

ВЫЯВЛЕНИЕ СКРЫТЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

П. Ю. Алексеева³, В. В. Мороз¹, У. А. Близнюк³, В. М. Елагина³,
Г. Р. Казиев¹, В. Ю. Васильев¹, А. М. Черныш², М. С. Богушевич¹

¹ ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

² Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова,

³ Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

Detection of Occult Erythrocytic Membrane Damages Upon Pharmacological Exposures

P. Yu. Alekseyeva³, V. V. Moroz¹, U. A. Bliznyuk³, V. M. Yelagina³,
G. R. Kaziyeu¹, V. Yu. Vasilyev¹, A. M. Chernysh², M. S. Bogushevich¹

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

² I. M. Sechenov Moscow Medical Academy

³ Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University

Введение фармацевтических препаратов в кровь может вызывать скрытые воздействия этих лекарств на мембраны эритроцитов. Эти воздействия могут быть разрушающими, порождающими дополнительные дефекты в мембранах, но могут носить и укрепляющий характер. Вид и степень влияния препарата детектировали с помощью метода калиброванной необратимой электропорации импульсным электрическим полем (ИЭП). В статье рассматривается действие на мембраны эритроцитов широкого диапазона концентраций препаратов, применяемых в анестезиологии, эсмерона, тракриума и маркаина-адреналина. Показано, что скорость гемолиза эритроцитов при действии ИЭП и эсмерона в нормальной концентрации N возросла по сравнению с контролем в несколько раз. Аналогичный эффект возникал и при добавлении эсмерона в концентрации $C=10N$. Тракриум оказывал «закрепляющее» действие на мембраны эритроцитов. При комбинированном воздействии ИЭП и тракриума в нормальной концентрации $C=N$, гемолиз эритроцитов был замедлен. То же наблюдалось и при концентрации $C=10N$. Скорость гемолиза эритроцитов, подверженных комбинированному воздействию маркаин-адреналина в нормальной концентрации $C=N$, и даже в концентрации $C=10N$, и ИЭП, сравнима со скоростью гемолиза контрольной суспензии. **Ключевые слова:** анестетики, скрытые повреждения мембран эритроцитов, метод калиброванной необратимой электропорации мембран.

Blood administration of pharmaceuticals may cause occult effects of these agents on erythrocytic membranes. These effects may damage and cause additional membrane defects, but may strengthen. The type and degree of the effects of an agent were detected by calibrated irreversible electroporation with a pulsed electric field (PEF). The paper considers the erythrocytic membranous effects of a wide concentration range of agents used in anesthesiology, such as esmerone, tracrimum, and marcaine-adrenaline. Under the action of PEF and esmerone at the normal concentration N , the rate of erythrocytic hemolysis increased by several times as compared with the control. The similar effect also occurred when esmerone was added at the concentration $C=10N$. Tracrimum exerted a fixing effect on erythrocytic membranes. Upon a combined exposure to PEF and tracrimum in the normal concentration $C=N$; erythrocytic hemolysis was slow. So was with the concentration $C=10N$. The rate of hemolysis of the red blood cells subjected to a combined action of marcaine adrenaline at the normal concentration $C=N$ and even at the concentration $C=10N$ and PEF was comparable with the hemolytic rate of the reference suspension. **Key words:** anesthetics, occult erythrocytic membrane damages, calibrated irreversible membrane electroporation.

Оценка состояния мембран клеток крови при действии на них различных физических факторов и фармацевтических препаратов является одной из важных проблем фундаментальной медицины [1, 2]. Введение лекарств в кровь вызывает в ней различные химические реакции и процессы. При использовании ряда препаратов возможно возникновение реакций, которые носят необратимый характер. Так, необратимые процессы на микроуровне возникают сразу после воздействия γ -излучения, поверхностно-активных веществ и многих других факторов [3], а на макроуровне они остаются «скрытыми», т. е. период проявления повреждения на уровне клеточных и тканевых пато-

логий может достигать нескольких часов или даже суток [1, 4]. В результате повреждений на мембране возникают дополнительные дефекты. Несмотря на то, что такие дефекты могут не развиваться настолько, чтобы нарушить функцию клеток сразу после введения препарата, они с течением времени могут нарушить функции мембраны эритроцита и вызвать патологические процессы в крови. Выявляя изменение относительного числа скрытых повреждений мембран эритроцитов, можно сделать вывод о побочном характере воздействия лекарственного препарата. Для определения состояния биологических мембран в результате воздействия физико-химических факторов на эритро-

центы использовали импульсное электрическое поле — метод электропорации мембран [1, 5, 6].

Цель работы — детектирование скрытых повреждений мембран эритроцитов при воздействии некоторых препаратов, применяемых в анестезиологии.

Материалы и методы

Для проведения исследования был выбран ряд лекарственных препаратов, которые используются при проведении анестезиологического пособия во время оперативных вмешательств: маркаин-адреналин, эсмерон, тракриум.

Суспензию для проведения экспериментов приготавливали непосредственно перед началом работы, в пропорции 5 мкл крови в 1 мл 0,9% раствора хлористого натрия (NaCl). Оптическая плотность пятимиллиметрового слоя суспензии равнялась 1. Опыты проводили через 30 мин после приготовления суспензии. Во всех опытах суспензию термостатировали при температуре 20°C. Перед проведением каждого этапа эксперимента суспензию перемешивали.

Мембраны эритроцитов подвергали действию импульсного электрического поля (ИЭП). В качестве источника ИЭП использовали клинический дефибриллятор Liferak-7, создающий в суспензии напряженность поля 1100 В/см. Энергия электрического импульса 230 Дж, длительность импульса 10 мс.

Эффект комбинированного воздействия электрического импульса и лекарства на мембраны эритроцитов оценивали по скорости уменьшения численности эритроцитов в результате гемолиза в «контрольной» суспензии и эритроцитов в суспензии после комбинированного воздействия. Информацию о количестве эритроцитов, находящихся в данный момент времени в суспензии, получали, измеряя оптическую плотность раствора D с помощью фотоэлектрического колориметра (ФЭК). При длине волны света 760 нм, пропускание света через раствор определяется рассеянием на эритроцитах. Уменьшение количества эритроцитов в результате их гемолиза $n(t)$ приводит к уменьшению оптической плотности суспензии $D(t)$, так как при малой концентрации раствора наблюдается линейная зависимость $D(t) \sim n(t)$. Зависимость $D(t)$ будем называть кинетической кривой гемолиза. Сглаживание кривой проводили методом регрессионного анализа. Экспоненциальную функцию записывали в виде:

$$y = y_0 + A_1 \exp(-\beta t),$$

где β — константа скорости уменьшения числа эритроцитов.

На всех этапах эксперимента одновременно контролировали оптическую плотность контрольной суспензии. Подробно методика проведения экспериментов описана в работе [1]. Всего было проведено 224 опыта, результаты которых были обработаны с помощью современных методов статистического анализа.

Результаты и обсуждение

В работе приводятся результаты действия на мембраны эритроцитов трех препаратов, воздействие которых на мембраны носило различный характер.

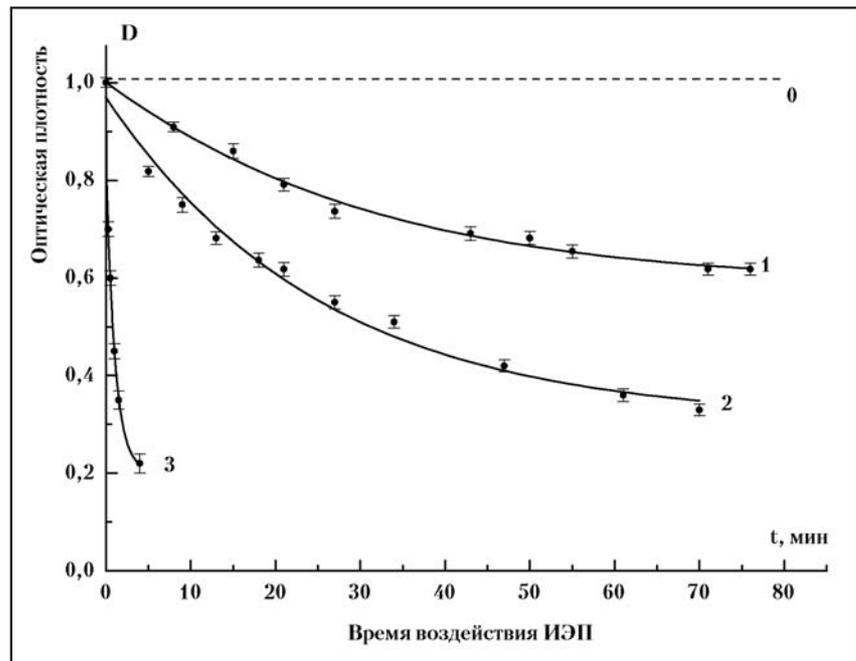


Рис. 1. Кинетические кривые зависимости уменьшения количества эритроцитов после воздействия на суспензию крови.

0 — эсмерон в концентрации 10 мкл/10 мл суспензии (норма, $C=N$); 1 — импульсного электрического поля (ИЭП), контрольная суспензия; 2 — ИЭП и эсмерон в концентрации 10 мкл/10 мл суспензии ($C=N$); 3 — ИЭП и эсмерон в концентрации 100 мкл/10 мл суспензии ($C=10N$).

Эсмерон — недеполяризующий периферический миорелаксант средней продолжительности действия; блокирует н-холинорецепторы скелетных мышц и препятствует депполяризующему действию ацетилхолина.

Тракриум — недеполяризующий миорелаксант; является конкурентным антагонистом ацетилхолиновых рецепторов постсинаптической мембраны. Вызывает временное расслабление скелетной мускулатуры.

Маркаин-адреналин — местный анестетик амидного типа; обратимо блокирует проведение импульса по нервному волокну за счет влияния на натриевые каналы, оказывает схожие эффекты на возбудимые мембраны в головном мозге и миокарде.

На рис. 1 представлены кинетические кривые для эсмерона, который добавляли в суспензию в концентрациях (C): 10 мкл/10 мл суспензии ($C=N$), 100 мкл/10 мл суспензии ($C=10N$).

Из представленных кинетических кривых следует, что при введении препарата в суспензию в концентрации 10 мкл/10 мл суспензии (нормальная концентрация $C=N$, т. е. то количество препарата, которое используется в клинике при операции) явных изменений не возникает (кривая «0»). Но если проводилось комбинированное воздействие на суспензию эсмерона и ИЭП, то картина менялась: количество препарата, которое используется в клинике при операции, оказывало влияние на мембраны эритроцитов (кривая «3»). Это выражалось в том, что скорость гемолиза эритроцитов при комбинированном воздействии ИЭП и эсмерона в нормальной концентрации возрастала по сравнению с контролем в несколько раз (рис. 4, кривая «1»). Анало-

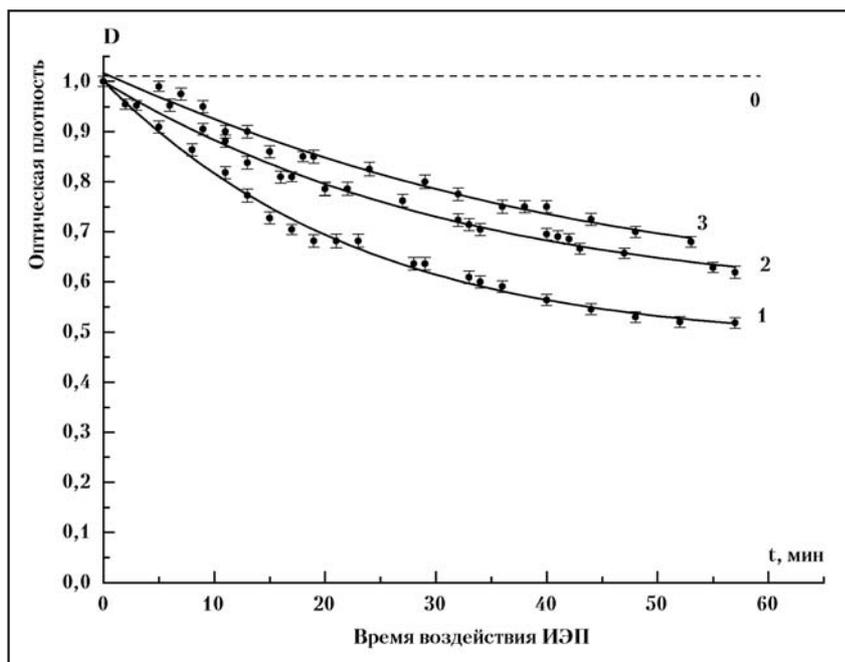


Рис. 2. Кинетические кривые зависимости уменьшения количества эритроцитов после воздействия на суспензию крови.

0 — тракриум в концентрации 10 мкл/10 мл суспензии (норма, $C=N$); 1 — импульсно-электрического поля (ИЭП), контрольная суспензия; 2 — ИЭП и тракриум в концентрации 10 мкл/10 мл суспензии ($C=N$); 3 — ИЭП и тракриум в концентрации 100 мкл/10 мл суспензии ($C=10N$).

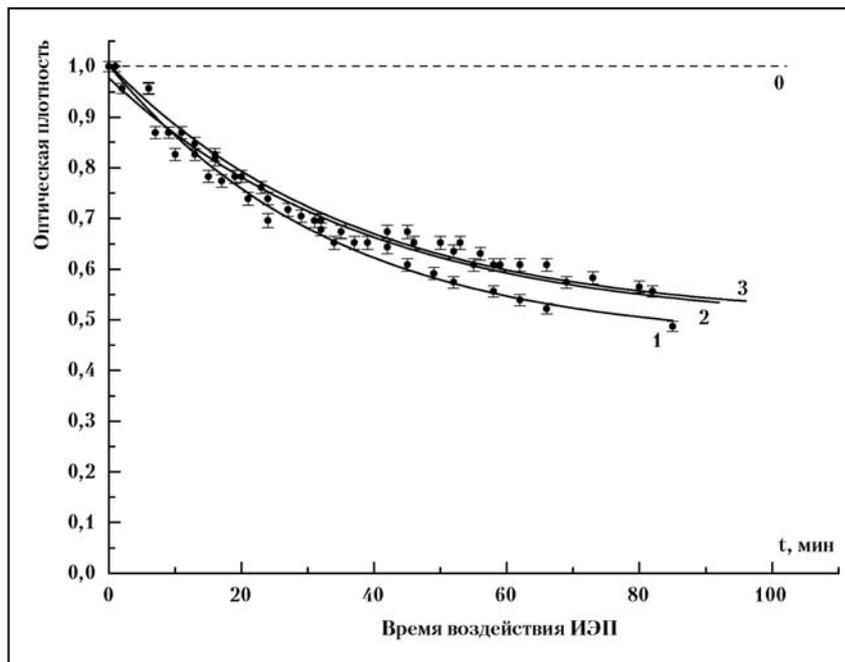


Рис. 3. Кинетические кривые зависимости уменьшения количества эритроцитов после воздействия на суспензию крови.

0 — маркаиин-адреналин в концентрации 8 мкл/10 мл суспензии (норма, $C=N$); 1 — импульсно-электрического поля (ИЭП), контрольная суспензия; 2 — ИЭП и маркаиин-адреналин в концентрации 8 мкл/10 мл суспензии ($C=N$); 3 — ИЭП и маркаиин-адреналин в концентрации 80 мкл/10 мл суспензии ($C=10N$).

гичный эффект возникал и при добавлении эсмерона в более высокой концентрации $C=10N$. При этом относительная константа скорости гемолиза для кривой «1»=1; для кривой «2»=3,9; для кривой «3»=230. Эритроциты,

при добавлении в их суспензию эсмерона в концентрации 100N, гемолизировались самостоятельно, без пробы. При исследовании на ФЭКе такой суспензии, сразу после ее создания, значение оптической плотности было близко к $D=0,6$ (начальное значение оптической плотности равнялось 1).

Другой по характеру эффект был получен при исследовании тракриума (рис. 2).

Тракриум оказал, так называемое, «закрепляющее» действие на мембраны эритроцитов. При комбинированном воздействии ИЭП и тракриума в нормальной концентрации $C=N$ (рис. 2, кривая «2»), гемолиз эритроцитов был замедлен. То же наблюдалось и при концентрации $C=10N$. При этом относительная константа скорости гемолиза для кривой «1»=1; для кривой «2»=0,5; для кривой «3»=0,4. Математический анализ результатов опытов показал, что различия экспериментальных данных на рисунках 1 и 2 статистически значимы.

Влияние маркаиин-адреналина на суспензию эритроцитов отличалось от влияния эсмерона и тракриума: его влияние на мембраны эритроцитов носило нейтральный характер. На рис. 3 приведены кинетические кривые изменения концентрации эритроцитов при комбинированном воздействии маркаиин-адреналина и ИЭП.

Скорость гемолиза эритроцитов, подверженных комбинированному воздействию маркаиин-адреналина и ИЭП, в нормальной концентрации $C=N$ (кривая «2»), и даже в концентрации $C=10N$ (кривая «3»), сравнима со скоростью гемолиза контрольной суспензии. Так, относительная константа скорости гемолиза для кривой «1»=1; для кривой «2»=0,87; для кривой «3»=0,95. Математический анализ полученных экспериментальных данных показал, что различия между кривыми 1, 2 и 3 статистически незначимы. Это может свидетельствовать о том, что маркаиин-адреналин в «нормальной» концентрации не оказывает «скрытого» повреждения на мембраны эритроцитов.

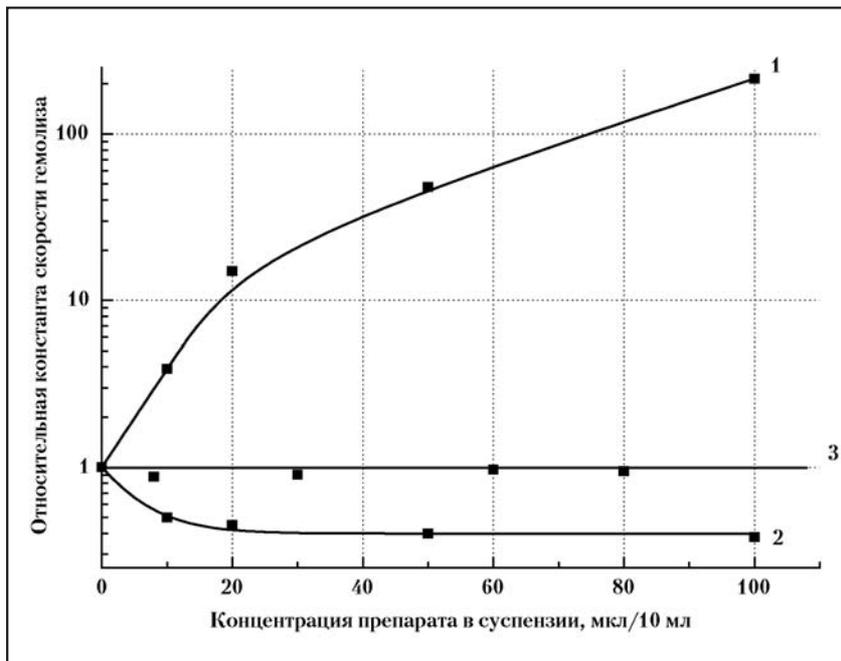


Рис. 4. Зависимость относительной скорости гемолиза эритроцитов от концентрации препарата в суспензии.

1 — для эсмерона; 2 — для тракриума; 3 — для маркаин-адреналина. По оси ординат масштаб логарифмический.

На базе проведенных исследований с эсмероном, тракриумом и маркаин-адреналином были получены зависимости изменения скорости гемолиза эритроцитов от концентрации лекарств в суспензии (рис. 4).

Из рис. 4 следует, что эсмерон в терапевтической концентрации 10 мкл/10 мл суспензии $C=N$ уже вызывал на мембранах эритроцитов скрытые повреждения (кривая «1»): константа скорости гемолиза возрастала в 5 раз. При дальнейшем увеличении концентрации до 10N такая тенденция сохранялась, и константа скорости гемолиза возрастала более, чем в 100 раз. Тракриум в концентрации $C=N$ укреплял мембрану: константа скорости уменьшалась в 5 раз (кривая «2»). При дальнейшем росте концентрации препарата рост константы скорости гемолиза прекращался и до $C=10N$ и её величина сохранялась на прежнем уровне. Маркаин-адреналин не вносил изменения в прочность мембраны в заданном диапазоне концентраций (кривая «3»).

Литература

1. Козлова Е. К., Черняев А. П., Черныш А. М., Алексеева П. Ю. Электропорация — эффективный метод экспресс-диагностики повреждений биологических мембран в результате воздействия физико-химических факторов на эритроциты. Препринт НИИЯФ МГУ — 2005-7/773.
2. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. Acta Physiol. Scand. 2003; 177: 437–447.
3. Козлова Е. К., Черняев А. П., Черныш А. М. и др. Модель кинетики гемолиза эритроцитов при действии пучка электронов и импульсного электрического поля. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрономия 2004; 2: 19–22.
4. Abidor I. G., Li L. H., Hui S. W. et al. Studies of cell pellets: II. Osmotic properties, Electroporation, and related phenomena: membrane interactions. Biophys. J. 1994; 67 (1): 427–435.
5. Genco I., Gliozzi A., Relini A. et al. Electroporation in symmetric and asymmetric membranes Biochim. Biophys. Acta 1993; 1149 (1): 1–18.
6. Kinoshita K., Tsong T. Y. Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field. Proc. Natl. Sci. 1977; 74(5): 1923–1927.

Поступила 23.03.07

В работе использовалось импульсное электрическое поле, которое оказывало модифицирующее действие на мембраны эритроцитов, проявляя при этом «скрытые» эффекты от воздействия лекарственными препаратами. Количество возникающих в мембране пор и их радиус в результате действия ИЭП определяются наведенным трансмембранным потенциалом и пороговым потенциалом электрического пробоя $\phi_{пор}$. Суммарная площадь образовавшихся пор после электропорации определяется величиной $\phi_{пор}$ и средним пороговым потенциалом по всей мембране эритроцита $\phi_{пор ср}$.

Заключение

Из результатов опытов следует, что эсмерон в нормальной концентрации приводил к образо-

ванию скрытых повреждений мембран, а следовательно, к уменьшению $\phi_{пор ср}$. Поэтому наблюдалось увеличение скорости гемолиза эритроцитов (рис. 1, кривая «3»). В свою очередь, тракриум в нормальной концентрации увеличивал $\phi_{пор ср}$, что приводило к уменьшению скорости гемолиза эритроцитов (рис. 4, кривая «2»). А маркаин-адреналин не оказывал влияния на $\phi_{пор ср}$ (рис. 3, кривые «1–3»).

Представленные в данной работе результаты были получены в ходе большого числа экспериментов. Универсальность и относительная простота используемого метода позволяет применять его в дальнейшем в клинической практике, как универсальный метод экспресс-диагностики скрытых повреждений мембран эритроцитов при действии на кровь лекарственных препаратов широкого спектра.