

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ПОВЕРХНОСТНЫЙ ЗАРЯД МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

С.Л. Сашенков, Л.В. Алачева, Н.В. Тишевская
ЧелГМА, г. Челябинск

В данной работе были исследовано влияние некоторых фармакологических препаратов на поверхностный заряд мембраны эритроцитов. Изучалась электрофоретическую подвижность эритроцитов крыс после инкубации с фармакологическими препаратами в различных концентрациях. Было показано, что арахидоновая кислота, простагландин E₂, липоксин B, аспирин и индометацин снижают этот показатель, финоптин и трифтазин повышают электрофоретическую подвижность эритроцитов.

Ключевые слова: кровь, эритроцит, электрофоретическая подвижность, фармакологический препарат.

Актуальность. На современном этапе уделяется значительное внимание состоянию клеточных мембран в изучении патогенетических механизмов многих заболеваний. В качестве универсальной модели клеточной мембраны в большинстве исследований анализируется состояние цитоплазматической мембраны эритроцита. Мембранам эритроцитов присущи общие принципы организации и функционирования мембран других клеток, поэтому выявленные закономерности нарушений структуры и функции мембраны эритроцита, могут быть использованы для анализа других мембранных систем. Это позволяет использовать эритроциты в качестве доступного для практического применения «тест-объекта» в оценке состояния цитоплазматических мембран.

Такой показатель, как лабильность поверхностного заряда мембраны эритроцита, влияет на суспензионную устойчивость эритроцитов и реологические свойства крови. Поверхностный заряд эритроцитов обусловлен диссоциацией кислотных и основных групп клеточной мембраны, его величина зависит от многих факторов (состава плазмы крови, pH среды и др.) [4, 5]. Электрокинетические свойства мембраны эритроцитов определяются состоянием и взаимодействием белков цитоскелета, интегральных белков, содержанием АТФ, ионов (в первую очередь ионов кальция), которые обуславливают вязко-эластические свойства мембраны эритроцита.

Этот показатель определяется с помощью исследования электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФП) в постоянном электрическом поле [4, 5]. ЭФП может изменяться в зависимости от адсорбции различных веществ на мембране эритроцита и при различных патологических состояниях [4–6].

Представляет интерес изучение влияния полиненасыщенных жирных кислот, в частности арахидоновой кислоты, а также ее производных эйко-

заноидов на состояние поверхностного заряда эритроцитов [2]. Также большое значение имеет исследование влияния препаратов ингибиторов метаболических путей арахидоновой кислоты, нестероидных противовоспалительных препаратов (ацетилсалициловая кислота, индометацин) на электрокинетические свойства эритроцитов в связи с их широкой распространенностью в терапии воспалительных заболеваний. Актуальным представляется исследование действия блокаторов кальциевых каналов, которые часто встречаются в схемах лечения сердечно-сосудистых болезней.

Цель исследования состояла в изучении воздействия арахидоновой кислоты и ее метаболитов циклоксигеназного и липоксигеназного пути, а также препаратов неселективных ингибиторов циклоксигеназы аспирина и индометацина, блокатора кальциевых каналов финоптина и блокатора связывания ионов кальция с кальмодулином трифтазина на электрофоретическую подвижность эритроцитов в постоянном электрическом поле.

Методы исследования. Исследование было проведено на 44 беспородных крыс-самцах массой 200–220 г, у которых брали пробы крови. В каждой пробе с помощью секундомера и микроскопа с окулярной сеткой измеряли скорость передвижения 10 отдельных эритроцитов в постоянном электрическом и находили среднее значение (разность потенциалов на неполяризующихся электродах 40 мВ). Электрофоретическая подвижность эритроцитов в постоянном электрическом поле (ЭФП) измерялась в $\mu\text{c}^{-1}\cdot\text{v}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Влияние исследуемых веществ изучали методом их инкубации в течение 1 часа при 37 °С со взвесью эритроцитов интактных животных в соотношении 1:1 в изотоническом фосфатном буфере (pH 7,4). Исходные растворы исследуемых препаратов разводили непосредственно перед опытом изотоническим раствором хлорида натрия.

Исследовались следующие вещества:

1. Арахидоновая кислота (5, 8, 11, 14-эйкозотетраеновая кислота) в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-9} моль/л;
2. Метаболит липоксигеназного пути – липоксин В (5, 14, 15-тригидрокси-6, 8, 10, 12-эйкозотетраеновая кислота) в концентрации $3,6 \cdot 10^{-8}$; $3,6 \cdot 10^{-9}$; $3,6 \cdot 10^{-10}$ моль/л;
3. Метаболит циклоксигеназного пути – простагландин Е2 в концентрации от 10^{-5} до 10^{-8} моль/л;
4. Ингибиторы циклоксигеназы – аспирин в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} моль/л и индометацин в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} моль/л;
5. Блокатор кальциевых каналов – финоптин (верапамил) и блокатор связывания ионов кальция с кальмодулином – трифтазин в концентрации 10^{-4} моль/л.

В качестве группы сравнения исследовалась электрофоретическая подвижность эритроцитов интактных крыс в фосфатном буфере без инкубации (фон).

Статистическая обработка проводилась с использованием статистического программного пакета Statistica for Windows 6.0. Все данные представлены в виде средних значений с указанием стандартного отклонения в формате $M \pm m$, при сравнении групп использовались непараметрические критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса, статистическая достоверность различий соответствовала критерию $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные результаты по исследованию электрофоретической подвижности эритроцитов после инкубации с арахидоновой кислотой в двух сериях экспериментов (высокие и низкие концентрации) представлены в табл. 1 и 2.

Из табл. 1 видно, что ЭФП после инкубации эритроцитов с арахидоновой кислотой оказывается достоверно выше, чем интактных эритроцитов. Дозозависимый эффект в этой серии не выявлен:

различия между подгруппами по критерию Краскела–Уоллиса недостоверны ($p = 0,47$).

Во второй серии экспериментов (табл. 2) получены схожие результаты, однако при минимальной концентрации (10^{-9} моль/л) подобный эффект действия арахидоновой кислоты на ЭФП пропадает. Дозозависимого эффекта также не обнаружено ($p = 0,22$ по критерию Краскела–Уоллиса).

В целом, влияние арахидоновой кислоты на ЭФП эритроцитов представлено на рисунке.

Из диаграммы становится видно, что любые концентрации арахидоновой кислоты повышают ЭФП эритроцитов крыс, причем наиболее этот эффект выражен при воздействии арахидоновой кислоты в концентрациях 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} моль/л, где различия между концентрациями были не достоверны. Однако, начиная с концентрации 10^{-7} моль/л, четко прослеживается тенденция к снижению ЭФП и приближению ее значений к фоновым показателям.

Результаты исследования влияния липоксина В на ЭФП эритроцитов представлены в табл. 3.

Статистически достоверное повышение ЭФП эритроцитов крыс выявлено только при максимальной концентрации липоксина В ($3,6 \cdot 10^{-8}$ моль/л) в среде инкубации, при более низких концентрациях липоксина В подобного эффекта не выявлено. Дозозависимый эффект также не обнаружен ($p = 0,058$ по критерию Краскела–Уоллиса).

Действие конечного продукта циклоксигеназного пути простагландина Е2 представлено в табл. 4.

Простагландин Е2 способствует повышению ЭФП эритроцитов, при уменьшении концентрации простагландина Е2 в среде инкубации подобный эффект пропадает. Статистически достоверных различий между подгруппами по критерию Краскела–Уоллиса не получено ($p = 0,067$). Следует отметить, что в данном случае (в отличие от результатов, полученных с арахидоновой кислотой) для повышения ЭФП требуются более высокие концентрации простагландина Е2.

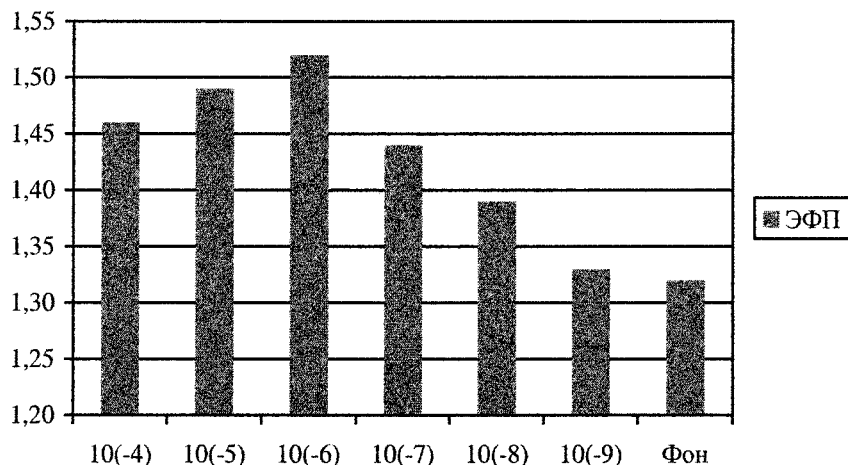
Таблица 1
Влияние арахидоновой кислоты в высоких концентрациях на ЭФП эритроцитов крыс

Концентрация, моль/л	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	Фон
Количество опытов (n)	15	15	15	8
$M \pm m$	$1,46 \pm 0,07$	$1,49 \pm 0,05$	$1,52 \pm 0,02$	$1,29 \pm 0,02$
p	0,01*	0,01*	0,01*	

Примечание. Здесь и в табл. 2–6 * – достоверные различия по критерию Манна–Уитни.

Таблица 2
Влияние арахидоновой кислоты в низких концентрациях на ЭФП эритроцитов крыс

Концентрация, моль/л	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	Фон
Количество (n)	15	15	15	12
$M \pm m$	$1,44 \pm 0,04$	$1,39 \pm 0,02$	$1,33 \pm 0,06$	$1,32 \pm 0,04$
p	0,005*	0,01*	0,88	



Влияние арахидоновой кислоты на ЭФП эритроцитов крыс

Таблица 3

Влияние липоксина В на ЭФП эритроцитов крыс

Концентрация, моль/л	$3,6 \cdot 10^{-8}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$	$3,6 \cdot 10^{-10}$	Фон
Количество (n)	15	15	15	12
$M \pm m$	$1,38 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,03$	$1,31 \pm 0,02$	$1,32 \pm 0,04$
p	0,02*	0,37	0,55	

Таблица 4

Влияние простагландина E2 на ЭФП эритроцитов крыс

Концентрация, моль/л	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	Фон
Количество (n)	4	4	4	4	4
$M \pm m$	$1,52 \pm 0,04$	$1,55 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,02$
p	0,03*	0,03*	0,48	0,34	

Действие ингибиторов циклооксигеназы аспирина и индометацина на изменение ЭФП представлено в табл. 5.

Аспирин и индометацин достоверно понижают уровень электрофоретической подвижности эритроцитов. Этот эффект наблюдается только в относительно высоких дозах соответствующих препаратов. Вполне возможно, что данные препараты, блокируя синтез простагландинов, снижают заряд мембран эритроцитов.

Влияние финоптина (верапамил – блокатор кальциевых каналов мембраны) и трифтазина (блокатор связывания ионов кальция с кальмодулином) на ЭФП эритроцитов крыс представлено в табл. 6.

И финоптин, и трифтазин статистически достоверно повышают уровень ЭФП эритроцитов крыс.

Заключение. В целом, можно сделать вывод, что все исследуемые вещества оказались мембранотропными и оказывали влияние на электрокинетические свойства эритроцитов крыс. Арахидоновая кислота, ее метаболит циклоксигеназного пути – простагландин E2 и метаболит липоксигеназного пути – липоксин В способствуют повышению ЭФП эритроцитов крыс. Ингибиторы циклокси-

геназы аспирин и индометацин блокируют образование простагландинов и способствуют снижению ЭФП.

Блокада кальциевых каналов мембраны и блокада связывания кальция с кальмодулином повышает поверхностный заряд мембраны эритроцитов, что подтверждает участие ионов кальция в регуляции функционального состояния клеток периферической крови.

Полученные результаты позволяют говорить о значимости влияния арахидоновой кислоты, ее производных эйкозаноидов, образование которых увеличивается при воспалительной реакции, на поверхностный заряд мембран эритроцитов. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов снижает электрокинетические свойства эритроцитов, что, по-видимому, отражается на параметрах суспензионной устойчивости, агрегационных свойствах эритроцитов и, в целом, на реологических характеристиках крови.

Таким образом, описываемые различными авторами изменения поверхностного заряда мембран эритроцитов при различных заболеваниях (инфаркт миокарда, гипертоническая болезнь, псориаз, воспалительные заболевания и т. д.) [1, 3] безусловно

Таблица 5

Влияние аспирина и индометацина на ЭФП эритроцитов крыс

Концентрация, моль/л	Аспирин 10^{-4}	Аспирин 10^{-5}	Индометацин 10^{-4}	Индометацин 10^{-5}	Фон
Количество (n)	5	5	5	5	5
$M \pm m$	$1,29 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,02$	$1,27 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,02$
p	0,008*	0,42	0,008*	0,055	

Таблица 6

Влияние финоптина и трифтазина на ЭФП эритроцитов крыс

Концентрация, моль/л	Финоптин 10^{-4}	Трифтазин 10^{-4}	Фон
Количество (n)	5	5	5
$M \pm m$	$1,78 \pm 0,03$	$1,70 \pm 0,02$	$1,36 \pm 0,01$
p	0,008*	0,008*	

могут быть следствием самого заболевания. Однако необходимо учитывать, что различные фармакологические препараты также могут модифицировать функциональное состояние мембран клеток периферической крови. Данные препараты влияют или на проницаемость мембран эритроцитов, а значит и на их мембранный потенциал, или на белки цитоскелета эритроцитов или взаимодействуют с рецепторами и сиаловыми кислотами мембран, в результате чего изменяется заряд мембраны и, как следствие, электрофоретическая подвижность эритроцитов.

Литература

1. Возможности новой клеточной информационно-технологии в объективизации клинико-лабораторной диагностики дерматозов / Т.В. Абрамова, А.В. Жукоцкий, С.Н. Щербо и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 10. – С. 25.

2. Электрофорез клеток гемопоэтической ткани / Г.И. Козинец, М.М. Зоделава, Л.В. Борзова, Р.А. Кульман. – Тбилиси: Сабчота Сакартвело, 1986. – 152 с.

3. Крылов, В.Н. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях / В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 139, № 4. – С. 364–366.

4. Влияние липоксигеназных метаболитов арахидоновой кислоты на поверхностный заряд мембраны эритроцитов / С.Л. Сашенков, А.Л. Хишво, Н.В. Егорова и др. // Физиологический журнал. – 1990. – Т. 36, № 3. – С. 83–86.

5. Харамоненко, С.С. Электрофорез клеток крови в норме и патологии / С.С. Харамоненко, А.А. Ракитянская. – Минск: Беларусь, 1974. – 143 с.

6. Seaman, J.V.F. Electrokinetic behavior of red cells / J.V.F. Seaman // Red blood cell. – New York: Acad. press, 1979. – P. 1145–1229.

Поступила в редакцию 20 октября 2010 г.