

ЦИТОАРХИТЕКТОНИКА И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТОМ «КАРДИКЕТ®»

Л. О. Соколова, О. В. Путинцева, Е. А. Калаева, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 11.01.2021 г.

Аннотация. Лекарственный препарат «Кардикет®» (SCHWARZ PHARMA, Германия) — периферический вазодилататор с преимущественным влиянием на венозные сосуды. Действующим веществом «Кардикета» является изосорбида динитрат. Данный препарат вызывает расслабление гладкомышечной стенки сосудов и может применяться сублингвально для купирования приступов стенокардии, однако, в основном назначается перорально для достижения более длительного эффекта.

При сублингвальном и пероральном приемах изосорбида динитрат поступает в кровоток и, соответственно, может влиять на структурные особенности мембран эритроцитов. В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования стало изучение с помощью методов сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и спектрофотометрии в УФ- и видимой областях спектра структурных изменений эритроцитов, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Кардикет» в течение разного временного периода (1 и 24 ч).

Контрольные образцы суспензий эритроцитов содержали 93.6 % дискоцитов; 4.4 % обратимо деформированных и 2.0 % необратимо деформированных клеток. Показатели индексов трансформации имели следующие значения: ИТ равен 0.07 ± 0.04 ; ИОТ — 0.05 ± 0.003 ; ИНОТ — 0.02 ± 0.001 . Параметры цитоархитектоники и электронных спектров поглощения нативных эритроцитов соответствовали морфологической картине красных клеток крови здорового человека. Данные показатели архитектуры и ЭСП интактных клеток не изменялись после термостагирования в течение 1 ч. Однако после 24 ч инкубации количество дискоцитов в суспензии снизилось до 70.4 %, а количество ОД и НД форм увеличилось до 19.4 и 10.2 % соответственно, при этом смещений пиков на электронных спектрах поглощения образцов не наблюдалось.

Воздействие на эритроциты лекарственного препарата «Кардикет» в течение 1 ч приводило к изменению ряда параметров. Так, число нормоцитов понизилось до 86.2 %, а содержание ОД и НД форм возросло до 11.0 и 2.8 %. В присутствии органического нитрата не наблюдалось смещения максимумов поглощения препаратов в УФ- и видимой областях спектра.

По прошествии суточной инкубации клеток с нитровазодилататором содержание дискоцитов уменьшилось до 38.2 %, а доля ОД и НД клеток повысилась до 44.2 и 17.6 % относительно контроля; изменения ЭСП эритроцитов указывают на окисление гемосодержащего белка красных клеток.

Высокая реакционная способность оксида азота способствует образованию токсичных свободных радикалов, в частности, пероксинитрита. Пероксинитрит оказывает повреждающее действие на белки эритроцитарной мембраны и вызывает переход гемоглобина в метформу. Другими важными реакциями пероксинитрита являются его реакции с сульфгидрильными группами аминокислот. Так, реакция пероксинитрита с цистеином приводит к окислению SH-группы, а в результате нитрования тирозина, в его ароматический цикл в соседнее положение с гидроксильной группой включается нитрогруппа. Такая реакция влияет на структурные и функциональные свойства внутриклеточных и мембраносвязанных белков, а окисление внутриэритроцитарного гемоглобина ведет к потере гибкости цитоскелета, деформируемости эритроцитов, повышенной хрупкости их мембран и гемолизу.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что, вероятно, препарат «Кардикет» может оказать цитотоксическое действие на эритроциты при длительном и регулярном употреблении, отчетливо это может проявиться у пациентов, которые имеют выраженные сердечно-сосудистые патологии. Следует установить наблюдение и контроль за структурным состоянием эритроцитарных клеток у пациентов, чтобы исключить негативное воздействие органических нитратов с целью получения максимально благоприятного эффекта.

Ключевые слова: эритроциты, сканирующая электронная микроскопия, «Кардикет», оксид азота, цитоархитектоника эритроцитов, метод спектрофотометрии.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из основных причин смертности и заболеваемости во всем мире. Каждый год от ССЗ умирает 17,5 миллиона человек. К ним относятся такие состояния, как гипертония, ишемическая болезнь сердца (ИБС), инсульт, ишемия миокарда и сердечная недостаточность [1].

До недавнего времени (2018-2020 гг.) в основном все внимание исследователей, касающееся патофизиологии сосудистой дисфункции, было сосредоточено на самой сосудистой стенке. Однако эритроциты могут являться важными регуляторами сердечно-сосудистой функции в патофизиологических ситуациях. При различных сердечно-сосудистых патологиях функции эритроцитов изменяются за счет повышенного образования активных форм кислорода (АФК), колебания содержания белка и активности ферментов, а также усиления их адгезии к сосудистой стенке [2].

Двояковогнутая форма и гибкость эритроцитов зависят от цитоскелета, который обеспечивает механическую стабильность и гибкость, необходимые для выдерживания сил, возникающих во время циркуляции крови. Образование аномальной формы клеток может быть обусловлено: дефектом цитоскелета мембраны; фрагментацией эритроцитов; полимеризацией, кристаллизацией или осаждением гемоглобина [3, 4].

Сами эритроциты могут быть подвержены трансформационным перестройкам, которые происходят как в нормальных, так и в патологических условиях при изменении микроокружения. В норме около 3% эритроцитов [5] имеют неправильную форму: эхиноцитарную, стоматоцитарную, куполообразную, сфероцитарную и т.д. (рис. 1).

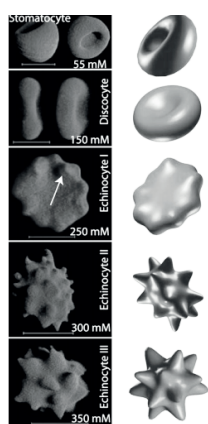


Рис. 1. Трехмерные изображения морфологии эритроцитов [8]: стоматоцит (stomatocyte), дискоцит (discocyte), дискоцит с множественными выростами (echinocyte I), эритроцит в виде «тутовой ягоды» (echinocyte II), эхиноцит (echinocyte III).

Роль оксида азота (NO) как сигнальной молекулы в живых организмах была открыта в 1980-х годах, а в 1998 г. Роберт Ферчготт, Луис Игнарро и Ферид Мурад получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за выяснение его функций в сердечно-сосудистой системе. В настоящее время известно, что оксид азота (NO) является мощным вазодилататором, который активирует гуанилатциклазу и в итоге образуется цГМФ, обладающий способностью расслаблять гладкомышечные стенки сосудов [6, 7].

В настоящий момент используются 4 группы лекарственных веществ, механизм действия которых связан с NO :

- Нитропрепараты, которые действуют как вазодилататоры через освобождение NO в клетках;
- М-холиноблокаторы, активирующие NO-синтазы, что повышает уровень оксида азота в клетках;
- Препараты, стимулирующие транскрипцию индуцибельной NO-синтазы, усиливающей синтез NO;
- Антагонисты ангиотензивных рецепторов 1-го типа : их активация приводит к угнетению экспрессии индуцибельной NO-синтазы [9].

Органические нитраты, такие как нитроглицерин, изосорбида динитрат и изосорбида мононитрат (рис. 2), быстро всасываются через желудочно-кишечный тракт и слизистые оболочки. Эти соединения представляют собой пролекарства с нитроокси (-O-NO₂) частью и распадаются с образованием биологически активных метаболитов [10]. К данной группе нитроvasодилататоров относится лекарственный препарат «Кардикет», его действующим веществом является изосорбида динитрат.

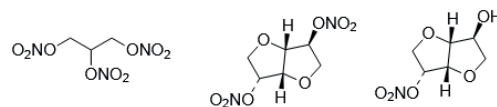


Рис. 2. Структурные формулы органических нитратов (слева направо): нитроглицерин; изосорбида динитрат; изосорбида мононитрат

«Кардикет» характеризуется тем, что активное вещество, содержащееся в таблетке, ускоренно поступает в кровоток. В результате этого препарат обеспечивает быстрое начало эффекта при лечении стенокардии и надолго сохраняет свое защитное действие [11].

При пероральном приеме внутрь изосорбида динитрата биодоступность составляет 22% (эф-

фekt «первого прохождения» через печень). Начало действия — через 15–30 мин, C_{\max} вещества в плазме крови достигается через 15 мин — 1–2 ч. В результате прохождения через печень изосорбида динитрат метаболизируется с образованием изосорбида-2-мононитрата и изосорбида-5-мононитрата, которые имеют $T_{1/2}$ равный 1.5–2 и 4–6 ч соответственно. Оба метаболита фармакологически активны и выводятся почками. Связывание с белками плазмы крови — 30% [12].

Побочные эффекты передозировки изосорбида динитратом, как правило, являются результатом его способности индуцировать расширение сосудов, венозную гиперемия, снижение сердечного выброса и гипотонию. Эти гемодинамические изменения могут иметь многочисленные формы проявления, в том числе головную боль, головокружение, сонливость, ортостатическую гипотензию, коллапс (иногда сопровождается брадиаритмией и обмороком), тошноту, рвоту, изжогу, аллергические кожные реакции (например, сыпь), покраснение, ангионевротический отек [13].

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является мощным инструментом, используемым для исследования поверхностей объектов, и широко применяется в биологии, особенно для изучения клеток крови [14]. Помимо СЭМ, для исследования крови удобными и эффективными (по точности и возможности автоматизации) являются фотометрические методы, которые обширно используются для различных типов химического и биологического анализа и по своей природе охватывают широкий диапазон длин волн [15, 16].

В данной статье мы приводим результаты собственных исследований цитоархитектоники и спектральных свойств эритроцитов доноров после их модификации лекарственным препаратом «Кардикет» в течение разного временного периода.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали суспензии эритроцитов с концентрацией клеток 10^6 кл/мл в 0.01 моль/л Na-фосфатном буфере (pH 7.4), полученные из крови доноров в день взятия пробы по стандартной методике [17]. Суспензию эритроцитов человека предварительно инкубировали в течение 1 и 24 ч с раствором лекарственного препарата «Кардикет®» (SCHWARZ PHARMA, Германия) в концентрации 0.4 мг/мл, в стерильных условиях при температуре 37 °C в сушевоздушном термостате ТС-1/80 СПУ (Россия).

При подготовке эксперимента контрольные и опытные образцы фиксировали 2.5 % раствором глутарового альдегида (Sigma, США) в течение 1 ч. Эритроцитарные клетки после фиксации промывали в 0.01 моль/л Na-фосфатным буфером (pH 7.4) не менее трех раз. Обезжизнение образцов проводили путем центрифугирования в серии водных растворов этанола восходящей концентрации 50, 70, 90 %. Приготовленные суспензии эритроцитов наносили на керамические подложки и высушивали в термостате при 37 °C [18]. Поверхностную архитектуру эритроцитов крови доноров изучали методом на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM 6380-LV (Япония) при ускоряющем напряжении 20 kV на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета. URL: <http://ckp.vsu.ru>.

Анализ структурного состояния мембран эритроцитарных клеток осуществляли по классификации Г.И. Козинца и Ю.Симворт [19]. Для детального анализа характера изменения поверхностной архитектуры эритроцитов рассчитывали ряд показателей: Д — количество дискоцитов в процентах; ОД — количество обратимо деформированных эритроцитов, в процентах; НД — количество необратимо деформированных эритроцитов, в процентах; ИТ — индекс трансформации, представляющий собой количественную оценку соотношения патологических и нормальных форм эритроцитов: $ИТ = (ОД + НД) / Д$; ИОТ — индекс обратимой трансформации: $ИОТ = ОД / Д$; ИНОТ — индекс необратимой трансформации: $ИНОТ = НД / Д$.

Электронные спектры поглощения эритроцитов снимали на автоматическом спектрофотометре UV-2401 PC Shimadzu (Япония) в диапазоне длин волн от 230 до 700 нм. Оптическую плотность суспензий регистрировали на протяжении всего исследуемого диапазона через 1 нм при ширине спектральной щели 1 нм.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета прикладных статистических программ «Stadia 8.0 (Professional)». Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Различия сравниваемых показателей считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$ [20].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нативном образце (рис. 3, табл.1) содержалось $93.6 \pm 4.7\%$ дискоцитов; $4.4 \pm 0.22\%$ обратимо

деформированных клеток (дискоциты с одним выростом, с гребнем, с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды) и $2.0 \pm 0.01\%$ необратимо деформированных эритроцитов (куполообразные эритроциты, сфероциты с гладкой поверхностью, с шипиками на поверхности, эритроциты в виде «спущенного» мяча, дегенеративные формы эритроцитов). Индексы трансформации имели сле-

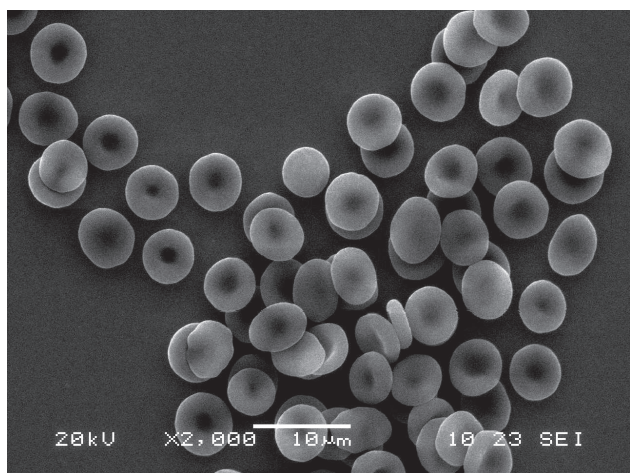


Рис. 3. Электронная микрофотография эритроцитов контрольного образца при увеличении $\times 2000$

дующие показатели: ИТ равен 0.07 ± 0.04 ; ИОТ — 0.05 ± 0.003 ; ИНОТ — 0.02 ± 0.001 . Данные показатели соответствуют морфологической картине красных клеток крови здорового человека [19].

Анализ результатов, представленных в табл. 1 и на рис. 4, показывает, что параметры цитоархитектоники эритроцитов после 1 ч инкубации при 37°C не имели статистически значимых отличий от показателей нативного образца. После хранения эритроцитов при 37°C в течение 24 ч количество дискоцитов сократилось до 70.4% , число обратимо деформированных форм увеличилось до 19.4% , а число необратимо деформированных клеток составило 10.2% . ИТ был равен 0.42 ± 0.005 , ИОТ вырос до 0.27 ± 0.003 , ИНОТ повысился до 0.14 ± 0.004 .

Из описанных выше данных следует, что показатели цитоархитектоники эритроцитов после 24 ч инкубации при 37°C наиболее сильно отличались по сравнению с контролем, а сами клетки (рис. 4 б) характеризовались значительными морфологическими изменениями. На электронных микрофотографиях образцов можно увидеть, что при этом начинают преобладать переходные формы эритроцитов, а именно, эритроциты с множественными выростами, эхиноцитарные и дегенеративные формы эритроцитов.

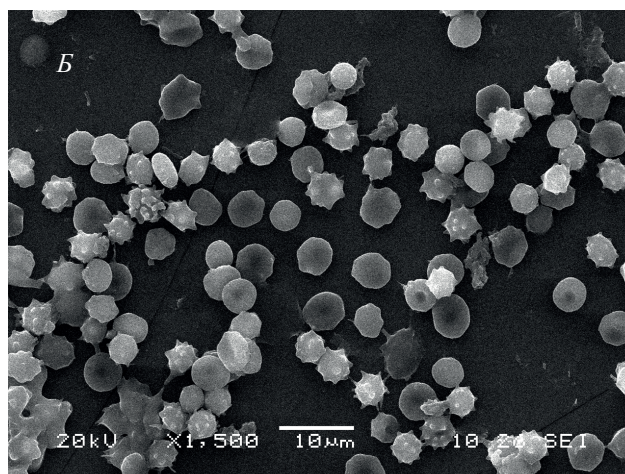
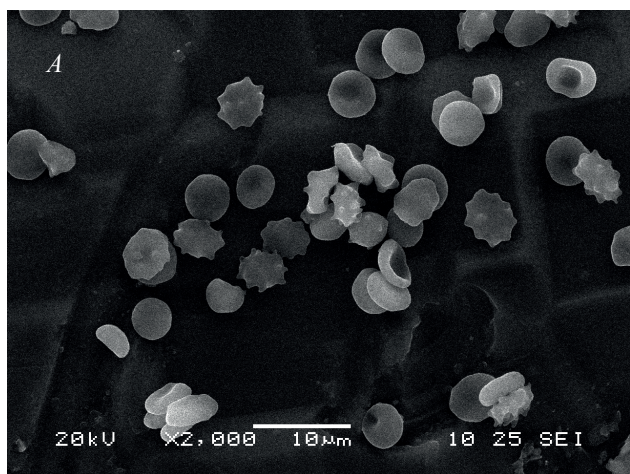


Рис. 4. Электронные микрофотографии эритроцитов после инкубации при 37°C в течение 1 ч при увеличении $\times 2000$ (а) и 24 ч при увеличении $\times 1500$ (б)

Таблица 1

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

Показатели	Контроль	Эритроциты (1 ч)	Эритроциты (24 ч)	Эритроциты + Кардикет (1 ч инкубации)	Эритроциты + Кардикет (24 ч инкубации)
Д, %	93.6 ± 4.7	89.8 ± 0.91	$70.4 \pm 0.98^*$	86.2 ± 0.98	$38.2 \pm 0.68^*$
ОД, %	4.4 ± 0.22	7.1 ± 0.22	$19.4 \pm 0.24^*$	$11.0 \pm 0.23^*$	$44.2 \pm 0.8^*$
НД, %	2.0 ± 0.01	3.1 ± 0.15	$10.2 \pm 0.51^*$	$2.8 \pm 0.14^*$	$17.6 \pm 0.4^*$
ИТ	0.07 ± 0.04	0.11 ± 0.01	$0.42 \pm 0.005^*$	$0.16 \pm 0.002^*$	$1.61 \pm 0.02^*$
ИОТ	0.05 ± 0.003	0.07 ± 0.001	$0.27 \pm 0.003^*$	$0.12 \pm 0.003^*$	$1.15 \pm 0.01^*$
ИНОТ	0.02 ± 0.001	0.03 ± 0.002	$0.14 \pm 0.004^*$	$0.03 \pm 0.002^*$	$0.46 \pm 0.011^*$

* Отличия от показателей нативных эритроцитов статистически достоверны ($P \leq 0.05$).

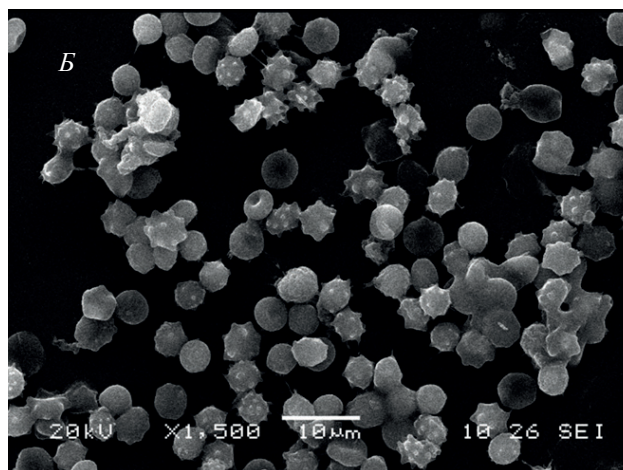
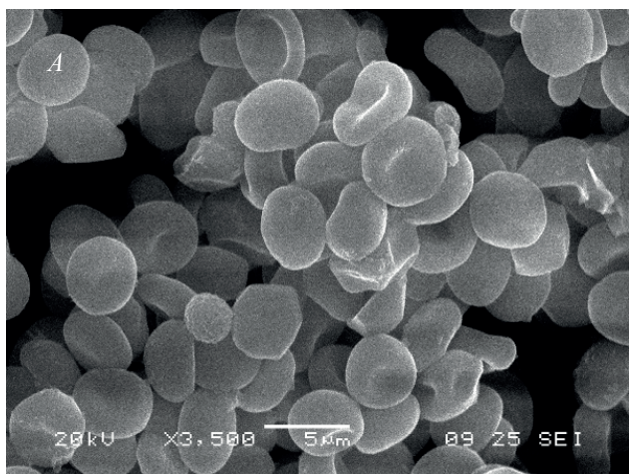


Рис. 5. Электронные микрофотографии эритроцитов после модификации препаратом «Кардикет» в течение 1 ч при увеличении $\times 3500$ (а) и 24 ч при увеличении $\times 1500$ (б)

После модификации суспензий эритроцитов человека лекарственным препаратом «Кардикет» (0.4 мг/мл) в течение 1 ч (табл. 1, рис. 5-7) наблюдалась тенденция к снижению содержания двояковогнутых дискоцитов до 86.2 ± 0.98 %, повышение количества обратимо деформированных до 11.0 ± 0.23 % и необратимо деформированных эритроцитов до 2.8 ± 0.14 %, значений ИТ – до 0.16, ИОТ – до 0.12 и ИНОТ – до 0.03.

24х-часовое воздействие изосорбида динитрата на суспензии эритроцитов человека привело к снижению числа двояковогнутых дискоцитов до 38.2 ± 0.68 %, повышению количества обратимо деформированных до 44.2 ± 0.8 % и необратимо деформированных эритроцитов до 17.6 ± 0.4 %; значений ИТ – до 1.61, ИОТ – до 1.15 и ИНОТ – до 0.46.

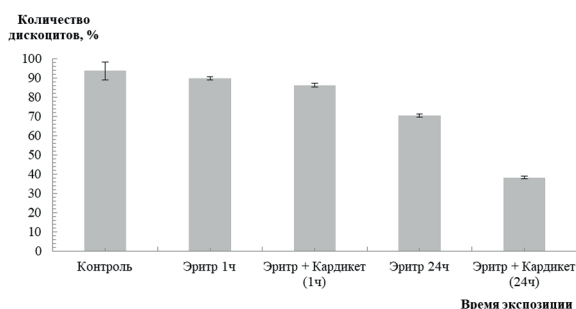


Рис. 6. Зависимость количества дискоцитов от времени инкубации с «Кардикетом».

На основании представленных результатов можно сделать вывод о том, что воздействие «Кардикета» на суспензии эритроцитов вызывало повышение числа обратимо и необратимо деформированных клеток в образцах (рис. 5, 7). Среди выявленных форм эритроцитов наблюдалось значительное увеличение количества клеток с одним

и с множественными выростами, сфероцитов, эхиноцитов и эритроцитов в виде «тутовой ягоды» по сравнению с контрольными образцами. Данные формы характеризуются выраженным нарушением эластичности эритроцитарной мембраны.

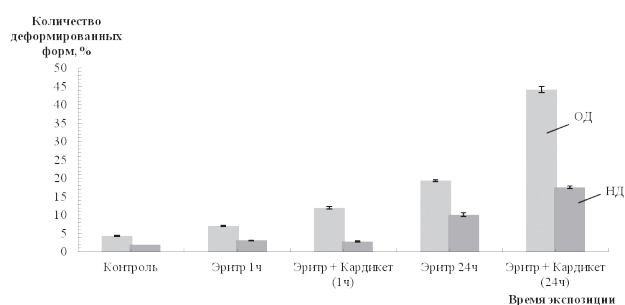


Рис. 7. Зависимость количества ОД и НД форм эритроцитарных клеток от времени инкубации с «Кардикетом»

Ранее исследованиями L.M Snyder и др. (1985) методом лазерной дифрактометрии было установлено, что трансформация основной популяции эритроцитов — дискоцитов, в патологическую форму — эхиноциты, обусловлена образованием перекрестных сшивок между спектрином и гемоглобином [21]. Появление большого количества необратимо деформированных форм эритроцитарных клеток указывает на нарушение устойчивости системы на уровне целой клетки, что обуславливает изменение её функционального состояния, а, следовательно, и способности к упругой деформации в микроциркуляторном русле [22].

При оценке спектральных характеристик нативной суспензии красных клеток (табл. 2, рис. 8) было отмечено наличие максимумов в УФ-области (274-276 и 343-346 нм) и трех полос поглощения

в видимой части спектра (418, 543 и 578 нм), что не противоречит полученным ранее результатам [23]. Следует отметить, что в зависимости от ориентации, эритроциты пропускают в максимуме поглощения 418 нм всего 36-77% света, а в максимуме 540 нм – 88-97% [24].

На ЭСП эритроцитов в течение 1 и 24 ч инкубации при 37 °С не обнаружено сдвигов максимумов поглощения и статистически достоверных отличий величин оптической плотности по сравнению с контролем, но после суточного термостатирования величина оптической плотности в полосе Сорс снизилась с 0.905 ± 0.01 до 0.843 ± 0.02 .

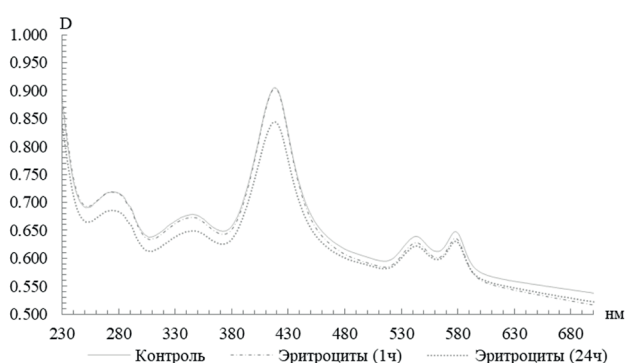


Рис. 8. Электронные спектры поглощения нативной суспензии эритроцитов, нативных суспензий эритроцитов после инкубации в течение 1 ч и 24 ч

По истечении 1 ч модификации суспензий эритроцитов препаратом «Кардикет» (табл. 2, рис. 9 а), электронные спектры поглощения клеток характеризовались наличием максимумов в УФ-

области спектра (268-269 и 344-346 нм) и трех полос поглощения в видимой части спектра (418-419, 543-544 и 577-579 нм), при этом отмечалось снижение значения оптической плотности в полосе Сорс с 0.905 ± 0.015 до 0.783 ± 0.010 .

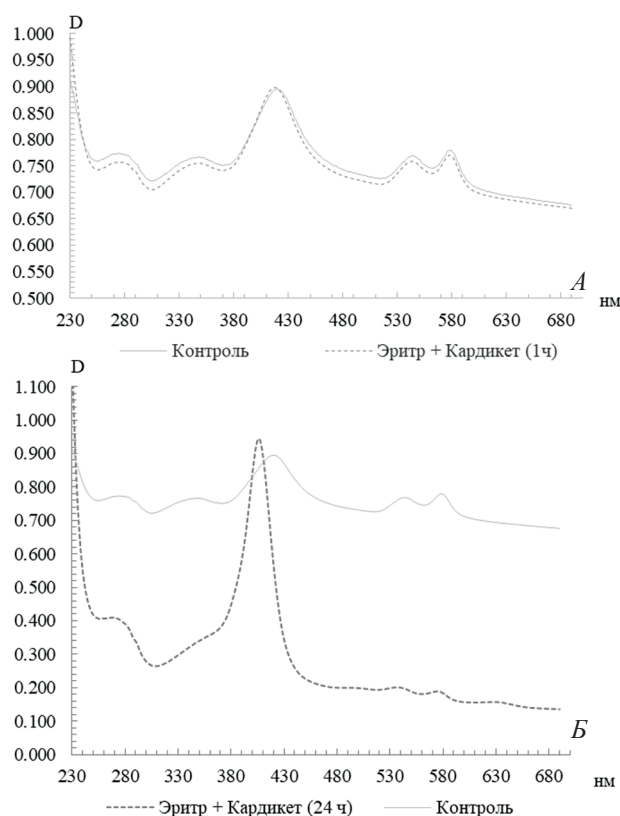


Рис. 9. Электронные спектры поглощения суспензии эритроцитов, модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет» в течение 1 ч (а) и 24ч(б).

Таблица 2

Спектральные характеристики суспензий эритроцитов, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Кардикет» в течение разного временного периода

Образец	Положение основных максимумов поглощения и оптическая плотность в них ($\bar{X} \pm SD; Me$)**					
Контроль	274-276 нм 0.718 ± 0.01 ; 0.714	343-346 нм 0.678 ± 0.009 ; 0.688	418 нм 0.905 ± 0.015 ; 0.901	543 нм 0.638 ± 0.008 ; 0.636	578 нм 0.647 ± 0.008 ; 0.644	—
Эритроциты (1ч)	274 нм 0.718 ± 0.012 ; 0.715	344-345 нм 0.673 ± 0.01 ; 0.67*	418 нм 0.903 ± 0.015 ; 0.897*	543-544 нм 0.649 ± 0.01 ; 0.626*	578 нм 0.635 ± 0.01 ; 0.633*	—
Эритроциты (24ч)	273-275 нм $0.685 \pm 0.02^*$; 0.678*	344-347 нм $0.648 \pm 0.017^*$; 0.643*	417-418 нм $0.843 \pm 0.024^*$; 0.834*	542-543 нм $0.621 \pm 0.016^*$; 0.616*	578 нм $0.630 \pm 0.017^*$; 0.625*	—
Эритроц.+ Кардикет (1ч)	268-269 нм $0.698 \pm 0.009^*$; 0.702*	344-346 нм $0.660 \pm 0.009^*$; 0.663*	418-419 нм $0.783 \pm 0.01^*$; 0.788*	543-544 нм 0.649 ± 0.01 ; 0.654	578-579 нм 0.650 ± 0.018 ; 0.656	—
Эритроц.+ Кардикет (24ч)	268-269 нм $0.375 \pm 0.056^*$; 0.343*	—	408 нм $1.058 \pm 0.1^*$; 1.09*	539-540 нм $0.140 \pm 0.05^*$; 0.114*	576 нм $0.133 \pm 0.049^*$; 0.107*	627-629 нм 0.067 ± 0.049 ; 0.042

* Отличия от характеристик нативных эритроцитов статистически достоверны ($P < 0.05$). ** \bar{X} — среднее значение; SD — среднее квадратичное отклонение; Me — медиана

После 24-часовой инкубации суспензии эритроцитов с органическим нитратом (табл. 2, рис. 9 б) на ЭСП было отмечено сглаживание полосы поглощения остатков ароматических аминокислот гемоглобина и её сдвиг в коротковолновую область спектра с 274-276 до 268-269 нм при одновременном понижении оптической плотности с 0.718 ± 0.01 до 0.375 ± 0.06 . Полоса поглощения при 343-347 нм сгладилась и перешла в «плечо» полосы *Soret*, максимум которой сместился с 418 до 408 нм, а величина оптической плотности повысилась с 0.905 ± 0.01 до 1.058 ± 0.1 . β -полоса сместилась с 543-544 до 539-540 нм, а α – полоса сдвинулась с 578 до 576 нм. Оптическая плотность в β - и α -полосах гембелка эритроцитов в присутствии модификатора статистически достоверно снизилась по сравнению с контролем соответственно до величин 0.140 ± 0.05 и 0.133 ± 0.049 , отмечалось наличие нового максимума при 627-629 нм. Описанные результаты свидетельствуют о том, что «Кардикет» индуцировал окисление железа гема HbO_2 и накопление MetHb (метформы гемоглобина) в эритроцитах [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было установлено, что электронные спектры поглощения и поверхностная архитектура интактных эритроцитов не изменялись через 1 ч термостатирования, в то время как через сутки количество дискоцитов в суспензии составило 70.4%.

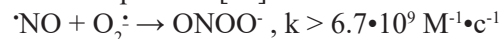
Воздействие «Кардикета» на эритроциты в течение 1 ч инициировало увеличение количества ОД и НД клеток до 11.0 ± 0.23 и 2.8 ± 0.14 %.

После длительного контакта эритроцитарных клеток с изосорбида динитратом (24 ч) были выявлены более глубокие изменения параметров цитоархитектоники: помимо уменьшения уровня дискоцитов (38.2 %) возросли показатели ОД и НД форм до 44.2 ± 0.8 % и 17.6 ± 0.4 %. 24-часовая инкубация клеток с «Кардикетом» приводила к образованию метгемоглобина в образцах, что подтверждается наличием характерных для метформы гембелка максимумов поглощения при 408 и 627-629 нм [25].

К настоящему времени твердо установлено, что цитотоксические свойства оксида азота обусловлены образующимся мощным окислителем – пероксинитритом. Это свойство цитотоксичности непосредственно связано с высокой реакционной способностью NO [26].

Когда оксид азота и супероксид-анион образуются в клетках, то, несмотря на присутствие

акцепторов радикалов и антиоксидантных ферментов, они будут реагировать друг с другом с высокой скоростью [27]:



Данная реакция имеет 2 негативных последствия. Во-первых, формируется более токсичный свободный радикал (пероксинитрит). Во-вторых, удаляется оксид азота, необходимый для нормальной вазодилатации, что оказывает повреждающее действие на мембранные белки эритроцитов и вызывает переход гемоглобина в метформу [27, 28].

Другими важными реакциями пероксинитрита являются его реакции с сульфгидрильными группами аминокислот. Среди этих реакций преобладает реакция с цистеином, приводящая к окислению SH-группы [29]. Нитрование белкового тирозина является ковалентной модификацией белка, в результате которой в ароматический цикл тирозина в положение, соседнее с гидроксильной группой, включается нитрогруппа [30]. Нитрование тирозина влияет на структурные и функциональные свойства внутриклеточных и мембраносвязанных белков, а окисление внутриэритроцитарного гемоглобина приводит к потере гибкости цитоскелета, деформируемости эритроцитов, повышенной хрупкости их мембран и гемолизу [31, 32].

Таким образом, анализ результатов проведенных модельных экспериментов по изучению физико-химических характеристик эритроцитов крови доноров в присутствии вазодилатора «Кардикет» свидетельствует о его способности активно влиять на изменения цитоархитектоники эритроцита, при этом процесс сопровождается накоплением обратимо и необратимо деформированных клеток с повышенным содержанием метгемоглобина и частичным гемолизом.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что лекарственный препарат «Кардикет», с большой вероятностью, может проявлять цитотоксические свойства. Для снижения негативного эффекта рекомендуется установить наблюдение за структурным состоянием эритроцитов при приеме нитроvasодилатора. Особое внимание следует уделить пациентам с сердечно-сосудистыми патологиями, которые длительное время регулярно принимают нитратсодержащие препараты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Moretto J. Pudlo M., Demougeot C. // Drug Discovery Today (2020), <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.005> (дата обращения 24.12.2020)

2. Pernow J., Mahdi A., Yang J., Zhou Z. // *Cardiovascular Research*. 2019. Vol. 115, No. 11, pp. 1596–1605.
3. Кузнецова В.Л. // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 4. С. 13-18.
4. Зинчук В.В., Степура Т.Л. *NO-зависимые механизмы внутриэритроцитарной регуляции сродства гемоглобина к кислороду: монография*. Гродно, Изд-во ГрГМУ, 2016, 176 с.
5. Olumuyiwa-Akeredolu O.O., Soma P., Buys A.V., Debushe L.K., Pretorius E. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Biomembranes*. 2017. No 1859, pp. 2381-2391.
6. Dybas J., Bokamper M. J., Marzec K. M., Mak P. J. // *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020. Vol. 239, pp. 530-537.
7. Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. // *Вятский медицинский вестник*. 2007. № 2-3. С. 32-40.
8. Khairy K., Howard J. // *Soft Matter*. 2011. No. 7, pp. 2138–2143.
9. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Калаева Е.А., Савостин В.С. *Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов: монография*. Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2013, 363 с.
10. Divakaran S., Loscalzo J. // *Journal of the american college of cardiology*. 2017. Vol. 70, No 19, pp. 2393-2410.
11. Аляутдин Р.Н. *Фармакология*. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004, 592 с.
12. https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_1675.htm (дата обращения 10.09.2020).
13. Furman B. // *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2018. No. 2, p.1-4.
14. Novikov I., Subbot A., Turenok A., Mayanskiy N., Chebotar I. // *Micron*. 2019. Vol. 124, pp. 687-694.
15. Лысенко С. А. *Методы оптической диагностики биологических объектов*. Минск : БГУ, 2014, 231 с.
16. Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C. *Spectrometric identification of organic compounds*. New York, Wiley, 1991, 430 p.
17. 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*. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016, 314 с.
18. Bhowmick S., Das D.K., Mati A.K. // *Micron*. 2013. No 44, pp. 384-394.
19. Козинец Г.И., Симоварт Ю. *Поверхностная архитектура клеток периферической крови*. Таллин: Валгус, 1984, 116 с.
20. 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.
21. Snyder L.M., Fortier N.L., Trainor J., Jacobs J., Leb L., Lubin B. Chiu D., Shohet S., Mohandas N. // *The journal of clinical investigation*. 1985. Vol.76, pp.1971–1977.
22. Баева Е. С., Артюхов В. Г. // *Антибиотики и химиотерапия*. 2019. № 11-12. С. 72-80.
23. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В., Башмакова Т.Н. // *Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России : в 2 томах*. 2019. Т. 2. С.165.
24. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. *Лекции по медицинской биофизике*. Москва: Изд-во МГУ, 2007, 432 с.
25. Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Путинцева О.В. // *Материалы 23 съезда физиологического общества им. И.П. Павлова с международным участием, Воронеж, 18-22 сентября 2017г. : тез. докл. — С. 440-441*.
26. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. // *Physiological reviews*. 2007. Vol. 87, pp. 315-424.
27. Daiber A., Sebastian M.O., Kröller-Schön S.S., Münzel T. // *Redox Biology*. 2017. No 12, pp. 35-49.
28. Kalyanaraman B. // *Redox Biology*. 2013. No. 1, pp.244-257.
29. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. // *Journal of biological chemistry*. 1991. Vol. 266, No 7 pp. 4244-4250.
30. Gow A.J., Farkouh C.R., Munson D.A., Posencheg M.A., Ischiropoulos H. // *Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004. Vol. 287, No 2, pp. 262-268.
31. Schopfer F.J., Baker P.R., Freeman B.A. // *Trends in Biochemical Sciences*. 2003. No 12, pp. 646-54.
32. Cortese-Krott M.M., Shiva S. // *Current Opinion in Physiology*. 2019. Vol.9, pp. 56-66.

Соколова Л. О., Путинцева О. В., Калаева Е. А., Артюхов В. Г.

Воронежский государственный университет
*Соколова Л. О., магистр кафедры биофизики
и биотехнологии
E-mail: lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Voronezh State University
*Sokolova L. O., Master, Department of
Biophysics and Biotechnology
E-mail: lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Путинцева О. В., доктор биол. наук, профес-
сор, кафедры биофизики и биотехнологии

Putintseva O. V., PhD., DSci., Full Professor,
Department of Biophysics and Biotechnology

Калаева Е. А., кандидат биол. наук, доцент
кафедры биофизики и биотехнологии

Kalaeva E. A., PhD., Associate Professor,
Department of Biophysics and Biotechnology

Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,
заведующий кафедрой биофизики и биотехноло-
гии

Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head
of the Department of Biophysics and Biotechnology

CYTOARCHITECTONICS AND SPECTRAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTES MODIFIED WITH THE DRUG «CARDIKET®»

L. O. Sokolova, O. V. Putintseva, E. A. Kalaeva, V. G. Artyukhov

Voronezh State University

Abstract. The drug «Cardiket®» (SCHWARZ PHARMA, Germany) is a peripheral vasodilator with a predominant effect on venous vessels. The active ingredient of «Cardiket» is isosorbide dinitrate. This drug causes relaxation of the smooth muscle wall of blood vessels and can be used sublingually to relieve angina attacks, however, it is mainly prescribed orally to achieve a longer-lasting effect.

With sublingual and oral administration of isosorbide, dinitrate enters the bloodstream and, accordingly, can affect the structural features of red blood cell membranes. In connection with the above, the purpose of this study was to study the structural changes of red blood cells modified by exposure to the drug «Cardiket» during different time periods (1 and 24 hours) using scanning electron microscopy (SEM) and spectrophotometry in the UV and visible regions of the spectrum.

Control samples of erythrocyte suspensions contained 93.6 % of discocytes; 4.4 % of reversibly deformed and 2.0% of irreversibly deformed cells. The indicators of the transformation indices had the following values: IT is equal to 0.07 ± 0.04 ; IOT- 0.05 ± 0.003 ; INOT- 0.02 ± 0.001 . The parameters of cytoarchitectonics and electronic absorption spectra of native red blood cells corresponded to the morphological picture of red blood cells of a healthy person. These parameters of architectonics and ESP of intact cells did not change after thermostating for 1 h. However, after 24 h of incubation, the number of discocytes in the suspension decreased to 70.4 %, and the number of OD and ND forms increased to 19.4 and 10.2%, respectively, while peak shifts in the electronic absorption spectra of the samples were not observed.

The effect on red blood cells of the drug «Cardiket» for 1 h led to changes in a number of parameters. Thus, the number of normocytes decreased to 86.2 %, and the content of OD and ND forms increased to 11.0 and 2.8 %. In the presence of organic nitrate, there was no shift in the absorption maxima of the preparations in the UV and visible regions of the spectrum.

After daily incubation of cells with nitrovasodilator, the content of discocytes decreased to 38.2 %, and the proportion of OD and ND cells increased to 44.2 and 17.6 % relative to the control; changes in the ESP of red blood cells indicate the oxidation of the heme-containing protein of red cells.

The high reactivity of nitric oxide promotes the formation of toxic free radicals, in particular, peroxynitrite. Peroxynitrite has a damaging effect on the proteins of the erythrocyte membrane and causes the transition of hemoglobin to the metform. Other important reactions of peroxynitrite are its reactions with sulfhydryl groups of amino acids. Thus, the reaction of peroxynitrite with cysteine leads to the oxidation of the SH group, and as a result of the nitration of tyrosine, a nitro group is included in its aromatic cycle in the neighboring position with the hydroxyl group. This reaction affects the structural and functional properties

of intracellular and membrane-bound proteins, and the oxidation of intra-erythrocyte hemoglobin leads to a loss of cytoskeletal flexibility, deformability of red blood cells, increased fragility of their membranes, and hemolysis.

The data obtained by us indicate that, probably, the drug «Cardiket» can have a cytotoxic effect on red blood cells with prolonged and regular use, this can clearly manifest itself in patients who have severe cardiovascular pathologies. It is necessary to establish monitoring and control of the structural state of red blood cells in patients to exclude the negative impact of organic nitrates in order to obtain the most favorable effect.

Keywords: erythrocytes, scanning electron microscopy, «Cardiket», nitric oxide, cytoarchitectonics of erythrocytes, spectrophotometry method.

REFERENCES

1. Moretto J. Pudlo M., Demougeot C.. Human-based evidence for the therapeutic potential of arginase inhibitors in cardiovascular diseases. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.005> (accessed 24 December 2020)
2. Pernow J., Mahdi A., Yang J., Zhou Z., Cardiovascular Research, 2019, Vol. 115, No. 11, pp. 1596–1605.
3. Kuznecova V.L., Modern problems of science and education. Surgery, 2015, No. 4, pp. 13-18.
4. Zinchuk V.V., Stepuro T.L. NO-zavisimie mehanizmi vnutrieritrocitarnoi regulyacii srodstva gemoglobina k kislorodu: monografiya. Grodno, Izd-vo GrGMU, 2016, 176 s.
5. Olumuyiwa-Akeredolu O.O., Soma P., Buys A.V., Debusho L.K., Pretorius E., Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Biomembranes, 2017, No. 1859, pp. 2381-2391.
6. Dybas J., Bokamper M. J., Marzec K. M., Mak P. J., Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, Vol. 239, pp. 530-537.
7. Troshkina H.A., Cirkin V.I., Dvoryanskij S.A., Medical newsletter of Vyatka, 2007, No. 2-3, pp.32-40 .
8. Khairy K., Howard J., Soft Matter, 2011, No. 7, pp. 2138–2143.
9. Artyuhov V.G., Putinceva O.V., Kalaeva E.A., Savostin V.S. Gemoglobin cheloveka v usloviyah vozdejstviya razlichnyh fiziko-himicheskikh agentov: monografiya. Voronezh: Izdatel'sko-poligraficheskij centr Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta, 2013, 363 s.
10. Divakaran S., Loscalzo J., Journal of the American college of cardiology, 2017, Vol. 70, No. 19, pp. 2393-2410.
11. Alyautdin R.N. Farmakologiya. M.: GEOTAR-MED, 2004, 592 s.
12. https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_1675.htm (accessed 10 September 2020).
13. Furman B. , Reference Module in Biomedical Sciences, 2018, No. 2, pp.1-4.
14. Novikov I., Subbot A., Turenok A., Mayanskiy N., Chebotar I., Micron. 2019, Vol. 124, pp. 687-694.
15. Lysenko S. A. Metody opticheskoy diagnostiki biologicheskikh ob'ektov. Minsk : BGU, 2014, 231 s.
16. Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C. Spectrometric identification of organic compounds. New York, Wiley, 1991, 430 p.
17. Artyuhov V.G. Basharina O.V., Vashanov G.A., Kalaeva E.A., Lavrinenko I.A., Nakvasina M.A., Putinceva O.V., Radchenko M.S., Rezman S.G. Praktikum po biofizike. Voronezh: Izd-vo VGU, 2016, 314 s.
18. Bhowmick S., Das D.K., Mati A.K., Micron, 2013, No 44, pp. 384-394.
19. Kozinec G.I., Simovart YU. Poverhnostnaya arhitektonika kletok perifericheskoy krovi. Tallin: Valgus, 1984, 116 s.
20. Kalaeva E.A., Artyuhov V.G., Kalaev V.N. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie matematicheskoy statistiki v biologicheskikh issledovaniyah. Voronezh : Izd-vo VGU, 2016, 284 s.
21. Snyder L.M., Fortier N.L., Trainor J., Jacobs J., Leb L., Lubin B. Chiu D., Shohet S., Mohandas N., The journal of clinical investigation, 1985, Vol.76, pp.1971–1977.
22. Baeva E. S., Artyuhov V. G., Antibiotiki i khimioterapiya, 2019, No. 11-12, pp.72-80.
23. Artyuhov V.G., Kalaeva E.A., Putinceva O.V., Bashmakova T.N. // Collection of scientific works of the VIth congress of biophysics of Russia in 2 vol., 2019, Sci proceedings Vol.2, p.165.
24. Vladimirov YU.A., Proskurnina E.V. Lekcii po medicinskoj biofizike. Moskva: Izd-vo MGU, 2007, 432 s.
25. Kalaeva E.A., Artyuhov V.G., Putinceva O.V., Proceedings of the 23rd Congress of the I. P. Pavlov Physiological Society with International Participation, September 18-22, 2017, Voronezh, pp. 440-441.

26. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. , *Physiological reviews*, 2007, Vol. 87, pp. 315-424.
27. Daiber A., Sebastian M.O., Kröller-Schön S.S., Münzel T., *Redox Biology*, 2017, No. 12, pp. 35-49.
28. Kalyanaraman B., *Redox Biology*, 2013, No. 1, pp.244-257.
29. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A., *J. Biol. Chem.*, 1991, Vol. 266, No. 7, pp. 4244-4250.
30. Gow A.J., Farkouh C.R., Munson D.A., Posencheg M.A., Ischiropoulos H., *AJP: Lung cellular and molecular physiology*, 2004, Vol. 287, No. 2, pp. 262-268.
31. Schopfer F.J., Baker P.R., Freeman B.A., *Trends in Biochemical Science*, 2003, No. 12, pp. 646-54.
32. Cortese-Krott M.M., Shiva S., *Current Opinion in Physiology*, 2019, Vol. 9, pp. 56-66.