

Разработка методологических основ обнаружения повреждающих воздействий сверхмалых количеств физиологически активных веществ на форменные элементы крови человека

А. С. Полезина, К. А. Аникиенко, В. К. Курочкин

АЛЕВТИНА СЕРГЕЕВНА ПОЛЕЗИНА — кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник Государственного научно-исследовательского института органической химии и технологии (ГУП ГосНИИОХТ). Область научных интересов: физико-химические методы исследования в биоорганической химии, аналитическая химия.

КОНСТАНТИН АЛЕКСАНДРОВИЧ АНИКИЕНКО — доктор химических наук, профессор, руководитель лаборатории ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: физико-химические методы исследования в биоорганической химии, химия физиологически активных веществ.

111024 Москва, шоссе Энтузиастов, 23, ГУП ГосНИИОХТ, тел. (095) 273-87-19, факс (095) 273-87-19, (095) 273-22-18.

Проблема физиологического воздействия сверхмалых количеств внешних повреждающих факторов чрезвычайно актуальна, поскольку в наше время остро встали вопросы о возможности жизни людей, животных и растений в экстремальных экологических ситуациях (химическая загрязненность, повышенная радиация, недостаток воды и т.д.). Интерес к этой проблеме обусловлен еще и тем, что накапливается все больше данных о существенном влиянии на здоровье человека потенциально токсичных соединений на уровне весьма низких концентраций. Под понятием «низкие концентрации» для физиологически активных веществ (ФАВ) с небольшой молекулярной массой (не более 1000) мы подразумеваем область концентраций ниже 10^{-9} М.

Цель наших исследований — создание методологии раннего обнаружения повреждающего воздействия сверхмалых количеств ФАВ на клетки крови человека.

Известно, что клетка является сложной взаимосвязанной системой. Нарушение какой-нибудь одной ее части или структуры редко остается ограниченным, оно генерализуется и проявляется в разнообразных формах: морфологического, физиологического, биохимического характера [1].

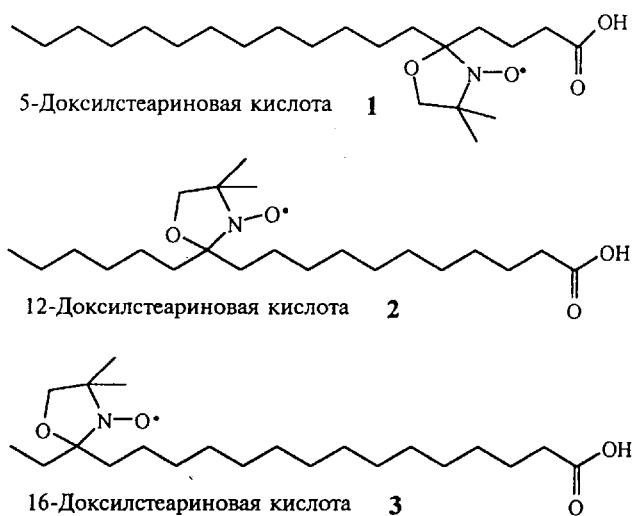
Исследования по обнаружению эффектов воздействия ФАВ на клетки крови проводили в двух направлениях: выявление признаков повреждения структуры клеточных мембран и изучение влияния веществ на функциональные свойства клеток. В качестве биообъектов были выбраны форменные элементы крови человека — эритроциты, тромбоциты, лимфоциты [4–6]. Отметим, что эритроциты хорошо изучены и широко используются как модельные системы в биологических исследованиях [4].

Повреждение структуры клеточных мембран

О повреждении структуры клеточных мембран под влиянием внешних факторов можно судить по таким признакам, как структурные перестройки липидного бислоя мембраны, конформационное состояние мембранных белков, изменения липидного состава и проницаемости мембран.

Структура мембран интактных эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов и структурные перестройки липидной области мембран под воздействием ФАВ. Для изучения структурного состояния биологических мембран успешно применяется спектроскопия электронного парамагнитного резонанса [2, 3]. С использованием спиновых зондов — стабильных нитроксильных радикалов, вводимых в исследуемую биосистему в незначительном количестве (10^{-5} – 10^{-4} М), можно фиксировать слабые изменения биофизических параметров клеточных мембран как при их нормальном функционировании, так и в случае химических и физических воздействий.

В нашей работе для проведения ЭПР-спектроскопических измерений применялся целый набор спиновых зондов: на основе стеариновой кислоты — ее 5-, 12-, 16-доксильные производные (1, 2, 3); на основе стероидов — 3-доксиландростан (4) и 3-доксилхолестан (5). В качестве гидрофильного зонда использовали нитроксильный радикал ТЕМПО (6). Спектры фиксировали на радиоспектрометре Е-4 фирмы «Вариан» и спектрометре АСНИ-ЭПР (разработка и изготовление ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова).



Основные ЭПР-параметры спиновых зондов в эритроцитарной мембране (м), телях (т), обезжиренных телях (обж. т), липосомах (л) и липопротеиновом (альбуминовом) комплексе (альб.)

Зонд	r , Å	τ_m , 10^{-1} с	$S_{m(t)}$	S_{\perp}	$S_{обж.т}$	$S_{альб.}$
5	1—3	27,5	0,24	0,22	—	0,85
1	5—7	45,0	0,65	0,54	0,85	0,80
2	14—17	30,0	0,35	—	0,81	0,79
3	18—25	15,0	0,17	0,16	—	0,71
6	0—1	1,25	0,065	—	—	—
4	—	$\tau_{\perp} \approx 15,0$ $\tau_{\parallel} \approx 33,0$	$S_{\perp} \approx 0,17$ $S_{\parallel} \approx 0,60$	0,13	0,90	0,83

* Расстояние по глубине мембраны от поверхности раздела липид-вода до зоны локализации зонда.

Значения параметров ЭПР-зондов в мембранных образованиях эритроцитов приведены в табл. 1.

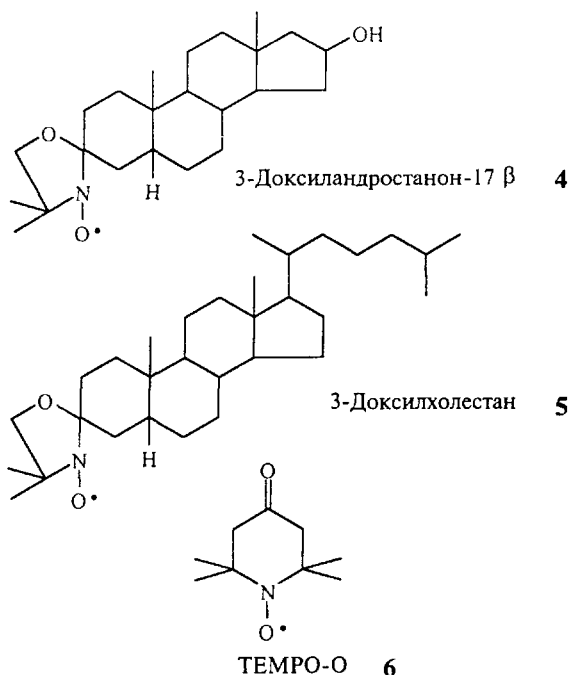
Анализируя данные табл. 1, можно заметить, что для зондов на основе стеариновой кислоты в мембране и липосомах значения τ и S тем больше, чем ближе к поверхности мембраны расположен доксилный фрагмент молекулы-зонда. Так, зонд 1, вероятно, в гораздо большей степени взаимодействует с липосомами, чем зонд 3 (что следует из значений параметров $S_{m(t)}$).

В спектрах ЭПР зонда 3 в эритроцитарной мембране иногда наблюдается интенсивный анизотропный сигнал с A_{\max} до 30 Э, относящийся к параллельной относительно плоскости мембраны ориентации молекулы зонда. Такие анизотропные сигналы изредка наблюдаются в спектрах радикала 2, но более они характерны для 4. Вероятно, этот факт связан с процессом перестройки клеточной мембраны в зависимости от индивидуального состояния клеточной мембраны. В результате молекула зонда, попадая в сферу влияния интегральных белков, приобретает предпочтительно параллельную относительно плоскости мембраны ориентацию и при этом располагается не на ее поверхности, а на некоторой глубине, о чем свидетельствует значение $h_{\perp} = 0,5$ для зонда 3. Один из механизмов такого перехода зонда может быть связан с погружением некоторых белков в глубь мембраны.

На основании статистического анализа полученных экспериментальных данных, который заключался в расчете средних значений параметров S и τ и среднеквадратичных их отклонений для различных партий эритроцитов, взятых от разных доноров (табл. 2), была проведена оценка равнозначности измерений средних показателей в партиях [7, 8].

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что относительная погрешность измерения параметра S меньше, чем при измерении τ .

Основные параметры зондов, встроенных в мембраны эритроцита, тромбоцита, лимфоцита, приведены в табл. 3. Анализ этих данных позволяет дать сравнительную оценку биофизических свойств мембран интактных клеток крови. Из величин S_{\perp} для зонда 1 следует, что мембрана тромбоцитов в области от 1—6 Å (по глубине) имеет большую жесткость, чем мембраны других клеток. Более глубокие области мембран у всех клеток примерно одинаковы по жесткости.



На рис. 1 в качестве примера приведен спектр радикала 3-доксиландростана в мембранах клеток крови.

На основании спектров рассчитывали основные параметры зондов:

τ — время корреляции вращательной диффузии N-O-группы зонда (показатель микровязкости мембраны),

S — показатель упорядоченности движения зонда, характеризующий подвижность жирнокислотной цепи молекулы зонда (показатель жесткости мембраны);

компоненты S_{\perp} и S_{\parallel} — показатели упорядоченности движения зонда при перпендикулярной и параллельной ориентации относительно плоскости мембраны,

$1/h$ — полярность, характеризующая степень гидрофобности участка мембраны в области локализации зонда.

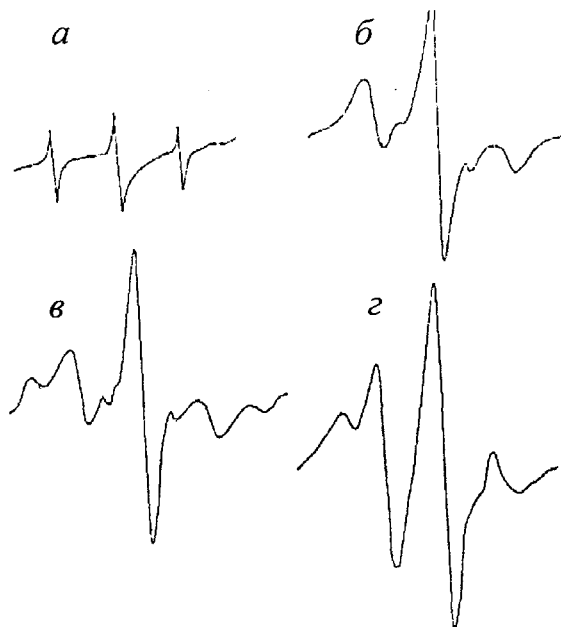


Рис. 1. ЭПР-спектры радикала 3-доксиландростана в фосфатном буферном растворе (а) и встроенного в мембрану эритроцитов (б), тромбоцитов (в) и лимфоцитов (г)

Таблица 2

Расчетные значения ЭПР-параметров S и τ для зондов, встроенных в мембраны эритроцитов

Зонд	Среднее значение		Среднеквадратичное отклонение		Относительная погрешность, %	
	S	$\tau, 10^{-10} \text{ с}$	S	$\tau, 10^{-10} \text{ с}$	S	τ
1	0,655	—	0,007	—	1,09	—
2	0,333	—	0,178	—	7,86	—
3	0,166	15,9	0,007	1,5	4,75	11,7
4	0,17 (S_1)	15,2 (τ_1)	0,015 (S_1)	2,1 (τ_1)	9,6 (S_1)	13,9 (τ_1)
	0,600 (S_{II})	—	0,045 (S_{II})	—	8,0 (S_{II})	—

Развитие молекулярной патологии мембран под влиянием различных повреждающих факторов протекает по разным механизмам и может реализоваться в результате антирецепторного, либо антиферментативного действия, либо прямого цитотоксического действия, вызывающего повреждение липидной матрицы мембраны.

Известно, что в состав клеточных мембран эритроцитов входят М-холинорецептор и ацетилхолинэстераза [9, 18]. Исходя из этого в своих исследованиях в качестве химических агентов, повреждающих мембраны клеток крови человека, мы использовали три типа веществ:

1) блокаторы М-холинорецепторов — 3-хинуклидилбензилат и его аналоги,

2) ингибиторы ацетилхолинэстеразы — фосфорорганические ингибиторы, в частности тиохолинфосфонат, и производные 6-метилурацила (вещества К-1, К-2, К-4) [19],

3) фосфолипиды — вещества типа фактора активации тромбоцитов.

При выборе этих сильнодействующих ФАВ мы руководствовались также тем, чтобы получить достоверно значимые отклики мембраны на их воздействие в интервале концентраций 10^{-15} – 10^{-4} М.

Результаты ЭПР-спектроскопических исследований мембран эритроцитов, инкубированных с растворами ФАВ, (рис. 2) отчетливо свидетельствуют о структурных перестройках в липидной области мембраны, причем обнаруживаются дозозависимые изменения прочностных характеристик мембраны под влиянием испытуемых ФАВ.

В случае 3-хинуклидилбензилата наблюдаются положительные отклонения от контроля (без участия ФАВ) значений показателя жесткости мембраны (параметра S), т.е. мембрана эритроцита становится более структурированной и упорядоченной. Наоборот, под воздействием фактора активации тромбоцитов

мембрана разупорядочивается (отрицательные изменения параметра S по сравнению с контролем).

При этом концентрационные зависимости обнаруживают поли- и бимодальный характер — с понижением концентрации вещества отклик мембраны уменьшается, а затем вновь растет и по величине становится сравнимым с первым откликом. Изменение структуры клетки фиксируется уже при сверхмалой концентрации действующего вещества 10^{-15} М. Каждое вещество имеет свой спектр концентрационной зависимости с максимумом отклика при определенной концентрации.

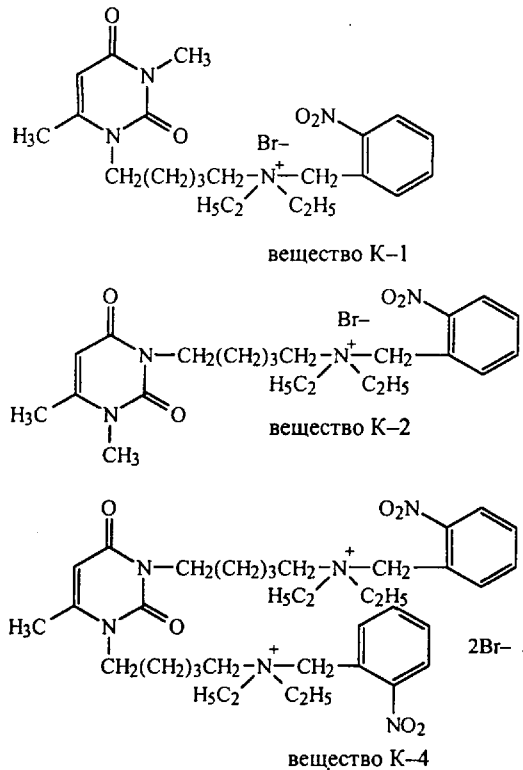


Рис. 2 показывает также изменение микровязкости мембраны эритроцита под воздействием ФАВ (изменение характеристики τ). Соответствующие кривые сохраняют полимодальный вид. Сопоставление зависимостей, представленных на рис. 2а и 2б, позволяет предположить, что наблюдаемые изменения жесткости и микровязкости мембраны клетки обусловлены взаимодействием 3-хинуклидилбензилата с М-холинорецептором эритроцитов.

Таблица 3

Основные ЭПР-параметры спиновых зондов в мембране тромбоцитов (т), эритроцитов (э), лимфоцитов (л) (37 °С)

Зонд	S_{II}			S_1			τ_1		
	т	э	л	т	э	л	т	э	л
1	—	—	—	0,800±0,008	0,650±0,007	0,670±0,014	—	—	—
2	0,760±0,060	0,350±0,016	—	0,14±0,01	—	—	16,4±1,8	—	—
3	0,75±0,06	—	0,70±0,05	0,200±0,02	0,17±0,01	0,16±0,15	25,0±2,9	15,0±1,75	20,6±2,4
4	0,87±0,07	0,60*	0,80±0,06	0,18±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01	22,5±3,1	18,0±2,5	13±1,8

* Компонента S_{II} проявляется нерегулярно.

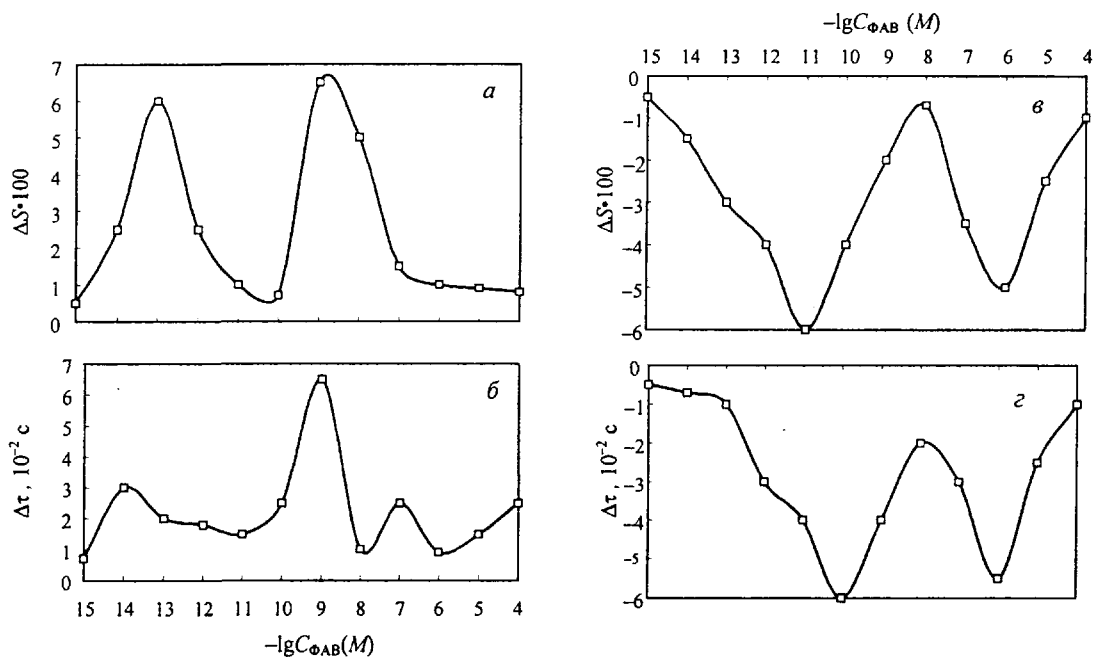


Рис. 2. Изменение жесткости (а, б) и микровязкости (б, г) эритроцитарной мембраны (соответственно параметров ΔS и $\Delta \tau$ ЭПР-зонда) под воздействием ФАВ (10^{-4} – 10^{-15} М):

а, б — 3-хинуклидилбензилат; в, г — фактор активации тромбоцитов

Максимум эффекта (изменение S и τ) проявляется при концентрации 3-хинуклидилбензилата $\sim 10^{-9}$ М, что соответствует значению константы диссоциации комплекса его с М-холинорецептором эритроцита, $(1 \div 7) \cdot 10^{-9}$ М [9].

О специфическом характере связывания вещества с рецептором свидетельствует чувствительность отклика мембраны на стереоизмерию вещества. Для R-стереоизомера 3-хинуклидилбензилата концентрация, соответствующая максимальному отклику, равна

$5 \cdot 10^{-10}$ М, для рацемата — $1 \cdot 10^{-9}$ М, а для S-изомера — $8,3 \cdot 10^{-9}$ М. В такой же последовательности снижается их холинолитическая активность.

Чтобы определить участок мембраны эритроцита, на котором происходят наибольшие структурные изменения при воздействии изучаемых веществ, мы сняли с помощью ЭПР-зондов профиль изменения жесткости и полярности мембраны по ее глубине (рис. 3).

Из рис. 3а видно, что наибольшее увеличение жесткости под воздействием 3-хинуклидилбензилата наблюдается вблизи поверхности мембраны, на глубине 3–6 Å, при влиянии тиохалинфосфоната — в средней части мембраны, на глубине 7–18 Å. Фактор активации тромбоцитов, напротив, разжижает мембрану в большей степени в поверхностном слое, на глубине 3–5 Å, в этой же области мембраны наблюдается увеличение ее полярности.

Аналогичные исследования структурного состояния мембраны тромбоцита под воздействием изучаемых ФАВ (рис. 4) показали, что все изучаемые вещества разупорядочивают мембрану, снижая ее жесткость, о чем свидетельствуют отрицательные отклонения параметра S ЭПР-зонда от контроля.

Кроме изменений в микровязкости и жесткости липидной компоненты были обнаружены существенные сдвиги в термоиндуцируемых структурных переходах, вызванных действием тиохалинфосфоната.

Мембрана эритроцита имеет жидкокристаллическую структуру с участками плавления при 35–41 °С (область физиологических температур) и при 21–26 °С. Под воздействием фактора активации тромбоцитов в концентрации 10^{-11} М температурный диапазон первого участка плавления увеличивается, а переход 21–26 °С полностью исчезает, при этом термографическая кривая смещается в область более низких температур.

Поскольку известно, что определенные фазовые состояния липидного бислоя и функционирование включенных в состав мембраны клетки рецепторов и

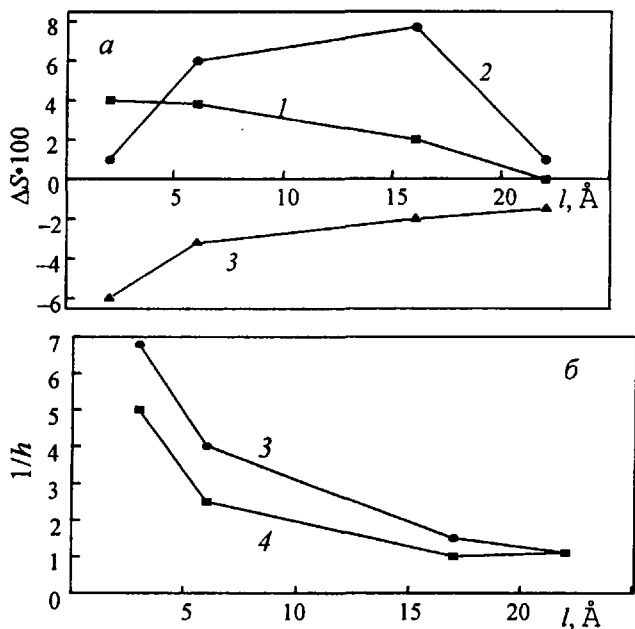


Рис. 3. Профиль изменения жесткости (ЭПР-параметр ΔS) и полярности (б) эритроцитарной мембраны по ее глубине при воздействии ФАВ:

1 — 3-хинуклидилбензилат (10^{-9} М); 2 — тиохалинфосфонат (10^{-8} М); 3 — фактор активации тромбоцитов (10^{-11} М); 4 — интактная мембрана

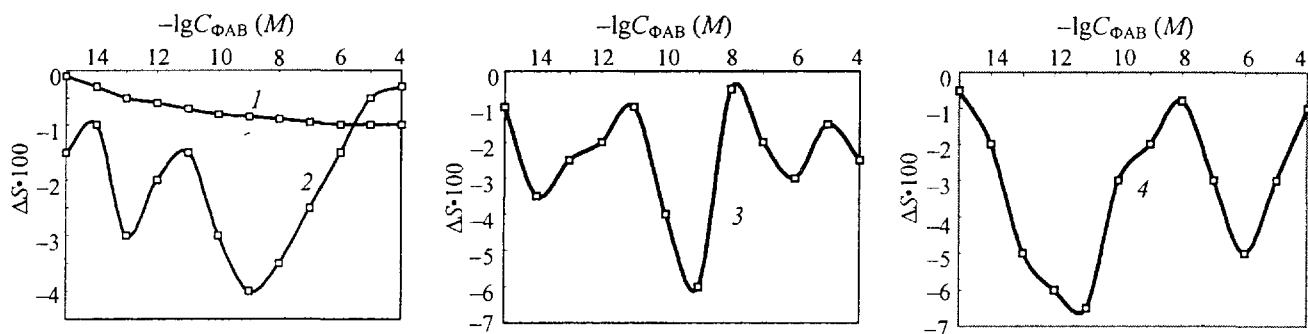


Рис. 4. Изменение жесткости мембраны тромбоцитов под воздействием ФАВ (10^{-4} – 10^{-15} M):

1 — 3-хинуклидилбензилат; 2 — МАК-30 (производное хинуклидина), R-изомер; 3 — тиохолинфосфонат; 4 — фактор активации тромбоцитов

ферментов взаимосвязаны [20], то не исключено, что исчезновение указанных переходов при действии ФАВ может являться свидетельством нарушения процессов метаболизма в клетке.

Конформационное состояние белковой компоненты эритроцитарной мембраны. Повреждающее действие ФАВ непосредственно на белки эритроцитарной мембраны изучены методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ЭПР-зонды фиксируют структурные изменения в липидной матрице мембраны).

Опыты по изучению конформационного состояния белковой компоненты эритроцитарной мембраны проводили на сканирующем микрокалориметре отечественного производства ДАСМ-1М.

Рис. 5 иллюстрирует влияние ФАВ на термопереходы в мембране эритроцита.

Для интактных эритроцитов на калориметрических кривых наблюдается три необратимых термоперехода разной интенсивности, обусловленных тепловой денату-

рацией мембранных белков эритроцитов [10]: А—переход при 51,5–52 °С, белок спектрин, В—переход при 54,5–55,5 °С, белки полосы 2,1; 4,1; 4,2; 5 (анкирин, актин), С—переход при 62,0–63,5 °С, белки канала анионного обмена. Под воздействием ФАВ в сверхмалых дозах снижается интенсивность пика высокотемпературного перехода (С) вследствие денатурации белков анионного обмена. Температура перехода снижается незначительно: при воздействии 3-хинуклидилбензилата — на 0,5 °С, фактора активации тромбоцитов и ингибитора ацетилхолинэстеразы и К-4 — на 1 °С.

Следует отметить, что вещество К-4 существенно повреждает мембрану эритроцита уже в концентрации 10^{-13} M, вызывая деформацию цитоскелета клетки. Об этом свидетельствуют эффекты как термодестабилизации белка спектрина, так и уменьшения энтальпии С-перехода примерно в два раза и снижения максимума пика на 0,8–1 °С. Особенность действия вещества К-4 заключается в том, что с ростом его концентрации интенсивность пика, соответствующего С-переходу, возрастает, тогда как для вещества К-1 интенсивность пика монотонно убывает. Выявленная аномалия для веществ К-4, а также К-2 (гиперболический характер концентрационной зависимости интенсивности пика) свидетельствует о сложном механизме их действия. Аналогичные результаты получены и на тромбоцитах.

Воздействие на тромбоциты сверхмалых доз фактора активации тромбоцитов (10^{-13} – 10^{-11} M) вызывает термодестабилизацию белковой компоненты мембраны.

Проницаемость мембраны эритроцитов в условиях воздействия ФАВ. Выявленные повреждения мембранных белков анионного обмена под воздействием ФАВ в сверхмалых дозах, по-видимому, должны отразиться на проницаемости мембраны. При изучении данного эффекта в качестве критерия нарушения проницаемости мембраны принимают увеличение утечки ионов K^+ из клетки и поступление в клетку веществ, для которых в нормальных условиях клеточная мембрана практически непроницаема (маркером повреждения в данном случае используется сахароза или сорбит) [11].

Эксперименты проводились на иономере РНМ-250 фирмы «Радиометр» с ионоселективными электродами F2312 (K) для определения катиона K^+ и F2112 (Ca) — для катиона Ca^{2+} . В качестве сравнительных электродов использовали, соответственно, электрод К-701 (двухмостиковый, внутренний раствор — насыщенный раствор KCl, наружный — физиологический раствор)

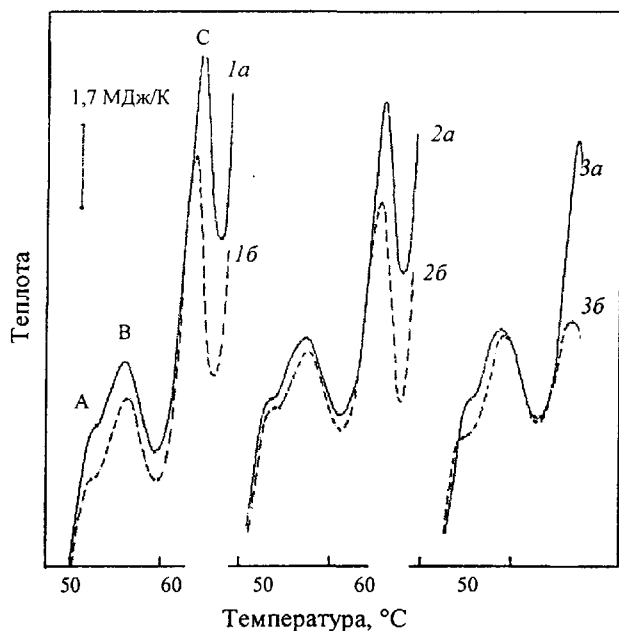


Рис. 5. Калориметрические кривые тепловых переходов в мембранах интактных эритроцитов (a) и инкубированных с ФАВ (б):

1 — фактор активации тромбоцитов (10^{-11} M); 2 — 3-хинуклидилбензилат (10^{-9} M); 3 — ингибитор ацетилхолинэстеразы К-4 (10^{-13} M)

Таблица 4

Выход катионов K^+ и Ca^{2+} из эритроцитов во внеклеточное пространство при воздействии ФАВ ($10^{-9} M$)

Эритроцитарная взвесь в физиологическом растворе 20%-ная; время экспозиции с ФАВ 60 мин, 37 °С

ФАВ	Выход катионов, отн. ед. (опыт/контроль)		Расчетная формула*
	K^+	Ca^{2+}	
Фактор активации тромбоцитов	1,3	1,1	1
	1,0	1,0	2
Блокатор М-холинорецептора — вещество 507 (R-изомер)	1,0	0,7	1
	1,0	0,4	2
Ингибитор ацетилхолинэстеразы ГД-42	1,2	1,3	1
	1,0	1,6	2
Ингибитор ацетилхолинэстеразы МАК-30	1,0	1,3	1
	1,0	1,8	2

$$* [C_i^{оп} - (C_i^к - C_o^к)] / C_o^{оп} \quad (1)$$

$$(C_i^{оп} - C_o^{оп}) / (C_i^к - C_o^к) \quad (2)$$

где верхние индексы «оп» и «к» обозначают концентрации ионов соответственно в опыте и в контроле (без ФАВ); нижние индексы «i» и «o» — концентрации соответственно на момент времени t и в начале опыта.

и каломельный электрод (заполнен насыщенным раствором KCl).

Специальная программа иономера позволяла осуществлять одновременный анализ содержания K^+ и Ca^{2+} в контролируемом физиологическом растворе. Результаты опытов представлены в табл. 4. Прослеживается особенность воздействия каждого типа изучаемого вещества на ионную проницаемость эритроцитарной мембраны. Так, например, фактор активации тромбоцитов и ингибитор ацетилхолинэстеразы ГД-42 ускоряют выход K^+ из клетки, а блокатор М-холинорецепторов — вещество 507 практически не влияет на этот процесс.

Наибольшее влияние на выход Ca^{2+} оказывают вещества МАК-30 и ГД-42, они заметно увеличивают поток ионов Ca^{2+} во внеклеточную среду. Эффект вещества ГД-42 в отношении проницаемости эритроцитарной мембраны безусловно связан с ингибированием мембранной ацетилхолинэстеразы. Вещество 507, наоборот, существенно уменьшает выход Ca^{2+} . По-видимому, этот эффект можно объяснить высоким сродством вещества 507 к М-холинорецептору. Таким образом, довольно четко выявляются различия механизмов действия на эритроциты ингибиторов ацетилхолинэстеразы и блокаторов М-холинорецепторов.

В случае воздействия фактора активации тромбоцитов выход ионов Ca^{2+} из клетки увеличивается незначительно.

Проницаемость мембраны в условиях воздействия фактора активации тромбоцитов контролировали также по сахарозному критерию. Для этого измеряли

время 50%-ного достижения термогемолита под воздействием вещества ($10^{-6} M$) в присутствии сахарозы и без ее участия. Установлено, что в присутствии сахарозы время достижения термогемолита (50%) увеличивается с 36 мин до 50 мин. Сахароза входит в клетку и препятствует выходу гемоглобина.

Влияние ФАВ на липидный состав мембраны эритроцитов. Эксперименты включали следующие операции: инкубацию суспензии эритроцитов с ФАВ, выделение эритроцитов по методике [12], экстракцию липидов по методике [13] и количественный анализ состава липидных фракций с помощью тонкослойной хроматографии с последующим сканированием хроматограммы на денситометре CS-9301 РС фирмы «Шимадзу».

В опытах при инкубации суспензии эритроцитов с растворами ФАВ от 2 мин до ~ 60 мин, как правило, наблюдались колебания в содержании одних и тех же липидных фракций в пределах указанного временного интервала экспозиции. Примерно через 60 мин этот «колебательный процесс» заканчивается и далее регистрируется характерное для данной концентрации каждого ФАВ изменение содержания липида (относительно контроля — без ФАВ) (табл. 5).

Из таблицы видно, что при воздействии ФАВ липидный состав мембраны существенно меняется. Так, фактор активации тромбоцитов, $10^{-11} M$ и МАК-30 (R), $10^{-15} M$ вызывают аналогичное изменение содержания фосфатидилсерина (2,82 и 2,00), фосфатидилглицерола (0,75 и 0,44), холестерина (0,95 и 1,01), в то же время по другим липидам наблюдаются заметные различия. По-видимому, сходство можно объяснить тем, что МАК-30 (R) является сильным антагонистом фактора активации тромбоцитов, т.е. они имеют одинаковый участок для связывания с мембраной, в роли которого, по данным дифференциальной сканирующей калориметрии, могут выступать белки каналов анионного транспорта.

Сравнительные эксперименты по изучению влияния на липидный состав мембраны эритроцита кальциевого ионофора А-23187 и вещества МАК-30 (R-изомер) в интервале концентраций 10^{-15} — $10^{-5} M$ показали, что вещество МАК-30, по-видимому, также взаимодействует с участками эритроцитарной мембраны в районе расположения канала транспорта ионов Ca^{2+} , что отражается в симбатном характере изменения содержания фосфатидилсерина и фосфатидилинозита (рис. 6).

Таблица 5

Изменение липидного состава мембраны эритроцитов (в отн. ед., опыт/контроль) после часовой экспозиции с ФАВ (25 °С)

Липид	фактор активации тромбоцитов ($10^{-11} M$)	Воздействующее ФАВ			
		507 ($10^{-9} M$)	МАК-30 ($10^{-9} M$)	МАК-30 ($10^{-15} M$)	МАК-42 ($10^{-9} M$)
Сфингомиелин	1,03	0,78	0,64	0,58	1,05
Фосфатидилхолин	1,02	0,94	1,23	1,26	1,47
Фосфатидилсерин	2,82	1,24	1,72	2,00	0,50
Фосфатидилэтаноламин	0,85	0,98	1,48	1,67	1,04
Фосфатидилглицерол	0,75	1,12	0,77	0,44	0,94
Холестерол	0,95	1,51	0,91	1,01	0,79

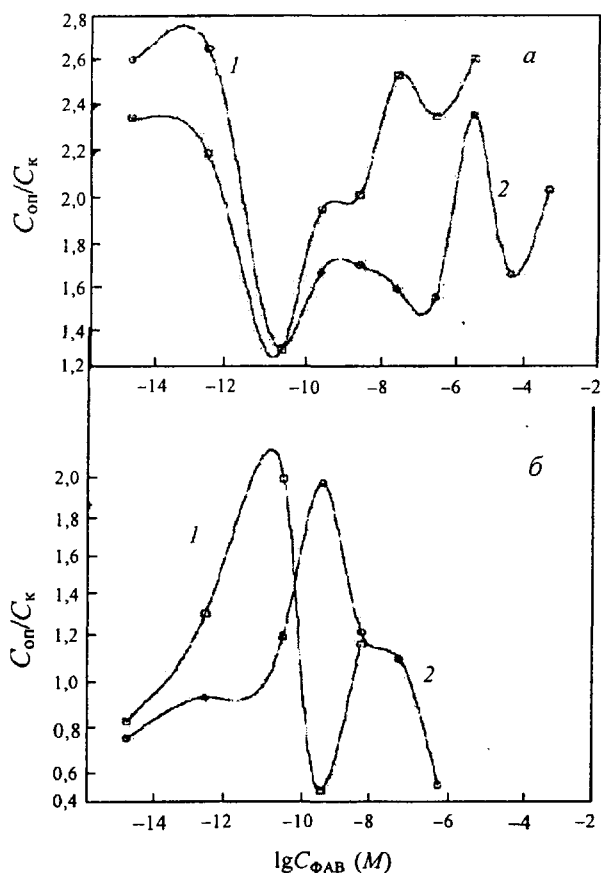


Рис. 6. Изменение содержания фосфатидилсерина (а) и фосфатидилинозита (б) в мембране эритроцитов под действием кальциевого ионофора А-23187 (1) и вещества МАК-30 (2)

Изменение функциональных свойств тромбоцитов и эритроцитов

Агрегация тромбоцитов. Одним из показателей влияния ФАВ на функциональные свойства клетки может служить изменение скорости процесса агрегации тромбоцитов и радиуса агрегатов. В качестве индукторов агрегации использовали тромбин, АДФ, фактор активации тромбоцитов, адреналин, взятых в концентрации, вызывающей максимальную агрегацию.

Следует отметить, что все изучаемые физиологически активные вещества агрегации не вызывают, но влияют на тромбоцитагрегирующую активность индукторов. Так, вещество 3-хинуклидилбензилат в интервале концентрации 10^{-12} — 10^{-7} М тормозит агрегацию, индуцируемую адреналином на 30%, а АДФ — на 10%.

Активное антитромбоцитагрегирующее действие оказывает вещество МАК-30 (R-изомер). Оно снижает агрегацию, вызываемую всеми используемыми в данном исследовании индукторами: в меньшей степени адреналином, в большей — АДФ и практически на 100% тормозит индуцируемую фактором активации тромбоцитов и тромбином (рис. 7). Индекс IC_{50} антитромбоцитагрегирующей активности МАК-30(R-изомера) по тромбину и фактору активации тромбоцитов равен $1 \cdot 10^{-11}$ М, что относит это вещество в разряд активных антагонистов фактора активации тромбоцитов. Обращает на себя внимание факт влияния стереоизомерии на антитромбоцитагрегирующий эффект вещества МАК-30. Так, по сравнению с R-изомером S-изомер оказывает слабое действие на индуцируемую агрегацию — положе-

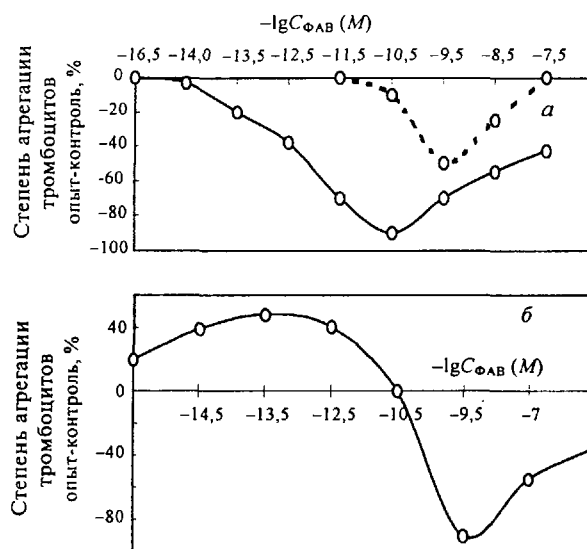


Рис. 7. Влияние на индуцированную агрегацию тромбоцитов веществ МАК-30 (а, сплошная кривая — R-изомер, пунктир — S-изомер) и К-4 (б).

Индукторы агрегации: фактор активации тромбоцитов, 10^{-6} М (а) и тромбин (б)

ние максимума агрегации сдвинуто в область более высоких концентраций ($IC_{50} = 3 \cdot 10^{-9}$ М).

Ингибитор ацетилхолинэстеразы К-4 практически не влияет на агрегацию, индуцируемую адреналином и АДФ, но снижает ее в случае индуцирования фактором активации тромбоцитов во всем исследованном интервале концентраций примерно на 20%. При индуцировании тромбином вещество К-4 в сверхнизких концентрациях (10^{-9} — 10^{-13} М) усиливает агрегацию, а при более высоких концентрациях — тормозит ее.

Модулирующее действие ФАВ на функциональную цитотоксическую активность тромбоцитов. Известно, что функциональная (цитотоксическая) активность тромбоцитов обусловлена их способностью секретировать цитотоксические белки, оказывающие литическое действие на опухолевые клетки-мишени [14]. Нами проведено сравнительное исследование цитотоксических свойств интактных и активированных под действием ФАВ тромбоцитов (табл. 6).

Таблица 6

Индекс цитотоксической активности (ИЦА) тромбоцитов после инкубации с ФАВ

ФАВ	Концентрация, М	ИЦА, отн.ед.	
Фактор активации тромбоцитов	Контроль	$8,0 \pm 1,5$	
	10^{-12}	10 ± 5	
	10^{-11}	12 ± 6	
	10^{-10}	14 ± 2	
	10^{-9}	18 ± 3	
	10^{-8}	$9 \pm 0,5$	
МАК-30	Контроль	$10 \pm 3^*$	$10 \pm 3^*$
	10^{-6}	$12,5 \pm 1,5$	10 ± 3
	10^{-5}	15 ± 2	9 ± 5
	10^{-4}	20 ± 3	11 ± 2
	10^{-3}	18 ± 2	11 ± 2
3-Хинуклидилбензилат	Контроль	7 ± 1	
	10^{-3}	9 ± 3	
	10^{-2}	10 ± 2	
	$3 \cdot 10^{-2}$	8 ± 4	
	10^{-1}	11 ± 3	

* Первый столбец значений — для R-изомера, второй столбец — для S-изомера.

Активность тромбоцитов определяли по цитотоксическому тесту [15].

Как следует из представленных результатов, фактор активации тромбоцитов оказывает наибольшее достоверное стимулирующее действие на цитотоксичность тромбоцитов в концентрации 10^{-9} М. Цитотоксический эффект по отношению к тромбоцитам 3-хинуclidилбензилата, R- и S-изомеров вещества МАК-30 в низких концентрациях не изучался.

Нарушение гемолиза эритроцитов. Напомним, что процесс гемолиза проходит в две стадии: 1) связывание вещества с клеточной мембраной; 2) конформационная перестройка, приводящая к разрыву клетки. Гемолитическую активность вещества характеризуют количеством связанного с клеткой этого вещества, вызывающего разрушение 50% эритроцитов в испытуемой пробе.

В основе использованной нами методики экспериментальной оценки гемолитической активности лежит выражение [17]:

$$D = D_f + D_m(V/V_m)$$

где D — количество вещества, вводимого в суспензию эритроцитов; D_f — количество вещества, не связанного с клеткой; D_m — количество мембраносвязанного вещества, вызывающее гемолиз; V/V_m — гематокрит, отношение объема эритроцитов к общему объему суспензии.

При заданном количестве вводимого в суспензию клеток вещества, изменяя отношение V/V_m , измеряют количество D_f и соответственно D_m [17].

В табл. 7 приведены характеристики гемолитической активности некоторых изученных ФАВ.

Таблица 7

Параметры гемолиза эритроцитов, вызываемого действием ФАВ

ФАВ	D_f^{50}, M	D_m^{50}, M	$1/D_m^{50}$	K^{50}
Фактор активации тромбоцитов	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$7,0 \cdot 10^{-4}$	1430	175
МАК-30 (R-изомер)	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	450	630
3-Хинуclidил-бензилат	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$4,0 \cdot 10^{-2}$	25	800

$K^{50} = D_m^{50} / D_f$ — средство вещества к мембране.

Следует отметить, что гемолитическая активность представленных в табл. 7 соединений пропорциональна индексу цитотоксической активности тромбоцитов, полученному при воздействии на них данных веществ (см. табл. 6).

Изучаемые вещества в концентрации ниже 10^{-7} М гемолиза клетки не вызывали.

Заключение

Результаты представленной работы позволяют сделать следующие обобщения. Повреждающее воздействие физиологически активных веществ в сверхмалых дозах проявляется в изменении структуры мембран клеток эритроцитов и тромбоцитов и сопровождается изменениями их физико-химических свойств (микровязкости, жесткости, полярности), нарушением термоустойчивости мембранных белков, ответственных за стабилизацию цитоскелета, изменением фос-

фолипидного состава, нарушением проницаемости мембраны. Изученные ФАВ в широком интервале концентраций не индуцируют агрегацию тромбоцитов, а в малых и сверхмалых количествах (10^{-11} – 10^{-13} М) сами агрегацию не вызывают, но изменяют индуцированную агрегацию тромбоцитов. Вещество К-4 в концентрации 10^{-13} М существенно повреждает мембрану эритроцита, вызывая деформацию цитоскелета клетки.

Эти положения могут составить основу методологического подхода обнаружения повреждающего действия ФАВ, который может быть использован для скрининг-отбора и изучения механизма действия лекарственных препаратов.

В проведении экспериментальных исследований и обсуждении результатов работы принимали участие сотрудники ГосНИИОХТ: И.Н. Голубев, В.А. Беликов, Т.А. Медведева, В.Б. Форов, С.П. Мамонтов, А.Н. Медведев, А.В. Кшняйкина, Н.Ю. Анисимова, Л.А. Белова.

Авторы выражают признательность И.Л. Михалевой и Д.М. Панкову за предоставление образцов синтезированных ими физиологически активных веществ.

Работа выполнена при технической и финансовой поддержке Международного научно-технического центра и Министерства науки и технологий РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никольский Н.Н. В сб.: Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия. Л.: Ин-т цитологии АМН СССР, 1977, с. 23–25.
2. Берлинер А.Н. Метод спиновых меток. Теория и применение. М.: Наука, 1979.
3. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. М.: Наука, 1976.
4. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск, 1981.
5. Кузнецов В.А., Миконян С.Г., Юркин В.А. Биол. мембраны, 1988, т. 5, с. 3.
6. Воложин А.И., Сашкина Т.И., Савченко З.И. Иммуниет, типовые формы его нарушения и принципы коррекции. М.: 1993, с. 23–25.
7. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976.
8. Шеффе Г. Дисперсионный анализ. М.: Наука, 1963.
9. Besing B., Spira F., Schatz H. e. a. Pharmacopsychiatry, 1986, v. 19, № 4, p. 302–303.
10. Davio S.P., Low P.S. Biochemistry, 1982, v. 21, № 15, p. 3585–3593.
11. Борисов Ю.А., Соболева О.Ю. и др. Цитология, 1991, т. 33, № 1, с. 24–31.
12. Мелли Э. Биохимическое исследование мембран. М.: Мир, 1979.
13. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 72–76.
14. Голубева Т.С., Чертов О.Ю., Киселевский М.В., Тулуз А.Р. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1996, т. 122, № 8, с. 183–185.
15. Golubeva T.S., Patomov V.M., Kiselevskii M.V. e. a. FEBS Lett., 1997, v. 405, p. 312–314.
16. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы. М.: Мир, 1990, с. 29–31.
17. Katsumi Maturaki Chem. Pharm. Bull., 1998, v. 36, p. 420–430.
18. IERT, Sect.13, v.1, Anticholinesterase Agents. Ed. A.G.Karczmar, 1970, p. 68–69.
19. Резник В.С., Аникиенко К.А., Курочкин В.К. и др. Докл. РАН, 1998, т. 362, № 1, 68–70.
20. Ellena J.F., Blazing M.A., McNamee M.G. Biochemistry, 1983, v. 22, p. 5523–5535.