

ОЦЕНКА МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЛИПОСОМ С РАЗЛИЧНЫМИ АНТИОКСИДАНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ НА МОДЕЛИ ОСМОТИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА

Мухамадияров Р. А.¹, Кривая Е. В.¹, Круч М. А.¹, Плотников М. Б.²

¹НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6), e-mail: rem57@rambler.ru

²НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск

Изучен мембраностабилизирующий эффект «пустых» липосом и липосом, содержащих в своем составе антиоксиданты – α -токоферол, дигидрохверцетин, эмоксипин, на осмотическую резистентность эритроцитов человека после 24-часовой нормотермической ($t=37^{\circ}\text{C}$) инкубации в забуференном физиологическом растворе (рН 7,4). Показано, что инкубация эритроцитов в среде без липосом индуцировала достоверное ($p < 0,05$) снижение осмотической резистентности эритроцитов при всех концентрациях гипоосмотических растворов NaCl (0,3 %, 0,4 %, 0,5 %). Добавление в среду инкубации липосом с дигидрохверцетином и липосом с эмоксипином увеличивало устойчивость к гемолизу до показателей, выявленных у свежеевыделенных эритроцитов. Мембраностабилизирующий эффект «пустых» липосом и липосом с α -токоферолом был менее выраженным и проявлялся только при концентрации NaCl 0,3 %.

Ключевые слова: липосомы, антиоксиданты, лекарственные формы, осмотический гемолиз.

THE EVALUATION OF MEMBRANE-STABILIZING EFFECT OF LIPOSOMES WITH DIFFERENT ANTIOXIDANT DRUGS IN OSMOTIC HEMOLYSIS MODEL

Muhamadiyarov R. A.¹, Krivaya E. V.¹, Kruch M. A.¹, Plotnikov M. B.²

¹Institute of Problems of Complex Cardiovascular Diseases SB RAMS (650002, Kemerovo, Pine Avenue, 6), e-mail: rem57@rambler.ru

²Institute of Pharmacology RAMS, Tomsk

The membrane-stabilizing effect of “empty” liposomes and liposomes with antioxidants (α -tocopherol, taxifolin, emoxipine) on the human erythrocytes osmotic resistance after 24-hours normothermic (37°C) incubation in phosphate buffered saline (pH 7.4) was studied.

It was shown that incubation of erythrocytes in liposomes-free solution induced significant ($p < 0,05$) decrease in erythrocytes osmotic resistance at all concentrations of hypoosmotic NaCl solutions (0.3%, 0.4%, 0.5%). The adding of liposomes with taxifolin and liposomes with emoxipine in solution increased the cells resistance to hemolysis. The results corresponded with the values of freshly isolated erythrocytes. The membrane-stabilizing effect of “empty” liposomes and liposomes with α -tocopherol was less expressed and shown only in 0.3%-NaCl solution.

Key words: liposomes, antioxidants, medicinal forms, osmotic hemolysis.

Одной из основных причин повреждения мембран эритроцитов при патологических процессах в организме и неблагоприятных условиях хранения является активация в них перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая происходит в результате образования активных форм кислорода и/или снижения активности антиоксидантных систем клеток [1, 6]. Изменения свойств мембран эритроцитов приводит к ухудшению их физиологических характеристик, в частности, реологических показателей [7, 8, 10]. Возможным способом торможения ПОЛ в мембранах эритроцитов может быть повышение их окислительной устойчивости с сохранением функциональной активности за счет использования антиоксидантов. Так, применение антиоксиданта дигидрохверцетина может в различных патологических состояниях способствовать сохранению морфо-функциональных свойств

эритроцитов [6]. Перспективными «транспортными контейнерами» для доставки биологически активных веществ в клетки и ткани в настоящее время считаются липосомы, представляющие собой замкнутые мембранные везикулы. Биологически активные вещества в составе липосом обладают большей биодоступностью и адресностью доставки к клеткам [4]. Липиды, входящие в состав липосом, также могут выступать в качестве «доноров» эссенциальных липидов, замещающих молекулы, поврежденные в результате ПОЛ и активизации фосфолипаз. В качестве антиоксидантов, включаемых в липосомы, в наших экспериментах использовали α -токоферол, дигидрокверцетин и эмоксипин. α -Токоферол является широко распространенным природным антиоксидантом, обладает липофильными свойствами и играет важную роль в антиоксидантной защите клеток [3, 6]. Дигидрокверцетин обладает выраженной антирадикальной и антиоксидантной активностью; очень малорастворим в воде, но хорошо растворим в этаноле, ацетоне [7]. Дигидрокверцетин, связываясь с мембранами липосом, способен перехватывать радикалы, образующиеся в липидной фазе, и за счет этого выступать в качестве цепь-обрывающего радикального ингибитора [2]. Гидрофильный эмоксипин обладает более выраженным эффектом по сравнению с α -токоферолом и включается в водную фазу липосом.

Несмотря на большой интерес исследователей к этим препаратам, мембраностабилизирующий эффект их липосомальных форм мало изучен.

Цель исследования: Изучить влияние липосомальных форм α -токоферола, дигидрокверцетина и эмоксипина на резистентность эритроцитов к осмотическому гемолизу.

Материалы и методы исследования

Получение эритроцитов. Эритроциты выделяли из крови доноров центрифугированием в течение 10 минут при 3000 об/мин. Эритроциты трехкратно отмывали от плазмы в 0,9 % растворе натрия хлорида. Полученную эритроцитарную массу разбавляли забуференным физиологическим раствором до получения 5 % взвеси по объему. Забуференный физиологический раствор содержал 0,15 М натрия хлорида и 0,01 М натрий-фосфатного буферного раствора, pH 7,4.

Приготовление липосом. Липосомы готовили методом экструзии (экструдер Lipex Biomembranes Inc. Canada) через поликарбонатные фильтры. Перед экструзией получали липидную пленку необходимого состава на стенках колбы ротационного испарителя, используя хлороформ в качестве растворителя. Полученную пленку гидратировали раствором внутренней фазы и встряхивали до образования мультиламеллярных везикул. Для улучшения гидратации везикулы подвергали десятикратному циклу замораживания-оттаивания. Полученную суспензию пропускали через экструдер с использованием поликарбонатных фильтров (Costar, USA) с размером пор 100 нм.

В экспериментах использовали «пустые» липосомы (ПЛ), содержащие в липидной фазе лецитин и холестерин в молярном отношении 7:5, и липосомы, дополнительно содержащие антиоксиданты: α -токоферол (α -ТФЛ), дигидрокверцетин (ДГКЛ) или эмоксипин (ЭМОЛ). Все антиоксиданты добавляли из расчета 0,25 ммоль/г липида. При получении липосом с α -токоферолом и дигидрокверцетином их добавляли в колбу на этапе формирования липидной пленки. Эмоксипин добавляли в виде водного раствора на стадии гидратации липидной пленки.

Инкубация эритроцитов с липосомами. К 5 мл 5 % взвеси эритроцитов добавляли липосомы и инкубировали в закрытых пробирках при температуре 37 °С и щадящем режиме перемешивания в течение 24 часов. Концентрация липосом в пробах в пересчете на липиды составила 10 мг/л (14,8 мкМ) с содержанием антиоксидантов 2,5 мкМ. В контрольной группе вместо липосом использовали равный объем физиологического раствора.

Исследование осмотического гемолиза эритроцитов. Для определения процента гемолиза 0,4 мл 5 % эритроцитарной взвеси добавляли к 2 мл гипоосмотического раствора хлорида натрия. Для каждого образца оценивали гемолиз эритроцитов в 0,3 %, 0,4 % и 0,5 % растворах NaCl. Затем взвесь центрифугировали в течение 5 минут при 3000 об/мин и супернатанте измеряли оптическую плотность при длине волны поглощения гемоглобина 535 нм на спектрофотометре Genesys (Thermo, США). На основании полученных данных рассчитывали процент гемолизированных эритроцитов, принимая за 100 % гемолиз результат после добавления к взвеси эритроцитов капли 4 % водного раствора сапонина.

Статистическую обработку результатов выполняли в программе Statistica 6.0 с расчетом значения среднего арифметического и стандартной ошибки. Достоверность различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты сравнительной оценки осмотической устойчивости свежевыделенных эритроцитов и эритроцитов после 24-часовой инкубации в забуференном физиологическом растворе при температуре 37 °С приведены в таблице 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что инкубация эритроцитов в солевой изотоничной среде в течение суток ухудшает состояние клеточных мембран, что проявляется в снижении осмотической резистентности эритроцитов при всех концентрациях гипоосмотических растворов NaCl.

Таблица 1

Осмотическая устойчивость эритроцитов до и после 24-часовой инкубации в нормотермическом забуференном физиологическом растворе при различных внешних концентрациях хлорида натрия

	Гемолиз эритроцитов в гипосмотических растворах NaCl		
	0,3% NaCl	0,4% NaCl	0,5% NaCl
Свежевыделенные эритроциты	82,8±4,2	56,8±2,8	0
Эритроциты через 24 часа инкубации	99,4±4,1*	66,1±2,4*	9,2±0,52*

Примечание: * – достоверность различий относительно значений свежевыделенных эритроцитов при $p < 0,05$.

Введение липосом в состав среды для инкубации увеличивал осморезистентность эритроцитов (рис. 1). Липосомы, состоящие только из лецитина и холестерина, и липосомы с включением α -токоферола в условиях нашего эксперимента проявляли слабый защитный эффект по отношению к гемолизу. Хотя токоферол рассматривается как важнейший универсальный природный антиоксидант для клеточных мембран [3, 6], его активность оказалась недостаточной для получения заметного мембраностабилизирующего действия, и его эффективность в наших экспериментах была близка к эффективности мембранных липидов липосом. В группах ПЛ и α -ТФЛ повышение устойчивости эритроцитов к гемолизу отмечено только при концентрации гипосмотического раствора NaCl 0,3 %.

Липосомы, содержащие вещества, обладающие высокой антиоксидантной активностью – дигидрокверцетин и эмоксипин, проявляли выраженный мембраностабилизирующий эффект по отношению к осмотическому гемолизу при всех применявшихся концентрациях NaCl, несмотря на различия физико-химических свойств. В силу очень плохой растворимости в воде дигидрокверцетин локализуется в липосомах в их липидной части, а эмоксипин, в силу гидрофильности, во внутренней части в виде водного раствора. Однако несмотря на разницу в локализации и различия в химической природе, оба вещества проявляют близкие по значениям показатели снижения осмотического гемолиза эритроцитов после 24-часовой инкубации. При использовании этих антиоксидантов в составе липосом показатели гемолиза при концентрациях внешних растворов 0,3 и 0,5 % приближались к значениям, наблюдавшимся для свежевыделенных эритроцитов.

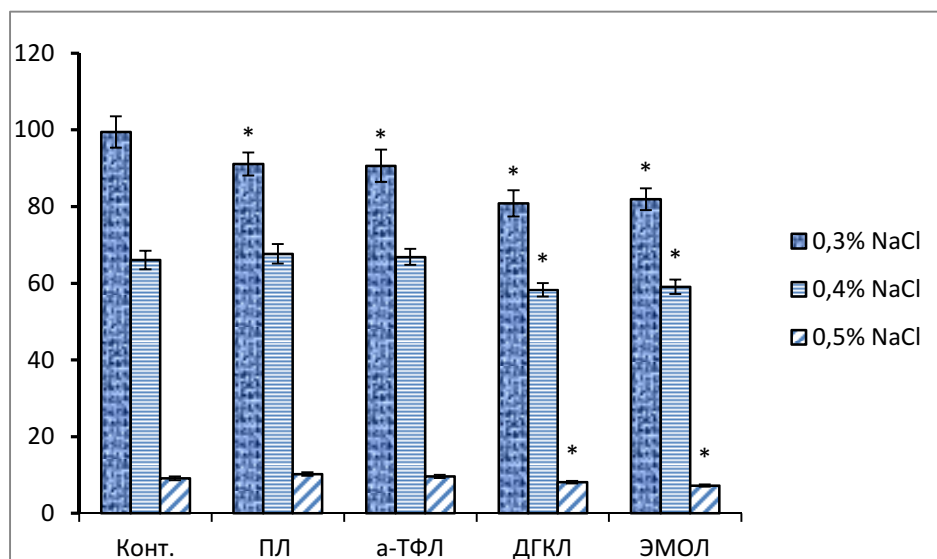


Рис. 1. Доля (%) гемолиза эритроцитов в различных концентрациях NaCl после 24 - часовой инкубации при 37 °С с липосомами, содержащими антиоксиданты. Условные обозначения: Конт. – контрольная группа, без липосом, * – достоверность различий относительно значений в контрольной группе при $p < 0,05$.

Инкубация эритроцитов в физиологическом растворе приводит к истощению запасов АТФ, что на фоне высокого содержания кислорода и снижения антиоксидантной защиты приводит к образованию активных форм кислорода и активации процессов липопероксидации. Включение в инкубационную среду липосом с антиоксидантами – ДГКЛ и ЭМОЛ, в условиях нашего эксперимента позволяло сохранить характеристики мембран эритроцитов близкими к свойствам интактных мембран. Известно, что взаимодействие липосом с мембранами эритроцитов происходит по типу слияния и адгезии [9]. В итоге липиды и липофильные составляющие липосом встраиваются в мембрану эритроцитов. Поэтому можно полагать, что эффект липофильных антиоксидантов – дигидрокверцетина и α -токоферола, проявляется в «гашении» липидных радикалов и молекул активных форм кислорода непосредственно в мембране. Эффект гидрофильного антиоксиданта эмоксипина, по-видимому, реализуется в примембранном пространстве также по механизму инактивации свободных радикалов.

Выводы

1. При хранении эритроцитов в изотоническом забуференном физиологическом растворе (рН 7,4) при температуре 37 °С в течение 24 часов происходит снижение их осмотической резистентности.
2. Инкубация эритроцитов в тех же условиях с добавлением липосомальных форм антиоксидантов улучшает сохранность мембран эритроцитов. В условиях нашего

эксперимента максимальный мембраностабилизирующий эффект проявляли липосомы, содержащие эмоксипин, и липосомы с дигидрохверцетином.

Список литературы

1. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
2. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Демин Е. М., Матвеева Н. С., Любицкий О. Б., Новиков А. А., Измайлов Д. Ю., Осипов А. Н., Тихонов В. П., Каган В. Е. Дигидрохверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза // Биохимия. – 2009. – Т. 74, вып. 3. – С. 372- 379.
3. Евстигнеева Р. П., Волков И. М., Чудинова В. В. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран // Биологические мембраны. – 1998. – Т.15. – №2. – С. 119-136.
4. Сейфулла Р. Д. Фармакология липосомальных препаратов (в эксперименте и клинике). – М.: Глобус Континенталь, 2010. – 241 с.
5. Мамонтова Е. В. Влияние α -токоферола на степень перекисного гемолиза эритроцитов белых мышей в норме и при иммобилизационном стрессе // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 3. – С. 27-28.
6. Плотников М. Б., Тюкавкина Н. А., Плотникова Т. М. Лекарственные препараты на основе диквертина. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2005. – 228 с.
7. Hatherill J.R., Till G.O. and. Ward P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes // Agents and Actions. 1991. – Vol. 32, 3/4. – P. 252-258.
8. Pfafferot C., Meiselman H. J., Hochstein P. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. // Blood, 1982. – Vol. 59. – P. 12–15.
9. Schwartz R. S., Duzgunes N., Tsun-Yee Chu D., Lubin B. Interaction of phosphatidylserine-phosphatidylcholine liposomes with sickle erythrocytes. Evidence for altered membrane surface properties. // J. Clin. Invest. 1983. – V. 71, № 3. – P. 1570-1580.
10. Uyesaka N., Hasegava S., Ishioka N., Ishioka R., Shio H., Schechter A. N. Effect of superoxide anion on red cell deformability and membrane proteins // Biorheology. – 1992. – Vol. 29. – P. 217–229.

Рецензенты:

Журавлева Ирина Юрьевна, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФБГУ «НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, г. Кемерово.
Лурье Семен Борисович, д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и животных ФБГУ «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово.