

# ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ДОЗ НА КИСЛОТНУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO И IN VITRO

В. А. Николаевский, П. А. Федосов, А. И. Сливкин

*Воронежский государственный университет*

Поступила в редакцию 19.03.2013 г.

**Аннотация.** При исследовании влияния кислоты ацетилсалициловой на мембрану эритроцитов *in vitro* на модели кислотного гемолиза эритроцитов с использованием метода кислотных эритрограмм впервые найдена концентрация кислоты ацетилсалициловой  $0,099 \cdot 10^{-4}$  моль/л, которая не только не оказывала повреждающего действия на цитоплазматическую мембрану эритроцитов, но и защищала её от повреждения.

**Ключевые слова:** кислотный гемолиз, кислота ацетилсалициловая, цитоплазматическая мембрана, эритроциты.

**Abstract.** In the course of this analysis studied dose dependent model *in vitro* on the acid hemolysis of erythrocytes. There was found a concentration of acid acetylsalicylic  $0,099 \cdot 10^{-4}$  mol/l, which is not only do not have damaging effect on the cytoplasmic membrane of red blood cells, but also protects it from damage.

**Keywords:** acid hemolysis, acid acetylsalicylic, cytoplasmic membrane, erythrocyte.

## ВВЕДЕНИЕ

Ацетилсалициловая кислота (АСК) широко применяется для лечения воспалительных процессов, ревматических заболеваний, болевого синдрома и для профилактики тромбозов. Фармакологические эффекты АСК зависят от величины суточной дозы. В малых дозах (от 50 до 325 мг) АСК обладает антиагрегантным действием. В дозах 1,5–2 г - оказывает анальгезирующее и жаропонижающее действие. А в больших дозах (4–6 г) обладает противовоспалительным эффектом [1].

Однако даже однократный приём АСК у 12–30% больных может приводить к развитию серьёзных побочных эффектов. Особенно частые нежелательные эффекты АСК – поражение ЖКТ.

Ульцерогенное действие АСК (т. е. способность вызывать язвы) реализуется двумя путями. Во-первых, АСК является слабой кислотой, следовательно может напрямую химически воздействовать на стенку желудка. Во-вторых при продолжительном приёме АСК вызывает понижение уровня гастропротекторных простагландинов, в частности, P<sub>gI</sub>-2, вследствие ингибирования ЦОГ-1, что приводит к снижению защитных функций слизистого барьера. В результате развивается эрозия слизистой оболочки желудка, что может привести к язве [2].

С целью уменьшения побочного действия АСК со стороны ЖКТ предложено большое количество лекарственных форм АСК: растворимые формы (Упсарин УПСА), таблетки покрытые кишечнорастворимой оболочкой (Аспирин Кардио), комбинированные препараты, сочетающие в себе АСК и антациды (Кардиомагил). Однако, несмотря на предложенные лекарственные формы, не всегда возможно полное исключение ульцерогенного действия.

Отдельные аспекты взаимодействия АСК с цитоплазматической мембраной не ясны. Поэтому более углубленное исследование механизма повреждающего действия кислоты ацетилсалициловой на цитоплазматическую мембрану является актуальным.

На основании изложенного выше целью исследования является изучение действия АСК на цитоплазматическую мембрану.

Задачей явилось определение кислотной резистентности мембраны клеток на модели эритроцитов, подвергнутых влиянию гемолиза, на фоне применения кислоты ацетилсалициловой в широком диапазоне доз.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследование влияния кислоты ацетилсалициловой на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов проводили с использованием метода регистрации кислотных эритрограмм.

В качестве естественной модели для исследования проницаемости всех биологических мембран, наиболее подходящими являются эритроциты. Выбор модели обоснован тем, что структура эритроцитов наиболее изучена и отражает основные мембранолитические процессы. В качестве модифицирующего агента использовали субстанцию ацетилсалициловой кислоты в концентрации  $C_1=1.988 \cdot 10^{-4}$ ,  $C_2=0.994 \cdot 10^{-4}$ ,  $C_3=0.497 \cdot 10^{-4}$ ,  $C_4=0.099 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Суспензии эритроцитов получали по методу Л. А. Блюменфельда [3].

В эксперименте использовали кровь, полученную из хвостовой вены белых беспородных крыс ( $n=40$ ), в количестве 1-1,5 мл с соблюдением правил по гуманному обращению с животными. Взятие крови для проведения эксперимента производился путём резекции дистального фрагмента хвоста крысы, в одно и тоже время – между 7.30 и 8.30 часами. Кровь самотеком набирали в пробирку с антикоагулянтом прямого действия. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в соотношении 0.1 мл к 1.5 мл крови с активностью 5000 Е.Д. Полученную кровь разводили физиологическим раствором, трижды центрифугировали с использованием центрифуги ОПН-8 при 3000 об/мин в течение 10-15 минут с промежуточным отмыванием от антикоагулянта и плазмы 0,9% раствором хлорида натрия [4].

В качестве модельной системы использовали эритроциты – HCl – ацетилсалициловая кислота. В качестве анализируемых показателей использовали константу максимальной скорости гемолиза ( $K_{max}$ ).

В опыте *in vivo* животным вводили АСК через гастральный зонд в среднем объёме 5 мл в концентрации  $1.988 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Через 60 минут проводили забор крови. Гемолиз эритроцитов проводили в кварцевых кюветках с наружными размерами 20x40x10 мм и рабочим объёмом 5 мл. Определение концентрации эритроцитов и регистрацию эритрограмм осуществляли спектрофотометрически. Измерение проводили с помощью прибора ПЭ 5400 ВИ при длине волны 490 нм.

Статистическая обработка материала проведена с использованием пакета прикладных программ «Statgraphics». Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведённых экспериментов были построены интегральные кривые кислотного гемо-

лиза эритроцитов, модифицированных АСК, где  $G, \%$  - степень гемолиза эритроцитов,  $t$  - время гемолиза (рис. 1).

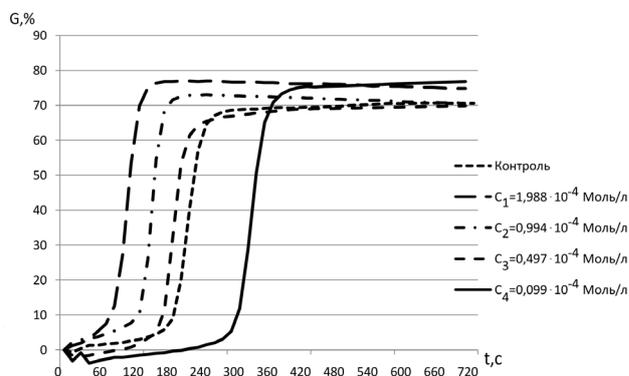


Рис. 1. График кислотных эритрограмм, модифицированных АСК.

Для их анализа использовали показатель  $K_{max}$ . По результатам исследования построены графики зависимости  $K_{max}$  от времени инкубации.

Анализ проведённых исследований показал, что АСК в концентрации  $C_3$  не вызывает изменений в скорости кислотного гемолиза всех типов популяций эритроцитов, относительно контроля.

Концентрация  $C_4$  начиная с 30 минуты, АСК не только не повышает интенсивность гемолиза, но и препятствует ему, т.е. уменьшает гемолизирующее действие соляной кислоты в среднем на 30.1% ( $p < 0,05$ ).

В больших концентрациях АСК вызывает заметное ускорение степени гемолиза эритроцитов, начиная с шестидесятой минуты инкубации. Так в концентрации  $C_2$ ,  $C_1$  на 120 минуте инкубации гемолиз увеличился на 35.4% и 139.4% соответственно. Данные показатели достоверны относительно контроля ( $p < 0,05$ ).

Наиболее достоверным критерием оценки результатов на данной модели является показатель  $K_{max}$ , который отражает изменения скорости гемолиза эритроцитов, то значения  $K_{max}$  представлены в табл. 1.

Анализ результатов исследования приведенных в табл. 1, показал, что значение  $K_{max}$  в нулевой инкубации не отличается от контроля во всех концентрациях, это означает, что без инкубации воздействие АСК на клеточную мембрану отсутствует.

При инкубации 15 минут происходит достоверное повышение  $K_{max}$  в концентрациях  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ , что свидетельствует о вовлечении большего

Таблица 1

Влияние АСК в различных концентрациях на значение показателя Ктах

Концентрации		Контроль	C <sub>4</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	
N		6	5	6	6	6	
Опыт	Время инкубации	0	6.44±0.33	6.45±0.33	6.18 ±0.29	6.2 ±0.26	6.84±0.41
		15	6.44±0.33	6.45±0.33	6.98±0.33**	8.0±1.31**	7.97 ±0.42*
		30	7.29±0.42	5.78±0.26*	7.62 ±0.56	9.28±0.56*	8.98±4.96
		60	7.97±0.42	5.78±0.26*	7.29±0.42**	9.83±0.78**	9.5±4.78
		120	7.97 ±0.42	5.58±0.21*	7.63 ±0.56	10.79±0.98*	19.08*
		240	9.28±0.56	5.58±0.21*	8.98±1.51	10.65 ±2.89	19.08*

\* - P<0.05; \*\* - P<0.001

числа эритроцитов в процесс кислотного гемолиза на 8.4-24.2% .

Инкубация в течение 30-240 минут вызывает последовательное дозозависимое повышение Ктах в концентрациях C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, что свидетельствует о понижении порога проницаемости для ионов H<sup>+</sup>. Следовательно происходит изменение структуры мембранных белков, в результате происходит повреждение клеточной мембраны эритроцитов.

При инкубации 30, 120, 240 минут в концентрации 0.497·10<sup>-4</sup> моль/л (C<sub>3</sub>) отсутствуют достоверные изменения Ктах, что говорит о том, что в данной концентрации АСК не обладает повреждающим действием на клеточную мембрану эритроцитов.

При инкубации 30-240 минут в концентрации C<sub>4</sub> наблюдается снижение Ктах на 20.7-39.87% (p< 0,05), следовательно происходит снижение числа вовлекаемых эритроцитов в процесс гемолиза. Очевидно, что АСК в данной концентрации при связывании с белковыми и липидными компонентами мембраны, не только не вызывает повреждение мембраны, но и проявляет защитный эффект.

В опыте in vivo в качестве анализируемых показателей использовали константу Ктах и время наступления 50% гемолиза (G50%). Анализ результатов исследования Ктах и G50% в опытах in vivo, приведенных в табл. 2, показал, что АСК в дозе 1.988·10<sup>-4</sup> моль/л, также повышает скорость гемолиза эритроцитов на 25,6% относительно контроля. Время наступления 50% гемолиза уменьшилось на 10.83% (p< 0,05), что свидетельствует о накоплении большого количества структурно функциональных дефектов в мембранах эритроцитов.

Таблица 2

Значения анализируемых показателей кислотного гемолиза эритроцитов в опыте in vivo

Показатели	Ктах	G50%
N	6	6
Контроль	6,21±0,26	300±9,48
Опыт	7,8±0,53*	267,5±14,74*

\* - P<0.05; \*\* - P<0.001

Результаты исследования в опытах in vivo подтверждают, что АСК оказывает повреждающее действие на клеточную мембрану в высоких концентрациях.

## ВЫВОДЫ

АСК в малых дозах защищает от повреждения клеточную мембрану, в средних дозах – не влияет, а в высоких концентрациях оказывает повреждающее действие на мембрану эритроцитов:

- в концентрации 0.099·10<sup>-4</sup> моль/л АСК в опыте in vitro начиная с 30 минуты повышает устойчивость мембраны эритроцитов к воздействию соляной кислоты на 30.1% (p< 0.05) относительно контроля в течение 240 минут.

- в концентрации 0.497·10<sup>-4</sup> моль/л в опыте in vitro в течение 240 минут, АСК не оказывает влияния на гемолиз эритроцитов.

- в концентрации 1.988·10<sup>-4</sup>; 0.994·10<sup>-4</sup> моль/л АСК в опыте in vitro понижает кислотную резистентность мембраны эритроцитов на 35.4% и 139.4% начиная с 120 минуты в течение 120 минут. В опытах in vivo пероральное введение АСК в той же концентрации по отношению к контролю понижает кислотную резистентность эритроцитов на 25.6%.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Житникова Л. М. Ацетилсалициловая кислота в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний: клинические рекомендации для практикующих врачей / Л. М. Житникова // Русский медицинский журнал. — 2012. — Т. 20 № 14. — С. 708-713.
2. Краткий курс истории НПВП / А. Е. Каратеев [и др.] // Научно-практическая ревматология. — 2012. — № 3. — С. 101-116.
3. Гительзон И. И. Эритрограммы как метод клинического исследования крови / И. И. Гительзон, И. А. Терсков. — Красноярск, 1959. — С. 247.
4. Холодов Д. Б. Изучение структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов, модифицированных кеторолак-триметамин / Д. Б. Холодов, В. А. Николаевский, С. Г. Резван // Вестник ВГУ. Химия. Биология. Фармация. - 2009. - № 1. - С. 129-135.

---

*Николаевский Владимир Анатольевич* — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; e-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru

*Федосов Павел Александрович* — студент фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 530380, e-mail: fedosov91@gmail.com

*Сливкин Алексей Иванович* — д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ; e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru

*Nikolaevsky Vladimir A.* — doctor of medicine, professor, chair of pharmacology department, Voronezh State University, pharmaceutical faculty; e-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru

*Fedosov Pavel A.* — the student of pharmaceutical faculty, Voronezh state university; e-mail: fedosov91@gmail.com

*Slivkin Alexey I.* — the doctor pharm. sciences, the professor, manager of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty VGU; e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru