

DOI: 10.15593/2224-9400/2017.3.04

УДК 615.03

Е.Д. Ермакова, Г.А. ЛюшинаПермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия**ОЦЕНКА МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

*В рамках работ по поиску веществ, перспективных для создания на их основе лекарственных препаратов, в настоящее время большое место отводится исследованиям *in vitro*, предполагающим использование для оценки биологической активности и других имеющих к ней отношение свойств материала клеточных культур, субклеточных фракций или отдельных ферментов. Одним из важных свойств потенциальных лекарственных веществ является степень их воздействия на мембраны клеток. Для оценки потенциального мембраностабилизирующего действия в качестве модельного объекта удобно использовать клетки эритроцитов. Под влиянием неблагоприятных факторов мембраны клеток эритроцитов разрушаются, т.е. происходит гемолиз – выход гемоглобина из клеток в окружающую среду. На отслеживании показателя оптической плотности среды при длине волны поглощения гемоглобина относительно контрольной пробы основан метод оценки влияния веществ на целостность мембраны эритроцита.*

В данной работе представлены результаты отработки методики оценки мембраностабилизирующего действия органических соединений, основанной на проведении осмотического гемолиза эритроцитов, выделенных из крови крыс. Определены оптимальные условия выделения эритроцитов. Показано, что использование разведенного в 2,5 раза забуференного фосфатами раствора хлорида натрия позволяет получить частичный гемолиз эритроцитов, составляющий 60–80 % от уровня гемолиза в дистиллированной воде. При этом оптимальное время инкубирования суспензии эритроцитов с исследуемой средой – 5 мин при комнатной температуре. Изучено влияние диметилсульфоксида на степень разрушения клеточных мембран эритроцитов при осмотическом гемолизе. Добавление 5 и 10 мкл DMSO незначительно увеличивает гемолиз. Получены результаты оценки мембраностабилизирующего действия двух органических соединений с использованием предложенной методики. Установлено, что химическое соединение CBR-11 не влияет на гемолиз эритроцитов, а химическое соединение CBR-76 возможно обладает мембраностабилизирующим эффектом.

Ключевые слова: клеточные мембраны, доклинические исследования, мембраностабилизирующий эффект, эритроциты, гемолиз.

E.D. Ermakova, G.A. Lyushina

Perm National Research Polytechnic University,
Perm, Russian Federation

EVALUATION OF THE MEMBRANE-STABILIZING ACTION OF ORGANIC COMPOUNDS

Nowadays, within the framework of the search for substances that are promising for the creation of medicines on their basis, a great place is designated to in vitro studies, which involve the use of the cell cultures material, subcellular fractions or individual enzymes to evaluate biological activity and other related properties. One of the important properties of potential drugs is the extent of their effect on cell membranes. Erythrocytes represent a convenient model for evaluation of the possible membrane-stabilizing action.

Under the influence of unfavorable factors, the erythrocyte cell membranes are destroyed, i.e. hemolysis occurs – the release of hemoglobin from the cells into the medium. The method of evaluating the effect of substances on the integrity of the erythrocyte membrane is based on tracking the optical density of the medium at the wavelength of hemoglobin absorption with respect to the control sample.

In this paper, the results of the development of a method for evaluating the organic compounds membrane-stabilizing effect based on the modeling the osmotic hemolysis of erythrocytes isolated from rat blood are presented. Optimal conditions for the isolation of erythrocytes are determined. It is shown that the use of a 2.5 times diluted phosphate buffered saline allows achieving partial hemolysis of erythrocytes, I about 60-80 % of the hemolysis level in distilled water. The optimal time for incubation of the erythrocyte suspension with the studied mixture is 5 minutes at room temperature. The effect of dimethylsulfoxide on the degree of destruction of erythrocyte cell membranes at osmotic hemolysis was studied. Addition of both 5 and 10 μ l DMSO slightly increases hemolysis. The membrane stabilizing effect of two organic compounds using the proposed method was evaluated. It has been concluded that the chemical compound CBR-11 does not affect the hemolysis of erythrocytes, and the chemical compound CBR-76 likely has a membrane-stabilizing effect.

Keywords: *cell membranes, preclinical studies, membrane stabilizing effect, erythrocytes, hemolysis*

В работах по поиску веществ, перспективных для создания на их основе лекарственных препаратов, в настоящее время большое место отводится исследованиям in vitro, предполагающим использование для оценки биологической активности и других имеющих к ней отношение свойств материала клеточных культур, субклеточных фракций или от-

дельных ферментов. Такой подход обеспечивает минимизацию количества задействованных животных на одно исследованное соединение и низкую степень инвазивного вмешательства в их нормальную жизнедеятельность.

К числу свойств, исследуемых на ранних стадиях, относится мембраностабилизирующая активность, которая вносит существенный вклад в обеспечение ряда фармакологических эффектов. Кроме того, имея представление о том, какое действие препарат оказывает на мембраны клеток – угнетающее или стабилизирующее, исследователи получают возможность сделать вывод о его вероятном взаимодействии с органами и тканями [1–3].

Эритроциты являются хорошим модельным материалом для оценки мембраностабилизирующего действия органических веществ [4–9]. Выполняя, помимо прочих, защитную функцию, они способны адсорбировать органические молекулы, равно как и ряд вирусов, микробов, а также токсических веществ на своей поверхности [10]. Кроме того, данные компоненты крови особенно восприимчивы к окислительному повреждению из-за их специфической роли в качестве носителей кислорода. Поэтому они могут служить достоверной моделью для оценки повреждения мембран в условиях окислительного стресса и мембраностабилизирующей активности органических соединений [7, 8]. Под влиянием неблагоприятных факторов, в частности, при резком изменении концентрации физиологического раствора, мембраны клеток эритроцитов разрушаются, т.е. происходит гемолиз – выход гемоглобина из клеток эритроцитов в окружающую среду. На отслеживании показателя оптической плотности среды при длине волны поглощения гемоглобина относительно контрольной пробы основан метод оценки влияния веществ на целостность мембраны эритроцита.

В литературе описаны методики оценки влияния органических соединений и экстрактов из природных материалов на стабильность мембран клеток с использованием в качестве модельной системы суспензии эритроцитов в изотоническом растворе. Методики различаются в деталях: для приготовления суспензии эритроцитов пробу крови центрифугируют при различных условиях, в качестве среды используют изотонический раствор NaCl, забуференный фосфатом солевой раствор и другие среды. Гемолиз эритроцитов проводят разными путями: он может быть вызван температурной обработкой суспензии, помещением эритроцитов в гипотонический раствор или воздействием на эритроциты окислителя.

Для оценки мембраностабилизирующего действия потенциальных лекарственных веществ была выбрана модель гипоосмотического гемолиза. Для стандартизации всей последовательности операций, включая стадию получения клеточной суспензии, необходимо было проверить влияние различных факторов, в числе которых условия центрифугирования пробы крови и промывки эритроцитов, степень разведения изотонического раствора, время инкубации клеток в исследуемой среде

Экспериментальная часть

Эксперименты по подбору оптимальных условий выделения клеток эритроцитов и оценке стабилизирующего действия, оказываемого на их мембраны органическими веществами, а также синтез тестовых образцов проводили на базе научно-образовательного центра прикладных химических и биологических исследований Пермского национального исследовательского политехнического университета.

Получение эритроцитов. Кровь из хвостовой вены белых крыс SD собирали в пластиковые пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту в качестве антикоагулянта. Образцы охлаждали, затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин или в течение 10 мин при 2000 об/мин. Плазму удаляли. Осевшие эритроциты трижды промывали забуференным фосфатами (рН 7,4) раствором хлорида натрия (далее PBS), приготовленным из препарата «Фосфатно-солевой буфер» (ООО «Компания Пущинские лаборатории»). Промытую эритроцитарную массу ресуспендировали в PBS, чтобы получить 5%-ную (об/об) суспензию, которую использовали в течение 6 ч.

Было установлено, что выбранные варианты продолжительности и скорости центрифугирования крови существенно не отличаются по влиянию на свойства полученной суспензии эритроцитов на последующих стадиях работы. Поэтому для дальнейших экспериментов эритроциты выделяли при центрифугировании 4000 об/мин в течение 5 мин. Для унификации эксперимента и уменьшения нагрузки на отдельное животное использовали смесь образцов крови, забранную у двух крыс.

Гемолиз эритроцитов. Гемолиз проводили в пробирках Эппендорфа объемом 2 мл. Контрольная проба содержала 1,0 мл изотонического PBS и 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной суспензии. Максимальный гемолиз достигался путем добавления 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной суспензии к 1,0 мл дистиллированной воды.

Для выбора оптимальных условий частичного гемолиза эритроцитов с точки зрения продолжительности инкубирования в гипотоническом растворе и степени его разбавления готовили растворы PBS с разведением в 2; 2,5; 3; 4 и 5 раз. После внесения эритроцитарной суспензии пробы инкубировали при комнатной температуре 5, 10, 15 и 30 мин и проводили центрифугирование (4000 об/мин, 5 мин). Уровень гемолиза оценивали по поглощению трех образцов каждой надосадочной жидкости при длине волны 535 нм на мультипланшетном ридере Tecan M1000 PRO.

Установлено, что разведение PBS в 3, 4, 5 раз приводит к гемолизу эритроцитов, близкому к уровню гемолиза под действием дистиллированной воды. При разведении PBS в 2 раза и инкубировании в течение 5–15 мин уровень гемолиза эритроцитов в недостаточной степени отличается от показателя для изотонического раствора: оптическая плотность раствора составляет менее 40 % от показателя для дистиллированной воды, что затруднит оценку мембраностабилизирующего действия исследуемых образцов. Для дальнейших экспериментов выбрано разведение PBS в 2,5 раза и время инкубирования 5 мин, приводящее к гемолизу на уровне 60–80 % от показателя для дистиллированной воды.

Оценка влияния диметилсульфоксида (DMSO) на степень гемолиза. DMSO является важным биполярным апротонным растворителем, который удобно использовать для получения стоковых растворов исследуемых веществ. Для выбора оптимального объема аликвоты раствора исследуемого вещества важно оценить, оказывает ли влияние на мембраны клеток чистый растворитель, взятый в таком же количестве. К содержимому проб (0,2 мл 5%-ной эритроцитарной суспензии с добавлением 1 мл изотонического PBS или PBS, разбавленного в 2,5 раза, или дистиллированной воды) добавляли 5 или 10 мкл DMSO. Инкубирование, центрифугирование и определение степени гемолиза проводили при выбранных ранее условиях: центрифугирование 4000 об/мин, 5 мин, разведение PBS в 2,5 раза, инкубирование пробы в течение 5 мин. Было установлено, что добавление как 5 мкл, так и 10 мкл DMSO оказывает незначительное действие на гемолиз эритроцитов (рис. 1).

Оценка мембраностабилизирующего действия образцов органических соединений. Для оценки мембраностабилизирующего действия были выбраны два химических соединения близкого элементного состава, но отличающиеся по липофильности: CBR-11 и CBR-76. Рассчитанный с помощью программы ChemBioDraw Ultra 11.0.1 (CambridgeSoft)

показатель липофильности CLogP составляет для них 1,044 и 5,830 соответственно. Использовали стоковые растворы концентрации 10 мМ. К смеси 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной суспензии с PBS (изотонический раствор) или разбавленным в 2,5 раза PBS (гипотонический раствор), или с дистиллированной водой добавляли 5 или 10 мкл растворов исследуемых образцов. Инкубирование, центрифугирование и определение степени гемолиза проводили при выбранных ранее условиях: центрифугирование 4000 об/мин, 5 мин, инкубирование пробы в течение 5 мин. Результаты представлены на рис. 2.

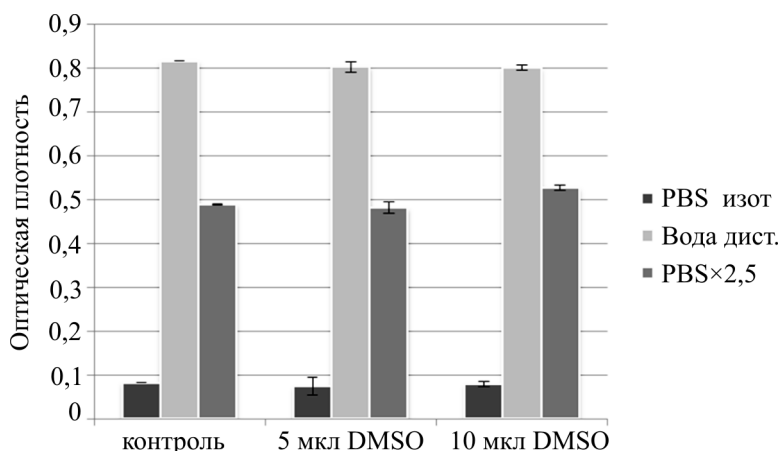


Рис. 1. Влияние добавления DMSO на гемолиз эритроцитов (результаты представлены как $M \pm SEM$ при $n = 3$)

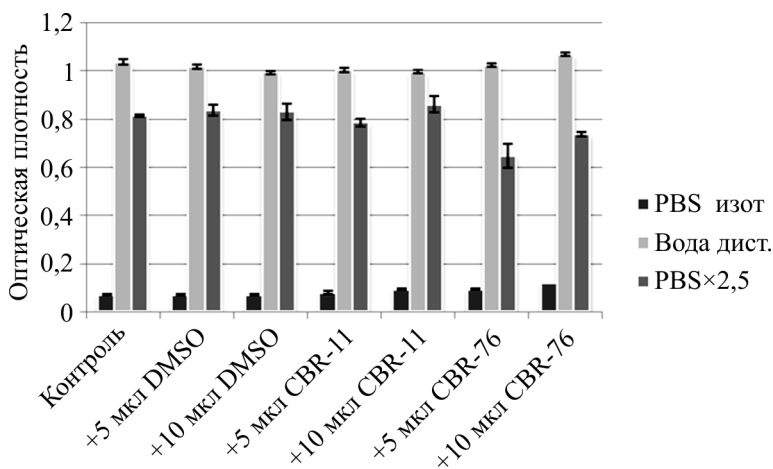


Рис. 2. Влияние химических соединений CBR-11 и CBR-76 на мембрану эритроцитов при разном объеме стокового раствора (результаты представлены как $M \pm SEM$ при $n = 6$)

Присутствие CBR-11 не изменяет существенным образом оптическую плотность растворов, в то время как более липофильное соединение CBR-76 проявляет мембраностабилизирующее действие. Данный эффект наблюдается при добавлении как 5 мкл стокового раствора CBR-76, так и 10 мкл: показатель поглощения, характеризующий степень гемолиза, в пробах с гипотоническим раствором, в которые добавили раствор CBR-76, значительно меньше по сравнению с соответствующими контрольными образцами, в которые добавили только DMSO.

Заключение

В ходе исследования были получены данные о влиянии варьирования основных параметров эксперимента по оценке мембраностабилизирующего действия потенциальных лекарственных веществ на модели гипоосмотического гемолиза эритроцитов. Были установлены оптимальные условия центрифугирования пробы крови – 5 мин при 4000 об/мин, а также разведение PBS для создания гипотонического раствора – в 2,5 раза и время инкубирования эритроцитов в исследуемой среде – 5 мин при комнатной температуре. Однако для стандартизации метода и получения воспроизводимых результатов необходимо дополнительно оценивать количество эритроцитов в объеме используемой суспензии.

Авторы выражают благодарность доценту кафедры химии и биотехнологии ПНИПУ канд. хим. наук Красных Ольге Петровне за ценные советы при планировании исследования и рекомендации по оформлению статьи.

Список литературы

1. Казанчева О.Д., Герасименко А.С. Методология поиска новых биологически активных фармакологических веществ с рецепторной активностью // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 8. – С. 522–526.
2. Wang J., Urban L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy // Drug Discovery Fall. – 2004. – P. 73–86.
3. Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics / H. Van de Waterbeemd, D.A. Smith, K. Beaumont, D.K. Walker // Journal of Medicinal Chemistry. – 2001. – № 44. – P. 1313–1333.

4. Сравнительный анализ мембранстабилизирующего действия препаратов плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, И.С. Трубенева, В.Н. Тарабрина // Вестник ВГУ. Химия. Биология. Фармация. – 2015. – №4. – С. 126–129.

5. Оценка мембраностабилизирующего действия липосом с различными антиоксидантными препаратами на модели осмотического гемолиза / Р.А. Мухамадияров, Е.В. Кривая, М.А. Круч, М.Б. Плотников // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=6862>

6. In vitro antioxidant, Reducing Power, Free Radical Scavenging and membrane stabilizing activities of *Spilanthles calva* / Md. Al Amin Sikder, Md. A. Rahman, Md. R. Islam, Md. A. Kaisar, Md. S. Rahman, Md. A. Rashid // Bangladesh Pharmacuetical Journal. – 2010. – №1. – P. 63–67.

7. Protective Activity of Hydroxytyrosol Metabolites on Erythrocyte Oxidative-Induced Hemolysis / F. Paiva-Martins, A. Silva, V. Almeida, M. Carvalheira, C. Serra, J.E. Rodrgues-Borges, J. Fernandes, L. Belo, A. Santos-Silva // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – Vol. 61, no. 27. – P. 6636–6642.

8. Мембраностабилизирующий эффект экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* / Е.З. Урбанова, С.М. Гуляев, С.М. Николаев, Т.А. Туртуева // Сиб. мед. журн. (Иркутск). – 2013. – № 8. – С. 104–105.

9. Membrane stabilizing activity – a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil / U.A. Shindeu, A.S. Phadke, A.M. Nair, A.A. Mungantiwar, V.J. Dikshit, M.N. Saraf // Fitoterapia. – 1990. – Vol. 70, iss. 3. – P. 251–257.

10. Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. Эритроцит: строение и функции его мембраны // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 2–3. – С. 32–40.

References

1. Kazancheva O.D., Gerasimenko A.S. Metodologiya poiska novykh biologicheskii aktivnykh farmakologicheskikh veshchestv s retseptornoii aktivnost'iu [Methodology of searching for new biologically active pharmacological substances with receptor activity]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*, 2016, no. 8, pp. 522-526.

2. Wang J., Urban L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. *Drug Discovery Fall. 2004*, pp. 73-86.

3. Van de Waterbeemd H., Smith D.A., Beaumont K., Walker D.K. Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2001, no. 44, pp. 1313-1333.

4. Logvinova E.E, Brezhneva T.A, Slivkin A.I., Trubeneva I.S., Tarabrina V.N. Sravnitel'nyi analiz membranstabiliziruiushchego deistviia preparatov plodov riabiny chernoplodnoi [A comparative analysis of membran-stabiliziruyushchego action of liquid dosage forms black chokeberry fruits]. *Vestnik VGU, seriia: Khimiia. Biologiia. Farmatsiia*, 2015, no. 4, pp. 126-129.

5. Mukhamadiarov R.A., Krivaia E.V., Kruch M.A., Plotnikov M.B. Otsenka membranostabiliziruiushchego deistviia liposom s razlichnymi antioksidantnymi preparatami na modeli osmoticheskogo gemoliza [Evaluation of the membrane-stabilizing action of liposomes with various antioxidant preparations on the model of osmotic hemolysis]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniia*, 2012, no. 4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=6862>

6. Md. Al Amin Sikder, Md. Arifur Rahman, Md. Rashedul Islam, Md. Abul Kaisar, Md. S. Rahman, Md. A. Rashid. In vitro antioxidant, Reducing Power, Free Radical Scavenging and membrane stabilizing activities of *Spilanthes calva*. *Bangladesh Pharmacuetical Journal*, 2010, no. 1, pp. 63-67.

7. Fatima Paiva-Martins, Anbal Silva, Vasco Almeida, Mafalda Carvalheira, Cristina Serra, Jose Enrique Rodrigues-Borges, Joao Fernandes, Luis Belo, Alice Santos-Silva. Protective Activity of Hydroxytyrosol Metabolites on Erythrocyte Oxidative-Induced Hemolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, vol. 61, no. 27, pp. 6636-6642.

8. Urbanova E.Z., Guliaev S.M., Nikolaev S.M., Turtueva T.A. Membranostabiliziruiushchii effekt ekstrakta *Phlojodicarpus sibiricus* [Membrane stability effect of *Phlojodicarpus sibiricus* extract]. *Sibirskii meditsinskii zhurnal*, 2013, no. 8, pp.104-105.

9. Shinde U.A., Phadke A.S., Nair A.M., Mungantiwar A.A., Dikshit V.J., Saraf M.N. Membrane stabilizing activity – a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 1990, vol. 70, iss. 3, pp. 251-257

10. Troshkina H.A., Tsirkin V.I., Dvorianskii S.A. Eritrotsit: stroenie i funktsii ego membrany [Erythrocyte: structure and functions of its membrane]. *Viatskii meditsinskii vestnik*, 2007, no. 2-3, pp. 32-40.

Получено 06.09.2017

Об авторах

Ермакова Елена Дмитриевна (Пермь, Россия) – студентка кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: helenermakova@mail.ru).

Люшина Галина Андреевна (Пермь, Россия) – младший научный сотрудник научно-образовательного центра прикладных химических и биологических исследований Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: lindick@ya.ru).

About the authors

Elena D. Ermakova (Perm, Russian Federation) – Student, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., 614990, Perm, e-mail: helenermakova@mail.ru).

Galina A. Lyushina (Perm, Russian Federation) – Junior scientist, research and education center of applied chemical and biological research, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., 614990, Perm, e-mail: lindick@ya.ru).