

ОЦЕНКА ЦИТОАРХИТЕКТониКИ ЭРИТРОЦИТОВ ДОНОРОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТОМ «МОНОСАН»

О. В. Путинцева, В. Г. Артюхов, А. А. Немченко

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 10.09.2020 г.

Аннотация. В настоящее время широко применяются нитратные вазодилататоры для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Действующим веществом лекарственного препарата «Моносан» является изосорбид-5-мононитрат. Механизм действия нитратов основан на высвобождении NO, который приводит к образованию вазодилатирующего медиатора – цГМФ. Основными переносчиками NO в крови являются эритроциты, с гемоглобином которых связываются молекулы оксида азота, что может приводить к обратимым и необратимым трансформациям формы этих клеток. Метод сканирующей микроскопии позволяет с высокой точностью следить за изменениями эритроцитарных клеток в условиях воздействия изосорбида-5-мононитрата для предупреждения негативного влияния на организм. В связи с вышеизложенным, наша работа посвящена изучению трансформационных изменений эритроцитарных клеток, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Моносан» в течение разного временного периода. Было установлено, что морфологическая картина нативной суспензии эритроцитов соответствовала таковой здорового человека. После хранения суспензии эритроцитов человека в течение 1 ч наблюдалось снижение количества дискоцитов до 91.6 %, повышение числа обратимо деформированных клеток до 5.1%, необратимо деформированных – до 3.3%. Цитоархитектоника нативных эритроцитов после 24 ч инкубации значительно отличалась от таковой свежeweделенных клеток: количество дискоцитов снизилось до 63.5%, количество обратимо деформированных клеток возросло до 26.3%, необратимо деформированных – до 10.2%. После модификации суспензии эритроцитов человека препаратом «Моносан» в течение 1 ч не наблюдалось статистически достоверных изменений в содержании различных форм эритроцитов, а после 24-х часового контакта количество дискоцитов уменьшилось до 52.2 %, а число обратимо деформированных клеток увеличилось до 32.0%, необратимо деформированных эритроцитов – до 15.8%. Было установлено, что при суточном контакте эритроцитов с лекарственным препаратом «Моносан» увеличивается количество трансформированных клеток, нарушается эластичность мембран, что затрудняет снабжение клеток и тканей организма кислородом, а также может приводить к деформациям эритроцитарных клеток в микроциркуляторном русле. В связи с этим необходим особый контроль состояния эритроцитов пациентов, длительное время принимающих нитратные вазодилататоры, для исключения негативного воздействия лекарственных препаратов на организм.

Ключевые слова: эритроциты, Моносан, оксид азота, сканирующая электронная микроскопия, цитоархитектоника.

В настоящее время широко применяются нитратные вазодилататоры для лечения ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, профилактики и купирования приступов стенокардии. Такие препараты изготовлены на основании трех действующих веществ — глицерил тринитрата (нитроглицерин), изосорбид динитрата и изосорбид мононитрата. При этом в последнее время все чаще отдается предпочтение препаратам

третьей группы, так как изосорбид-5- мононитрат является естественным метаболитом динитрата и не проходит через печень. Вследствие этого его биодоступность достигает 100% при большей продолжительности действия, период его полувыведения около 4-5 часов [1-11]. Исследуемый нами препарат «Моносан» относится к группе мононитратов.

Механизм действия нитратов основан на высвобождении NO, который путем диффузии проникает в гладкомышечные клетки сосудов, активирует внутриклеточный фермент гуанилатциклазу,

в результате образуется вазодилатирующий медиатор – цГМФ, что ведет к уменьшению содержания внутриклеточного Ca^{2+} и к релаксации гладкомышечной клетки. По своей сути, все доноры оксида азота относятся к средствам NO – заместительной терапии, и их применение требуется в тех случаях, когда имеется количественный или функциональный недостаток NO в организме [3, 12-16].

Основным переносчиком NO в крови являются эритроциты, с гемоглобином которых связываются молекулы оксида азота, что может приводить к обратимым и необратимым трансформациям формы этих клеток. Эти изменения затрудняют выполнение эритроцитами своей основной функции - обратимое связывание молекул кислорода и транспорт их по организму. Большинство эритроцитов в норме представлено в виде дискоцитов, что обеспечивает оптимальность процессов диффузии газов [11, 13-15, 17]. Таким образом, важно учитывать трансформационные изменения эритроцитов при приеме нитровазодилаторов. Метод сканирующей микроскопии позволяет с высокой точностью следить за изменениями эритроцитарных клеток в условиях воздействия изосорбида-5-мононитрата. В связи с вышеизложенным, наша работа посвящена изучению трансформационных изменений эритроцитарных клеток, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Моносан» в течение разного временного периода.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали суспензии эритроцитов в 0.01 моль/л Na-фосфатном буфере (рН 7.4), полученные из крови доноров в день взятия пробы. Выделение суспензии эритроцитов из цельной крови донора осуществляли по методике, описанной в «Практикуме по биофизике» [18]. Полученную суспензию эритроцитарных клеток доводили раствором 0.01 моль/л Na-фосфатного буфера (рН 7.4) до оптической плотности D_{495} , равной 0.8, и затем использовали в эксперименте. Концентрация клеток в суспензии составляла $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Суспензию эритроцитов человека предварительно инкубировали при 37 °С в суховоздушном термостате ТС-1/80 СПУ (Россия) в стерильных условиях в течение 1 и 24 ч с раствором препарата «Моносан» (PRO.MED.CS Praha a.s. (Чешская Республика) ($1.047 \cdot 10^{-4}$ моль/л) в соотношении 1:1. Поверхностную цитоархитектонику нативных и модифицированных препаратом «Моносан» эритроцитов крови доноров изучали методом СЭМ. При

подготовке к электронному микрофотографированию контрольные и опытные образцы фиксировали 2.5 % раствором глутарового альдегида (Sigma, США) в течение 1 ч. Производили обезвоживание клеток путем центрифугирования в серии водных растворов этанола восходящей концентрации 30%, 50%, 70%, 90%. [19]. Приготовленную суспензию эритроцитов наносили на алюминиевые подложки и высушивали при 37 °С в суховоздушном термостате ТС-1/80 СПУ (Россия). Приготовленные препараты эритроцитарных клеток просматривали на сканирующем электронном микроскопе JSM – 6380 LV JEOL с системой микроанализа INKA 250 (Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ в лаборатории ЦКПНО ВГУ. Анализ поверхностной цитоархитектоники эритроцитарных клеток проводили по классификации Г.И. Козинец и Ю.Симоварт [20], рассчитывая ряд показателей: Д – количество дискоцитов, %; ОД – количество обратимо деформированных эритроцитов, %; НД – количество необратимо деформированных эритроцитов, %; ИТ – индекс трансформации: $\text{ИТ} = (\text{ОД} + \text{НД}) / \text{Д}$; ИОТ – индекс обратимой трансформации; ИНОТ – индекс необратимой трансформации.

Опыты проводили в 6-7-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в пяти повторностях. Результаты экспериментов сравнивали с контролем. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета «Stadia 6.0 (Professional)». Достоверность различий контрольных и опытных значений сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$), так как все исследуемые показатели характеризовались нормальным распределением [21].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами была исследована цитоархитектоника интактных эритроцитов крови доноров до и после инкубации при 37 °С в течение 1 и 24 ч. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 1 и на рис. 1,3,4.

В нативном образце содержалось 94.4 ± 0.36 % дискоцитов, 3.6 ± 0.24 % обратимо деформированных клеток (дискоциты с одним выростом, дискоциты с гребнем, дискоциты с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды) и 2.0 ± 0.13 % необратимо деформированных (куполообразные эритроциты, сфероциты с гладкой поверхностью, сфероциты с шипиками на поверхности, эритроциты в виде «спущенного» мяча, дегенеративные формы эритроцитов), что соответствует

Показатели цитоархитектоники эритроцитов крови доноров, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Моносан» в течение разного временного периода

Показатели	Контроль	Контроль (1ч)	Эритроциты + «Моносан» (1ч)	Контроль (24ч)	Эритроциты + «Моносан» (24ч)
Д	94.40 ± 0.36	91.60 ± 0.49*	91.3 ± 0.31	63.50 ± 1.81*	52.2 ± 0.38 *
ОД	3.60 ± 0.24	5.10 ± 0.42*	5.5 ± 0.30	26.30 ± 1.89*	32.0 ± 0.58 *
НД	2.00 ± 0.13	3.30 ± 0.80*	3.2 ± 0.21	10.20 ± 0.20*	15.8 ± 0.4 *
ИГ	0.050 ± 0.002	0.090 ± 0.004*	0.09 ± 0.01	0.570 ± 0.049*	0.85 ± 0.04*
ИОТ	0.030 ± 0.024	0.060 ± 0.004*	0.06 ± 0.004	0.37 ± 0.43*	0.55 ± 0.03*
ИНОТ	0.020 ± 0.001	0.040 ± 0.002*	0.04 ± 0.003	0.110 ± 0.007*	0.29 ± 0.02 *

*отклонения исследуемого показателя относительно значений в интактной группе статистически значимы

морфологической картине красных клеток крови здорового человека [20].

После хранения суспензии эритроцитов человека в течение 1 ч наблюдалось снижение количества дискоцитов до 91.6 ± 0.49 %, повышение числа обратимо деформированных клеток до 5.1 ± 0.42 %, необратимо деформированных – до 3.3 ± 0.80 %.

Цитоархитектоника нативных эритроцитов после 24 ч инкубации значительно отличалась

от таковой свежевыделенных клеток и характеризовалась следующими изменениями ее показателей: количество дискоцитов снизилось до 63.5 ± 1.81 %, количество обратимо деформированных клеток возросло до 26.3 ± 1.89 %, необратимо деформированных – до 10.2 ± 0.20 %.

После модификации суспензии эритроцитов человека препаратом «Моносан» в течение 1 ч не наблюдалось статистически достоверных из-

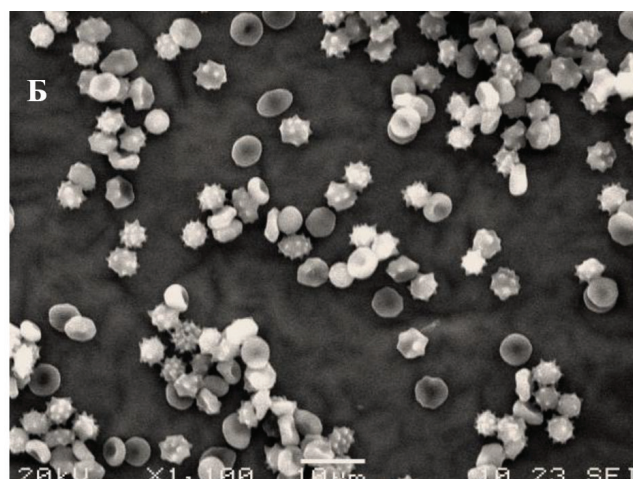
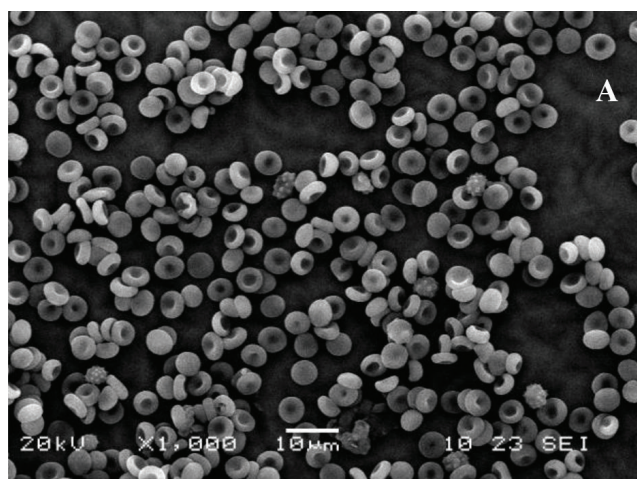


Рис. 1. Электронные микрофотографии эритроцитов контрольного образца: а) инкубация 1ч, увеличение×1000;б) инкубация 24 ч, увеличение ×1100

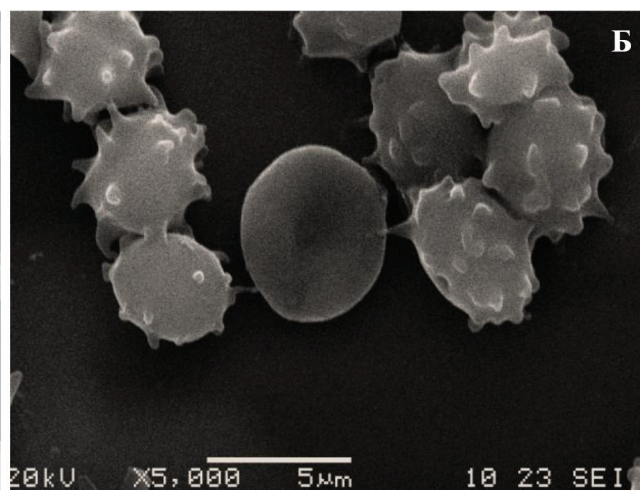
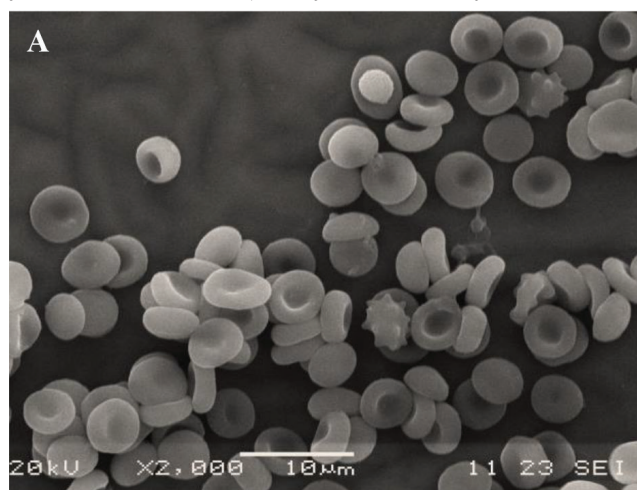


Рис. 2. Электронные микрофотографии эритроцитов после модификации лекарственным препаратом «Моносан»: а) в течение 1ч, увеличение×2000; б) в течение 24ч, увеличение ×5000.

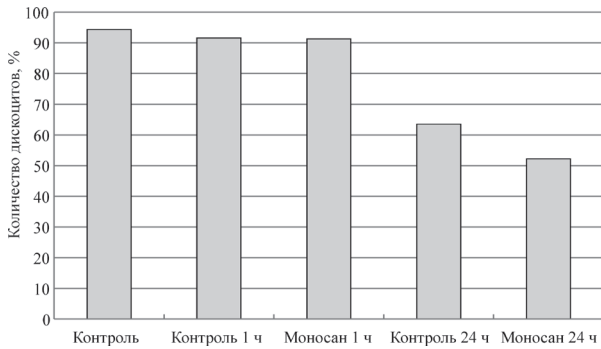


Рис. 3. Зависимость количества дискоцитов от времени инкубации с препаратом «Моносан» изменений в содержании различных форм эритроцитов.

Во время 24-х часового контакта эритроцитов с препаратом «Моносан» количество дискоцитов уменьшилось до 52.2 ± 0.38 %, а число обратимо деформированных клеток увеличилось до 32.0 ± 0.8 %, необратимо деформированных эритроцитов – до 15.8 ± 0.4 %, значений ИТ – до 0.85 ± 0.04 , ИОТ – до 0.55 ± 0.03 , ИНОТ – до 0.29 ± 0.02 (рис. 2-4, табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью метода сканирующей электронной микроскопии было выявлено, что после воздействия лекарственного препарата «Моносан» на эритроциты доноров в течение 1 и 24 ч происходило постепенное нарастание количества клеток с обратимой и необратимой деформацией, которое достигло через сутки соответственно 32.0 % и 15.8 % от общего числа эритроцитов. Увеличение количества деформированных клеток и уменьшение количества дискоцитов приведут к тому, что эритроциты не смогут в должной мере снабжать клетки организма кислородом, поэтому необходим особый контроль состояния эритроцитов пациентов, длительное время принимающих нитратные вазодилататоры, для исключения негативного воздействия лекарственных препаратов на организм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евдокимова А.Г., Евдокимов В.В., Сметанин А.В., Теблоев К.И. // Медицинский совет. 2015. № 2. С. 52-57.
2. Стуров Н.В., Романова О. Л., Манякин И.С. // Трудный пациент. 2011. Т. 9. № 11. С. 11-14.
3. Малаховская Е.А., Петрищев Н.Н. // Регионарн. кровообращ. и микроциркул. 2005. Т. 4. № 4. С. 4-12.
4. Терещенко С.Н., Джаиани Н.А, Ильина Е.В. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2005. Т. 1. № 1. С. 19-23.

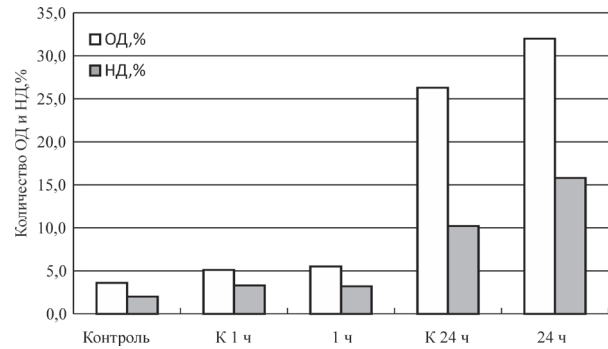


Рис. 4. Зависимость количества ОД и НД эритроцитов от времени инкубации с препаратом «Моносан»

5. Кассирский И.А., Алексеев Г.А. Клиническая гематология. М.: Медгиз, 1955, 450 с.
6. Cary S.P., Winger J.A., Marletta M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. pp. 13064-13069.
7. Марцевич С.Ю. // Сердце. 2003. Т. 2 (2). С. 88-90.
8. Соляник Е.В., Елисева Е.В., Гельцер Б.И., Якужная Е.В. // Российский кардиологический журнал. 2011. Т 91. № 5 (91). С. 47-51.
9. Терещенко С. Н., Жиров И. В. // Журнал Сердце. 2009. Том 8. №1. С. 9-12.
10. Харьков Е.И., Давыдов Е.Л. // Российский кардиологический журнал. 2007. Т 64. № 2. С 91-94.
11. Левтов, В.А., Регирер С.А, Шаурина И.Х. Реология крови. М.: Медицина, 1982, 272 с.
12. Huang K.T., Huang Z., Kim-Shapiro D.B. // J Biology and Chemistry. 2007. Vol. 16(2), pp. 209-216.
13. Кузнецова В. Л., Соловьева А.Г. // Современ. проблемы науки и образов. 2015. №4. С. 462.
14. Байбеков И.М. Эритроциты в норме, патологии и при лазерных воздействиях . Тверь, ООО «Издательство «Триада», 2008, 256 с.
15. Klinger J. R., Kadowitz P. J. // American Journal of Cardiology. 2017. Vol. 120, pp. 71-79.
16. Tomomi G., Masataka M. // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2006. Vol. 26, pp. 14-39.
17. Козинец Г.И. Клетки крови и костного мозга. М.: МИА, 2004, 203 с.
18. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Вашанов Г.А., Калаева Е.А., Лавриненко И.А., Наквасина М.А., Путинцева О.В., Радченко М.С., Резван С.Г. Практикум по биофизике. Под ред. В.Г. Артюхова. Воронеж, Издательский дом ВГУ, 2016, 314 с.
19. Bhowmick S., Das D.K., Mati A.K. // Micron. 2013. Vol. 44, pp. 384-394.
20. Козинец Г.И., Симоварт. Ю. Поверхностная архитектура клеток периферической крови. Таллин, Валгус, 1984, 116 с.

21. Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Теоретические основы и практическое применение

математической статистики в биологических исследованиях. Воронеж, Изд-во ВГУ, 2016, 284 с.

*Воронежский государственный университет
Путинцева О. В., доктор биол. наук, профессор,
кафедра биофизики и биотехнологии*

*Voronezh State University
Putintseva O.V., PhD., DSci., Full Professor,
Department of Biophysics and Biotechnology*

**Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,
заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

**Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor,
Head of the Dept. of Biophysics and Biotechnology
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Немченко А. А. магистр кафедры биофизики
и биотехнологии*

*Nemchenko A. A. Master of Biophysics and
Biotechnology dept.*

CYTOARCHITECTONICS OF DONORS ERYTHROCYTES UNDER CONDITIONS OF "MONOSAN" DRUG EXPOSURE

O. V. Putintseva, V. G. Artyukhov, A. A. Nemchenko

Voronezh State University

Abstract. Nitrate vasodilators are now widely used to treat cardiovascular diseases. The active substance of the drug "Monosan" is isosorbide-5-mononitrate. The mechanism of action of nitrates is based on the release of NO, which leads to the formation of a vasodilating mediator - cGMP. The main vector of NO in the blood are red blood cells, with the hemoglobin of which nitrogen oxide molecules bind, which can lead to reversible and irreversible transformations of the shape of these cells. The scanning microscopy method allows you to follow with high accuracy the changes in erythrocyte cells under the conditions of exposure to isosorbide-5-mononitrate to prevent a negative effect on the body. In connection with the above, our work is devoted to the study of transformational changes in erythrocyte cells modified by the effects of the drug Monosan over a different time period. It was found that the morphological pattern of the native suspension of red blood cells corresponded to that of a healthy person. After the storage of the suspension of human red blood cells within 1 hour there was a decrease in the number of discocytes to 91.6%, an increase in the number of reversible deformed cells to 5.1%, irreversibly deformed - up to 3.3%. The cytoarchiteconic of native red blood cells after 24 hours of incubation was significantly different from such freshly developed cells: the number of discocytes decreased to 63.5%, the number of reversible deformed cells increased to 26.3%, irreversibly deformed - to 10.2%. After the modification of the human red blood cell suspension by the drug "Monosan" for 1 hour there were no statistically reliable changes in the content of various forms of red blood cells, and after 24 hours of contact the number of discocytes decreased to 52.2%, and the number of deformed cells increased to 32.0%, irreversibly deformed erythrocytes - to 15.8%. It was found that with long-term contact of red blood cells with the drug "Monosan" increases the number of transformed cells, the elasticity of membranes is disturbed, which makes it difficult to supply of oxygen to the body's cells and tissues, and can lead to deformations of red blood cells in the microcirculatory bed. In this regard, special monitoring of the state of red blood cells of patients, long time taking nitrate vasodilators, to eliminate the negative effects of drugs on the body.

Keywords: red blood cells, Monosan, nitric oxide, scanning electron microscopy, cytoarchiteconic.

REFERENCES

1. Evdokimova A.G., Evdokimov V.V., Smetanin A.V., Tebloev K.I., Medicinskij sovet, 2015, No. 2, pp. 52-57.
2. Sturov N.V., Romanova O. L., Manjakin I.S., Trudnyj pacient, 2011, Vol. 9, No. 11, pp. 11-14.
3. Malahovskaja E. A., Petrishhev N.N., Regionarn. krovoobrashh. i mikroциркул, 2005, Vol. 4, No.4, pp. 4-12.

4. Tereshhenko S.N., Dzhaiani N.A., Il'ina E.V., Racional'naja farmakoterapija v kardiologii, 2005, Vol. 1, No 1, pp. 19-23.
5. Kassirskij I.A., Alekseev G.A. Klinicheskaja gematologija. M.: Medgiz Publ, 1955, 450 p.
6. Cary S.P., Winger J.A., Marletta M.A. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, Vol.102, pp. 13064-13069.
7. Marceovich S.Ju., Serdce, 2003, Vol. 2(2), pp. 88-90.

8. Soljanik E.V., Eliseeva E.V., Gel'cer B.I., Jakuhnaja E.V., Rossijskij kardiologičeskij J., 2011, Vol.91, No. 5(91), pp.47-51.
9. Tereshhenko S.N., Zhironov I.V., J. Serdce, 2009, Vol. 8, No. 1, pp 9-12.
10. Har'kov E.I., Davydov E.L., Rossijskij kardiologičeskij J, 2007, Vol. 64, No.2, pp. 91-94.
11. LevtoV, V.A., Regirer S.A, Shaurina I.H. Reologija krovi. M.: Medicina Publ, 1982, 272 p.
12. Huang K.T., Huang Z., Kim-Shapiro D.B, J. Biology and Chemistry, 2007, Vol. 16(2), pp. 209-216.
13. Kuznecova V.L. ,Solov'eva A.G., Sovrem. problemy nauki i obrazov, 2015, No. 4, pp. 462.
14. Bajbekov I.M. Jeritrocity v norme, patologii i pri lazernyh vozdeystvijah. Tver', Triada Publ, 2008, 256 p.
15. Klinger J. R., Kadowitz P. J., American J. of Cardiology, 2017, Vol. 120, pp. 71-79.
16. Tomomi G., Masataka M. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 2006, Vol. 26, pp. 14-39.
17. Kozinec G.I. Kletki krovi i kostnogo mozga. M.: MIA Publ, 2004, 203 p.
18. Artjuhov V.G., Basharina O.V., Vashanov G.A., Kalaeva E.A., Lavrinenko I.A., Nakvasina M.A., Putinceva O.V., Radchenko M.S., Rezvan S.G. Praktikum po biofizike. Pod red. V.G. Artjuhova. Voronezh, Izdatel'skij dom VGU, 2016, 314 p.
19. Bhowmick S., Das D.K., Mati A.K., Micron, 2013, Vol. 44, pp. 384-394.
20. Kozinec G.I., Simovart. Ju. Poverhnostnaja arhitektonika kletok periferičeskoj krovi. Tallin, Valgus, 1984, 116 p.
21. Kalaeva E.A., Artjuhov V.G., Kalaev V.N. Teoreticheskie osnovy i praktičeskoe primenenie matematičeskoj statistiki v biologičeskikh issledovanijah. Voronezh, VGU Publ, 2016, 284 p.