстрый переход от стадии сферуляции к стадии собственно гемолиза. Результаты исследования показали, что при использовании К-т в концентрации C_1 модифицируются и переходят в процесс собственно гемолиза субпопуляции низко и среднестойких эритроцитов (0÷30 мин. инкуб.

$t_{\text{лат}} = 0 \rightarrow 30 \rightarrow 15$ секунд и $30 \div 120$ мин. инкуб.
 $t_{\text{лат}} = 15 \rightarrow 30 \rightarrow 15$ секунд соответственно.

При использовании концентрации К-т C_2 и длительности инкубации от 0 до 15 минут зарегистрировано увеличение значения $t_{\text{лат}}$ ($t_{\text{лат}} 5; 45$ секунд) и выход кривой на плато от 15 до 60 минут ($t_{\text{лат}} 45; 45; 45$ секунд). Это свидетельствует об увеличении времени нахождения эритроцитов в стадии сферуляции, что также объясняется, по нашему мнению, модифицирующим действием К-т на белки мембран, то есть образованием комплексов «белок — К-т». При инкубации взвеси эритроцитов в течение времени от 60 до 120 минут зарегистрировано снижение длительности фазы $t_{\text{лат}}$ ($t_{\text{лат}} 45; 15$ секунд), что свидетельствует об укорочении фазы сферуляции во времени и более быстром переходе эритроцитов в стадию собственно гемолиза. Показано (рис. 3) что в данном случае при инкубации рабочей суспензии эритроцитов 60 мин. происходит модификация и переход к собственно гемолизу низко- и среднестойкой субпопуляций эритроцитов. Этот процесс протекает более быстро по сравнению с К-т в концентрации C_1 . При инкубации рабочей суспензии эритроцитов в течение времени $120 \div 240$ мин. ($t_{\text{лат}} 15; 30$ секунд) происходит модификация большей доли высокостойкой субпопуляции эритроцитов, по сравнению с действием К-т в концентрации C_1 .

При использовании К-т в концентрации C_3 и длительности инкубации в течении $0 \div 15$ минут регистрировали ещё большее увеличение длительности латентной фазы $t_{\text{лат}}$ ($t_{\text{лат}} 5; 60$ секунд), причём большее чем при использовании К-т в концентрациях C_1 и C_2 . После $15 \div 30$ минутной инкубации рабочей суспензии происходит вовлечение низко- и среднестойких эритроцитов в процесс сфероцитоза ($t_{\text{лат}} 60; 60$ секунд). При увеличении длительности инкубации суспензии эритроцитов до $30 \div 60$ мин. ($t_{\text{лат}} 60; 30$ секунд) зарегистрирован процесс собственно гемолиза эритроцитов. При инкубации суспензии эритроцитов в течение времени $60 \div 120 \div 240$ мин. ($t_{\text{лат}} 30; 45; 30$ секунд) зарегистрированы процессы модификации с последующей деструкцией субпопуляций высокостойких эритроцитов.

Тот факт, что при 15 минутной инкубации значение $t_{\text{лат}}$ не превысило контроль объясняется образованием комплексов «белок — К-т» и частичной нейтрализацией протонов водорода соляной кислоты, но при увеличении концентрации К-т соответственно большее количество молекул лекарственного препарата встраиваются в мембрану

эритроцитов, а вместе с этим происходит формирование все большего количества дефектов в мембране изучаемых клеток. Через образовавшиеся повреждения происходит поступление внутрь клеток ионов водорода и всех других веществ, содержащихся во внеклеточной жидкости. Это также приводит к увеличению длительности стадии сферуляции эритроцитов крови белых беспородных крыс. Кроме того не превышение значения $t_{\text{лат}}$ контроля также может быть связано с недостаточным временем инкубации рабочей суспензии эритроцитов с Кт. После 15 минутного инкубирования наблюдается превышение значения $t_{\text{лат}}$ относительно контроля при использовании К-т в концентрации C_2 и C_3 , за исключением концентрации C_1 , что связано с вовлечением при использовании концентрации C_1 самых низкостойких эритроцитов, а увеличение значения $t_{\text{лат}}$ относительно контроля при использовании концентрации C_2 и C_3 свидетельствует о вовлечении в процесс сферуляции более стойких эритроцитов к кислотному гемолизу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов исследования показал, что К-т в различных концентрациях при взаимодействии с клетками живого организма образует комплексы «К-т — белок», которые в коротком промежутке времени способствуют увеличению порога проницаемости для ионов водорода и тем самым замедляют процесс гемолиза эритроцитарных клеток. При более длительном взаимодействии К-т с эритроцитарными мембранами происходит образование большего количества комплексов «К-т — белок» и соответственно формирования большего количества дефектов в мембране. В результате чего в процесс гемолиза вовлекаются более стойкие к кислотному гемолизу субпопуляции эритроцитов. На основании вышеизложенного можно констатировать, что К-т в концентрациях $4,98 \cdot 10^{-7}$; $9,96 \cdot 10^{-7}$; $19,92 \cdot 10^{-7}$ моль/л изменяет структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран. Важное значение имеет и время инкубации рабочей суспензии эритроцитов с К-т.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Насонов Е. Л. Ревматология 2005: Клинические рекомендации. — М. Гэотар Медицина. 2005. — 288 с.
2. Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. — М. Медицина. 1974. — 143 с.
3. Кудрин А. Н. Применение математики в экспериментальной клинической медицине. — М. Медицина. 1967. — 350 с.

4. *Блюменфельд Л. А.* Биофизика. — М. Наука. 1972. — 954 с.

5. *Артюхов В. Г., Резван С. Г., Гусинская В. В. и др.* Структурные свойства эритроцитов и функциональная активность системы комплемента крови больных с раз-

личными формами нефропатии // Вестник ВГУ. — 2000. — №1. — С. 130—133.

6. *Резван С. Г., Вашанов Г. А., Лавриненко И. А. и др.* Молекулярные механизмы взаимодействия гемоглобина с серотонином // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2004. — Т.90. №8. — С. 46—47.

Холодов Д. Б. — аспирант фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 530380, e-mail: holodov@pharm.vsu.ru

Николаевский В. А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 530380, e-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru

Резван С. Г. — к.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 530380

Kholodov D. B. — Voronezh State University, pharmaceutical faculty, the post-graduate student; tel.: (4732) 530380, e-mail: holodov@pharm.vsu.ru

Nikolaevsky V. A. — doctor of medicine, professor, chair of pharmacology department, Voronezh State University, pharmaceutical faculty; tel.: (4732) 530380, e-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru

Rezvan S. G. — biological doctor, Voronezh State University, biology-soil faculty, biophysics and biotechnology chair; tel.: (4732) 530380