

ВОЗДЕЙСТВИЕ АНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА МЕМБРАНУ ЭРИТРОЦИТОВ

П. Ю. Алексеева², В. В. Мороз¹, В. Ю. Васильев¹, Г. Р. Казиев¹, Е. К. Козлова³,
А. М. Черныш³, М. С. Богусевич¹, А. П. Козлов², У. А. Близняк²

¹ ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

² Физический факультет Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова

³ Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Effect of Anesthetics on Red Blood Cell Membranes

P. Yu. Alekseyeva², V. V. Moroz¹, V. Yu. Vasilyev¹, G. R. Kaziyev¹, Ye. K. Kozlova³,
A. M. Chernysh³, M. S. Bogushevich¹, A. P. Kozlov², U. A. Bliznyuk²

¹ Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

² Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University

³ I. M. Sechenov Moscow Medical Academy

Цель работы — сравнительный анализ действия анестезиологических препаратов на мембрану эритроцитов в суспензии и в цельной крови. **Материалы и методы.** Исследования проводили на крови, взятой у здоровых доноров. Всего было проведено 260 опытов с цельной кровью и ее суспензией. В данной работе рассмотрено воздействие эсмерона, листенона и гексенала на мембраны эритроцитов, и выявлена специфическая реакция на действие каждого из них. **Результаты.** Эсмерон при концентрациях 1 мкл и 10 мкл препарата на 1 мл крови в суспензии нарушал структуру мембран, но не проявлял себя в цельной крови. Гексенал при концентрациях 2 мкл и 20 мкл препарата на 1 мл крови укреплял мембрану и повышал порог электрического пробоя, а в суспензии этот результат выражен сильнее, чем в цельной крови. Влияние листенона до концентраций 2 мкл мало заметно, но при концентрациях 20 мкл препарата на 1 мл крови и выше в цельной крови укреплял мембрану, а в суспензии — приводил к заметному нарушению структуры мембраны. **Заключение.** Знания о действии препаратов на клетки крови может помочь анестезиологам предупредить возможные осложнения при оперативных вмешательствах и после них. **Ключевые слова:** электропорация, мембраны эритроцитов, анестезиологические препараты.

Objective: to comparatively analyze the effect of anesthetics on red blood cell membranes in whole blood and its suspension. **Materials and methods.** The blood sampled from healthy donors was studied. A total of 260 tests using whole blood and its suspension were carried out. The study has considered the effect of esmerone, listenone, and hexenal on red blood cell membranes and revealed a specific response to each of them. **Results.** Esmerone given at a concentration of 1 μ l and 10 μ l of the drug per ml of blood in the suspension impaired the structure of membranes, without showing it worth in the whole blood. Hexenal at a concentration of 2 μ l and 20 μ l of the drug per ml of blood strengthened the membrane and increased the voltage failure threshold, but this result was more pronounced in the suspension and in the whole blood. The effect of listenone at a concentration of less than 2 μ l was slightly noticeable, but the drug strengthened the membrane and induced a pronounced membranous structural derangement when given at a concentration of 20 μ l of the drug per ml of blood or higher in the whole blood and in the suspension, respectively. **Conclusion.** Knowledge about the effects of the agents on blood cells may assist anesthesiologists to prevent possible complications during and after surgical interventions. **Key words:** electroporation, red blood cell membranes, anesthetics.

При хирургических вмешательствах и ряде медицинских мероприятий пациентам для проведения общего обезболивания вводят анестезиологические препараты или их комбинации. В частности, деполяризующие и недеполяризующие миорелаксанты. Каждый из этих препаратов обладает специфическими действиями на структуры нервно-мышечного синапса [1–4]. Однако, кроме специфического действия, которое должен оказывать анестезиологический препарат, каждый из них может обладать и побочными действиями на смежные клеточные структуры. Анестезиологические препараты могут вызывать изменения клеточной протоплазмы, воздействовать на клетки, высшие нервные центры го-

лового мозга и периферические органы. Известны работы по исследованиям влияния анестезирующих веществ на гемодинамику, транспорт кислорода, состояние свертываемости крови, внутрисосудистый объем крови, работу желудочков сердца, протекание токов ионных каналов, изменение pH крови [5–12].

Анестезиологические препараты могут оказывать влияние на мембраны эритроцитов. В одних случаях это влияние может быть нарушающим структуру мембран, в других — укрепляющим [13, 14].

Влияние одного и того же препарата может существенно различаться при введении его в цельную кровь или в суспензию эритроцитов (разбавление в 100–200 раз).

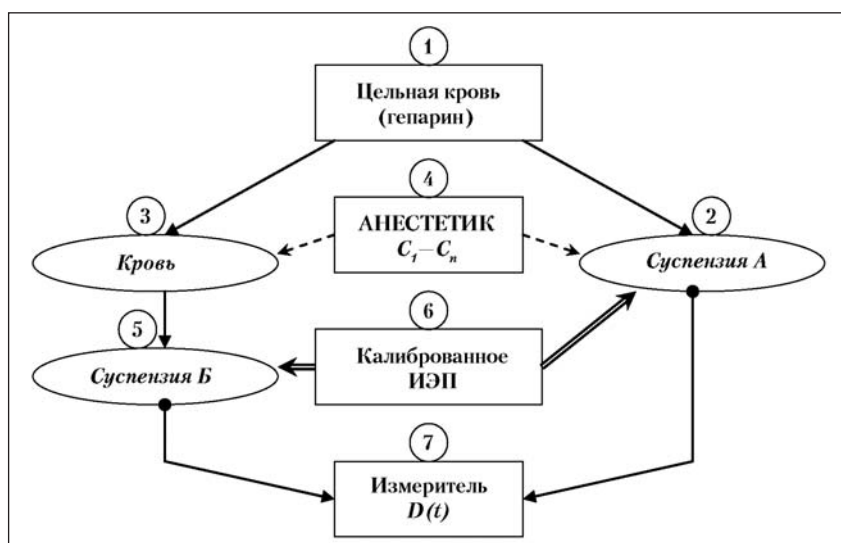


Рис. 1. Схема методики проведения экспериментов.

Это определяется наличием в цельной крови большого количества белков (альбумины, глобулины и фибриноген) и других химических соединений (неорганические соли, транспортные вещества, микроэлементы, промежуточные продукты метаболизма, гормоны и другие биологически активные вещества) [15–17], которые вступают в активные взаимодействия с введенными анестетиками и либо изменяют, либо вовсе блокируют действие препаратов на мембрану эритроцитов. В суспензии эритроцитов эти белки отсутствуют или находятся в пренебрежимо малых концентрациях. Поэтому в суспензии эритроцитов, используя метод калиброванной необратимой электропорации мембран, можно регистрировать непосредственное действие того или иного препарата на мембрану [18]. Исследование действия анестезиологических препаратов на мембрану эритроцитов в цельной крови пациента и на выделенную суспензию эритроцитов с использованием метода электропорации дает уникальную возможность, во-первых, оценить непосредственное действие препаратов на структуру клеточной мембраны и, во-вторых, оценить защитные свойства белков и других химических соединений крови при действии изучаемых анестезиологических препаратов.

Цель работы — сравнительный анализ действия ряда анестезиологических препаратов на мембрану эритроцитов в суспензии и в цельной крови.

Материалы и методы

Исследования проводили на крови, взятой у здоровых доноров. Всего было проведено 260 опытов с цельной кровью и ее суспензией. Методика проведения опытов представлена на рис. 1.

В работе исследовали действие таких анестезиологических препаратов, как эсмерон, лисстенон, гексенал. Эти препараты в номинальных концентрациях совместимы с 0,9% NaCl. Забирали венозную кровь здорового пациента, вводили 0,2 мл гепарина, выдерживали в течение 30 мин — время установления относительно стабильного состояния липидов мембран после выделения клеток из организма. Цельную кровь (1) разделяли на 2 части: цельную кровь (3) и кровь для приготовления суспензии А (2). Суспензию А приготавливали путем раз-

ведения цельной крови раствором 0,9% NaCl в концентрации 0,005 мл крови на 1 мл 0,9% NaCl. Затем кровь (3) и суспензию А (2) термостатировали при температуре, $t=19-20^{\circ}\text{C}$.

Кровь и суспензию помещали в 8 одинаковых пробирок (в 4 пробирки — кровь, в 4 — суспензию). После этого в кровь (3) и суспензию А (2) вводили анестезиологический препарат (4) в концентрациях $C_1=0$, $C_2=N$, $C_3=10N$, $C_4=100N$, где $C=N$ — концентрация лекарства, указанная в инструкции по применению препаратов для анестезиологического пособия при оперативных вмешательствах. После термостатирования в течение 15 мин из крови с находящимся в ней анестезиологическим препаратом (4) делали суспензию Б (5) с тем же разбавлением и с теми же параметрами, что и суспензию А (2).

При добавлении анестезиологических веществ в концентрациях, соответствующих допустимым при оперативном вмешательстве, в мембранах клеток могут происходить структурные нарушения, которые проявятся только через несколько дней, когда сложно будет отделить воздействие самого вещества от воздействия окислительных процессов. Для выявления возможных «скрытых» повреждений сразу после воздействия анестезиологических препаратов, суспензию А (2) и суспензию Б (5) подвергали воздействию калиброванного импульсного электрического поля (ИЭП) (6).

В качестве источника однородного импульсного электрического поля использовали клинический дефибриллятор «Lifepak-7», США. Суспензию А (2) или суспензию Б (5) помещали в кварцевую кювету с титановыми электродами, на которые подавали ИЭП. На объем рабочего раствора приходилась разность потенциалов $U=1600\text{ В}$ при длительности импульса 10 мс. При таких параметрах импульса значение наведенного трансмембранного потенциала превышает значение критического порогового потенциала, и происходит необратимая электропорация мембран вследствие их электрического пробоя. В зависимости от состояния мембраны изменяется порог электрического пробоя, а, следовательно, и константа скорости гемолиза эритроцитов. Таким образом, по изменению константы скорости гемолиза λ можно судить о степени воздействия внешнего фактора на структуру мембран эритроцитов.

Количество клеток, находящихся в кювете в данный момент времени t оценивали, измеряя оптическую плотность раствора D с помощью фотоэлектрического колориметра (7). При малых концентрациях оптическая плотность D прямо пропорциональна концентрации раствора C . Поэтому $D(t)$ является кинетической кривой, показывающей изменение количества клеток с течением времени. Подробно методика экспериментов приведена в работах [18–20].

Все экспериментальные данные были обработаны с помощью современных методов математического статистического анализа с применением программы Origin.

Результаты и обсуждение

Были проведены три серии опытов: 1-я — с эсмероном; 2-я — с гексеналом; 3-я — с лисстеноном. За нормальную концентрацию каждого $C = N$ были приняты концентрации этих препаратов, используемых в клинической практике: так, для эсмерона $C=N=1$ мкл/1 мл крови, для гексенала $C=N=2$ мкл/1 мл крови, а для лис-

тенона $C=N=2$ мкл/1 мл крови. Ниже представлены зависимости констант скоростей гемолиза эритроцитов после воздействия ИЭП при добавлении данного анестетика при различных концентрациях. Все результаты приведены в виде соответствующих эпюр. Кинетические кривые гемолиза эритроцитов и методы экстраполяции приводились нами ранее [18–20].

На рис. 2 представлены результаты воздействия эсмерона на цельную кровь (первый столбик в каждой паре для данной концентрации, окрашенный светлым тоном) и на суспензию эритроцитов (второй столбик в каждой паре для данной концентрации, окрашенный темным тоном) при действии на них препарата в концентрациях: $C_1=0$ — отсутствие препарата; $C_2=N=1$ мкл и $C_3=10N=10$ мкл препарата на 1 мл крови. Из приведенных результатов следует, что при увеличении концентрации препарата в крови относительная константа скорости не увеличивалась, препарат не ускорял гибель эритроцитов, но в суспензии относительная константа скорости гибели клеток резко возрастала с увеличением концентрации препарата, добавление эсмерона в суспензию приводило к повреждению структуры мембран.

При добавлении в суспензию А (2) эсмерона в концентрации $C_4=100N$ наблюдался гемолиз до уровня $D(t)=0,8$ в течение 1 часа даже без электрического пробоя. В результате электрического пробоя эритроцитов суспензии А (2) с эсмероном в концентрации $C_2=N$ константа скорости гемолиза была в 1,5–2 раза, а для $C_4=100N$ — в 20–40 раз больше, чем в суспензии без лекарства при $C_1=0$. Если эсмерон в концентрации $C_4=100N$ добавляли в цельную кровь (3), а затем приготавливали суспензию Б (5) и подвергали ее воздействию ИЭП, то константа скорости гемолиза была на 10–15% меньше, чем для суспензии без лекарства при $C_1=0$. Если в крови была концентрация $C=200N$, а затем приготавливали суспензию Б и подвергали ее воздействию импульсного электрического поля, то константа скорости была такой же, как для концентрации $C=N$ в суспензии А.

На рис. 3 представлены результаты воздействия гексенала на цельную кровь (первый столбик в каждой

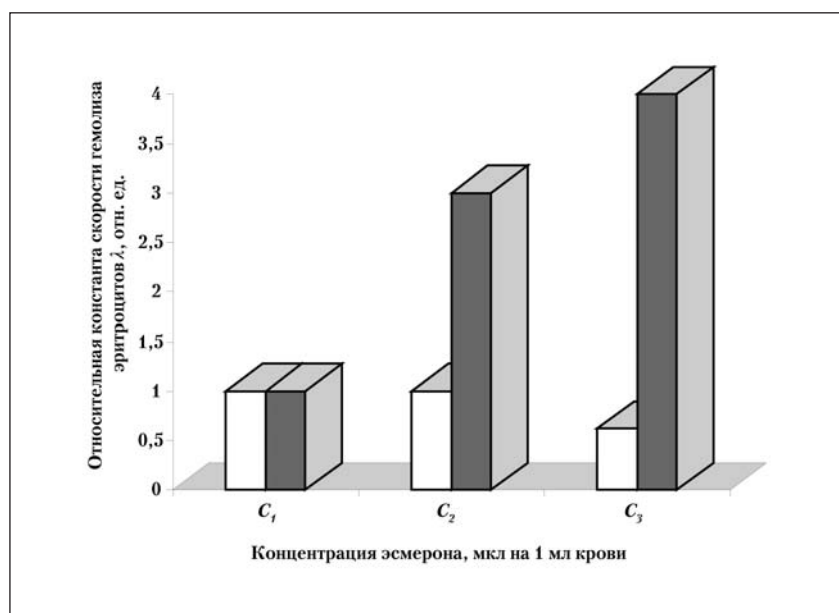


Рис. 2. Гистограмма зависимости относительной константы скорости гемолиза эритроцитов λ от концентрации эсмерона.

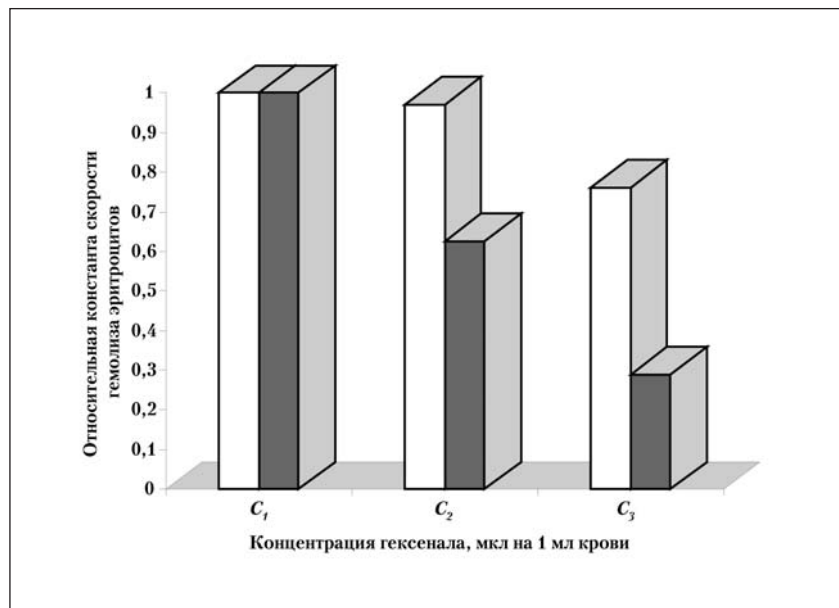


Рис. 3. Гистограмма зависимости относительной константы скорости гемолиза эритроцитов λ от концентрации гексенала.

паре для данной концентрации, окрашенный светлым тоном) и на суспензию эритроцитов (второй столбик в каждой паре для данной концентрации, окрашенный темным тоном) при действии на них препарата в концентрациях: $C_1=0$ — отсутствие препарата; $C_2=N=2$ мкл и $C_3=10N=20$ мкл препарата на 1 мл крови. В случае добавления гексенала наблюдалась обратная картина: чем большую концентрацию препарата добавляли в цельную кровь или суспензию, тем меньше становилась относительная константа скорости гемолиза. Процесс гибели клеток в результате электрического пробоя замедлялся. Для суспензии этот результат выражен сильнее.

На рис. 4 — результаты воздействия листенона на цельную кровь (первый столбик в каждой паре для дан-

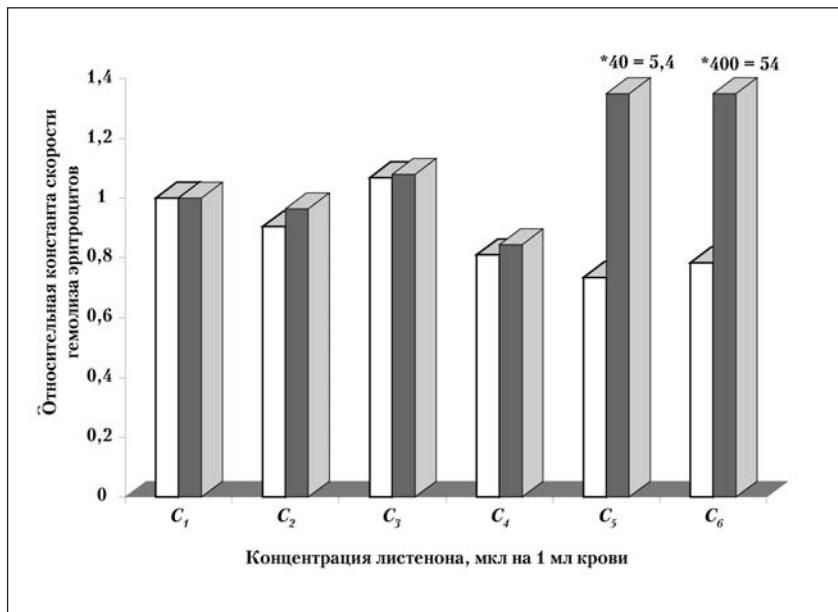


Рис. 4. Гистограмма зависимости относительной константы скорости гемолиза эритроцитов λ от концентрации лидокаина.

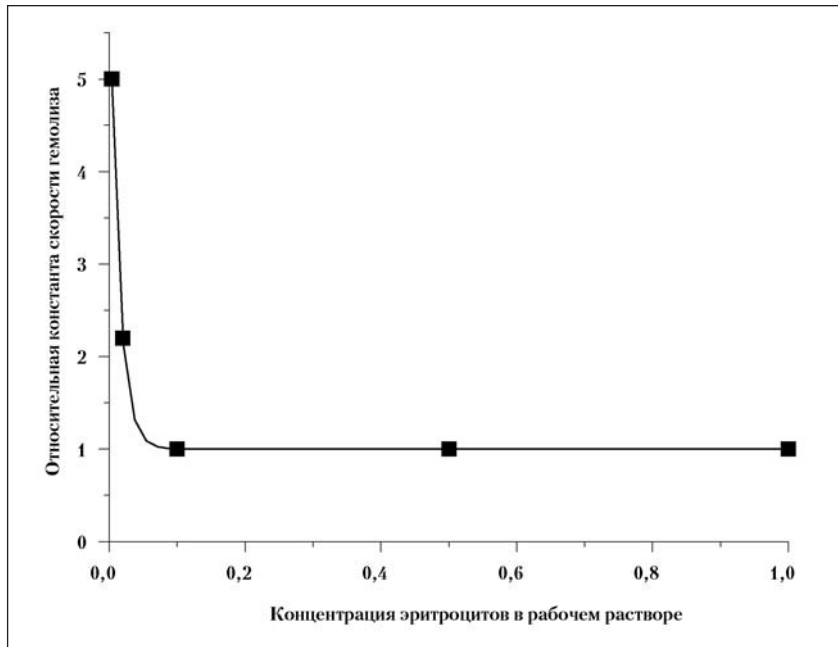


Рис. 5. Зависимость относительной константы скорости гемолиза эритроцитов λ от концентрации эритроцитов в рабочем растворе с добавлением эсмерона в концентрации $C_2=N=1$ мкл препарата на 1 мл крови. За единицу принята концентрация эритроцитов в цельной крови.

ной концентрации, окрашенный светлым тоном) и на суспензию эритроцитов (второй столбик в каждой паре для данной концентрации, окрашенный темным тоном) при действии на них препарата в концентрациях: $C_1=0$ — отсутствие препарата; $C_2=0,1N=0,2$ мкл; $C_3=N/2=1$ мкл; $C_4=N=2$ мкл; $C_5=10N=20$ мкл и $C_6=100N=200$ мкл препарата на 1 мл крови. При добавлении данного препарата, оказалось, что до концентраций $C_4=N=2$ мкл на 1 мл крови/суспензии относительная константа скорости гемолиза мало отличалась от концентрации $C_1=0$ (в отсутствии препарата), при больших же концентрациях отно-

сительная константа скорости гибели клеток для цельной крови была меньше контрольного значения, а для суспензии — резко увеличивалась. Таким образом, влияние лидокаина в цельной крови не вело к заметным нарушениям целостности структуры мембран эритроцитов, и препарат даже укреплял мембрану, а в суспензии — приводил к нарушению структуры мембран при концентрациях $C_5=10N=20$ мкл препарата на 1 мл крови и выше.

Из предыдущих рисунков следует, что при разных концентрациях препаратов мембраны испытывают различное воздействие. Эффект от воздействий сильнее выражен на мембранах эритроцитов в суспензии. На рис. 5 на примере эсмерона представлен результат воздействия препарата в номинальной концентрации $C_2=N$ мкл лекарства на 1 мл суспензии в зависимости от концентрации эритроцитов в рабочем растворе. Из графика следует, что в области малых концентраций эритроцитов (до 0,1 мл крови на 1 мл 0,9% NaCl) чем меньше концентрация, тем больше относительная константа скорости гемолиза.

Заключение

В данной работе рассмотрено воздействие трех анестезиологических препаратов на мембраны эритроцитов и выявлена специфическая реакция на действие каждого из них. Это связано с электрическими свойствами компонентов препаратов и свойствами самих мембран эритроцитов: асимметрия структуры эритроцитарных мембран, изменение пара-

метров электропорации при добавлении химических агентов и других [18–21].

Структура мембран неоднородна, а значит, существуют области с меньшим и большим значением порогового потенциала электрического пробоя. Некоторые молекулы химических веществ могут проникать в структуру мембран, нарушая ее. Поэтому в мембране образуются дополнительные центры с меньшим значением порогового потенциала пробоя, а, следовательно, при действии ИЭП образуется большее количество пор и гемолиз эритроцитов пройдет с большей скоростью.

Что и наблюдается в случае добавления эсмерона в суспензию эритроцитов.

Однако, молекулы некоторых химических веществ могут «прикрыть» собой мембрану эритроцитов, увеличив ее эффективную толщину, тем самым увеличивая порог электрического пробоя, или встроиться в возникшие поры. Целостность такой мембраны будет сохраняться дольше, что возможно, мы наблюдаем в случае добавления гексенала.

Таким образом, экспериментально показано, что действие эсмерона, листенона и гексенала на мембраны эритроцитов в цельной крови и в разведенной 0,9% NaCl — суспензии эритроцитов было неодинаковым. Эсмерон при концентрациях $C_2=N$ и $C_3=10N$ в суспензии нарушал структуру мембран, но не проявлял себя в цельной крови. Гексенал при концентрациях $C_2=N$ и $C_3=10N$ — укреплял мембрану и повышал порог электрического пробоя, и в суспензии этот результат был более ярко выражен, чем в цельной крови. Влияние листе-

нона до концентраций $C_4=N=2$ мкл мало заметно, но при концентрациях $C_5=10N=20$ мкл препарата на 1 мл крови и выше в цельной крови он укреплял мембрану, а в суспензии — приводил к заметному нарушению структуры мембраны.

С помощью предложенной методики можно проводить дифференцированный анализ влияния лекарственных препаратов и их отдельных составляющих на компоненты цельной крови. Знания о действии лекарственных препаратов на клетки крови может помочь врачам анестезиологам предупредить возможные осложнения при оперативных вмешательствах и после них.

Кроме того, данная методика может быть использована для оценки действия на мембраны клеток крови при создании новых лекарственных средств.

Авторы выражают благодарность В. М. Елагиной и М. С. Фёдоровой за помощь в проведении экспериментов.

Литература

1. Инструкция по применению препарата эсмерон.
2. Инструкция по применению препарата гексенал.
3. Инструкция по применению препарата листенон.
4. Шнайдер Н. А. Постоперационная когнитивная дисфункция. Неврол. журн. 2005; 4 (10): 37–43.
5. Азеева А. М., Кирилина С. И., Лебедева М. Н. и др. Анестезиологическое обеспечение хирургического лечения дегенеративных заболеваний позвоночника у пожилых людей. Хирургия позвоночника 2004; 4: 103–106.
6. Ульрих Г. Э. Способы кровесбережения при операциях на позвоночнике у детей: Обзор литературы. Хирургия позвоночника 2005; 1: 91–94.
7. Ганин Д. И., Дробышев М. Ф., Русанов В. П., Бутров А. В. Изменения гемодинамики при лапароскопической холецистэктомии в условиях эпидуральной анестезии. Тихоокеанский мед. журн. 2004; 4: 56–58.
8. Ульрих Г. Э., Ульрих Э. В., Качалова Е. Г., Ушаков А. В. Эффективность новых способов кровесбережения при операциях на позвоночнике у детей. Хирургия позвоночника 2005; 1: 95–99.
9. Назаров И. П. Пролонгированная стресс-протекция как метод защиты от хирургической агрессии. <http://rusanesth.com/genanest.html>
10. Зозуля С. А., Бойченко А. П. Исследование анестезирующего действия новокaina на передние конечности кошки с помощью газоразрядного электрода. В кн.: Тез. конф. ВНКФС-12; 2006. 534–535.
11. Иванов Л. В. Мембранотропные свойства лекарственных веществ. Проблемы поиска, скрининга и биодоступности. Фармаком 2004; 2: 1–5.
12. Лев А. А. Дискретность токов ионных каналов как общее свойство систем с доминирующей поверхностной проводимостью. Информ. бюл. РФФИ 1998; 6 (4): 259.
13. Мельников К. Н., Вислобоков А. И. Влияние бупивакаина и лидокаина на ионные каналы изолированных нейронов моллюска. Психофармакология и биологическая наркология 2004; 4 (2–3): 638–644.
14. Вислобоков А. И., Зайцев А. А., Игнатов Ю. Д., Савоськин А. Л. Мембранные механизмы действия на нервные клетки анестетиков, анальгетиков и противоишемических средств. Мед. акад. журн. 2001; 1 (1): 25–33.
15. Галенко-Ярошевский А. П., Фистуленко П. Н., Духанин А. С. Динамика взаимодействия местных анестетиков с сывороточным альбумином человека. Бюл. эксперим. биологии и медицины 2005; 140 (9): 295–300.
16. Munafo A., McDonagh A. F., Smith P. C., Benet L. Z. Irreversible binding of tolmetin glucuronic acid esters to albumin *in vitro*. Pharmaceutical Research 1990; 7 (1): 21–27.
17. Власова И. М., Землянский А. Ю., Полянский Д. В. Применение флуоресцентного зонда эозина в исследованиях конформационных изменений молекул сывороточного альбумина человека. Тез. конф. ВНКФС-12. 2006. 523–524.
18. Козлова Е. К., Черняев А. П., Черныш А. М., Алексеева П. Ю. Электропорация — эффективный метод экспресс-диагностики поврежденной биологических мембран в результате воздействия физико-химических факторов на эритроциты. Препринт НИИЯФ МГУ — 2005; 7: 773.
19. Козлова Е. К., Черняев А. П., Близинок У. А., Алексеева П. Ю. Исследование состояния мембран эритроцитов с помощью метода электропорации. В кн.: Тез. докл. науч. конф. Ломоносовские чтения. Секция физики. Подсекция: Биохимическая и медицинская физика. 17–27 апреля 2006. 91–93.
20. Kozlova E. K., Chernysh A. M., Chernyaev A. P. et al. Membrane electroporation under the combined action of physicochemical factors on erythrocytes. In: European association for red cell research, 15th Meeting, Murten, Switzerland; 2005. 78.
21. Мороз В. В., Козлова Е. К., Богушевич М. С. и др. Перфторан в суспензии крови. Эффекты закрепляющего и разрушающего действия на модифицированные электрическими импульсами мембраны. Общая реаниматология 2005; 3: 5–10.

Поступила 06.06.07