

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА LABORATORY DIAGNOSTICS

DOI: 10.12737/article_5a3a0dbe2be5a0.22172442

УДК 612.111: 616-073.524

Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Пивоваров Ю.И., Дмитриева Л.А., Богданова О.В.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ С ПРОИЗВОДНЫМИ 3-ОКСИПИРИДИНОВ

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»
(664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Россия)

В статье рассмотрен метод спектрофотометрии для оценки способности эритроцитов к нагрузке препаратом мексидол в условиях естественной сорбции и разработан способ определения концентрации препарата в биосредах эритроцитов с целью их последующего использования для направленного транспорта препарата к органам-мишеням.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования была использована периферическая кровь 15 клинически здоровых мужчин в возрасте от 20 до 45 лет. В работе для клинических исследований использовался фармацевтический препарат оксиметилэтилпиридина сукцинат – мексидол (ЗАО «Фармасофт», Россия). Включение мексидола проводилось методом прямой инкубации эритроцитов в среде, содержащей данный препарат, с последующим получением надосадочной жидкости и её исследованием на спектрофотометре СФ-2000.

Результаты. При измерении спектров надосадочной жидкости с использованием метиленового синего установлена регрессионная зависимость между концентрацией мексидола и оптической плотностью. Получена спектральная характеристика разных концентраций мексидола (1,25, 2,5 и 5 мкг/мл), а также установлено оптимальное время экспозиции эритроцитов и препарата. Предложена модель уравнения для определения концентраций мексидола с использованием метиленового синего в биосредах.

Ключевые слова: эритроциты, спектрофотометрический метод, мексидол

INTERACTION OF ERYTHROCYTE MEMBRANES WITH DERIVATIVES OF 3-OXYPIRIDINES

Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Pivovarov Yu.I., Dmitrieva L.A., Bogdanova O.V.

Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology
(ul. Bortsov Revolyutsii 1, Irkutsk 664003, Russian Federation)

In connection with the increased interest in the use of auto-erythrocytes for directional drug transport, the study of the ability of erythrocytes to sorb an antioxidant drug is becoming topical. The article considers the method of spectrophotometry developed for evaluating the ability of erythrocytes to load with a mexidol preparation under conditions of natural sorption and a method created for determining the drug concentration in erythrocyte biological medias.

Materials and methods. The peripheral blood of 15 clinically healthy males aged 20 to 45 years was used as an object of the study. A pharmaceutical preparation of oxymethylethylpyridine succinate-mexidol (ZAO «Pharmasoft», Russia) was used for clinical studies. The drug belongs to the group of 3-hydroxypyridines. The inclusion of mexidol was carried out by direct incubation of erythrocytes in a medium containing this preparation. The concentrations of the preparation were 1.25, 2.5 and 5 µg/ml and the incubation time was 15, 20 and 30 minutes. The supernatant was obtained by centrifugation for 10 minutes at 3000 rpm on a SF-2000 spectrophotometer at a wavelength of 630 nm. In addition to the pharmacopoeial method, the oxidation-reduction reaction of the supernatant with methylene blue was used.

Results. When measuring the spectra of the supernatant with different concentration of the preparation and using methylene blue, a regression relationship between mexidol and optical density was established, and the optimal exposure time of red blood cells and the drug was determined. These data can be used to control the directional transport of the drug to target organs. A model of the equation for determination of the mexidol content in biomedids is proposed.

Key words: red blood cells, the spectrophotometric method, mexidol

ВВЕДЕНИЕ

Важной составляющей успеха любой новой терапии является возможность доставки определённых химических соединений в клетки и органы-мишени. Наряду с традиционными методами терапии сохраняет свою актуальность идея использования различных носителей для направленного транспорта (НТ) лекарственных средств [2, 6, 7, 11, 12].

В роли объекта для направленного транспорта с помощью аутоэритроцитов использовались различные лекарственные препараты: антибиотики, противоопухолевые препараты, кортикостероиды, пептиды, ферменты и многие другие. Однако в литературе, как в отечественной, так и в зарубежной, отсутствуют исследования для общепринятого антиоксидантного препарата «Мексидол». Необходимость этих исследо-

ваний состоит в том, что большинство соматических патологий сопровождаются оксидативным стрессом, а мексидол является ингибитором свободнорадикальных процессов [1]. Препарат повышает резистентность организма к воздействию неблагоприятных факторов, обладает антиоксидантной и гиполипидемической активностью [3, 4, 10]. Учитывая его высокий цитопротекторный эффект, можно предположить положительное влияние мексидола на цитоархитектуру. На основании вышеизложенного представилось актуальным изучение способности эритроцитов сорбировать антиоксидантный препарат.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить способность эритроцитов взаимодействовать с мексидолом и разработать способ определения концентрации препарата в биосредах эритроцитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования была использована периферическая кровь 15 клинически здоровых лиц мужского пола. Возраст пациентов колебался от 20 до 45 лет. В работе для клинических исследований использовался фармацевтический препарат оксиметилэтилпиридина сукцинат – мексидол (ЗАО «Фармасофт», Россия).

Для приготовления суспензии эритроцитов кровь забирали в стандартные пластиковые контейнеры Vacuette с цитратом натрия 3,8% (в соотношении 1:9) объёмом 5 мл. Пробирки с кровью центрифугировали в течение 20 мин при 2000 об./мин, плазму и лейкоцитарный слой удаляли. Выделенные эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором. К отмытым клеткам добавляли буферный раствор для получения суспензии клеток с требуемым значением гематокрита.

Включение мексидола проводилось методом прямой инкубации эритроцитов в среде, содержащей данный препарат. К суспензии эритроцитов добавляли мексидол в концентрации 1,25, 2,5 и 5 мкг/мл в соотношении 1:2 и инкубировали при температуре 37 °С в течение 15, 20 и 30 минут. После инкубации взвесь эритроцитов трижды центрифугировали, каждый раз сливая надосадочную жидкость в отдельную пробирку. Измеряли оптическую плотность собранной надосадочной жидкости на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 297 нм. Для определения концентрации мексидола в супернатантах, полученных после инкубации клеточной взвеси с раствором препарата, использовали фармакопейный метод и окислительно-восстановительную реакцию супернатанта с метиленовой синью. Взвесь эритроцитов в объёме 1 мл смешивали с 0,025%-м раствором метиленового синего, инкубировали в течение 10 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин. Определение оптической плотности надосадочной жидкости и исходного раствора по отношению к изотоническому раствору хлорида натрия проводилось на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 630 нм [8].

Исследования выполнены в рамках НИР 063 «Биомедицинские технологии профилактики и лечения органной недостаточности в реконструктивной и вос-

становительной хирургии» и одобрены локальным этическим комитетом ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (Протокол № 7 от 18.06.2012 г.) в соответствии с принципами конвенции о биомедицине и правах человека, а также общепризнанными нормами международного права. Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования данного раздела работы поэтапно провели спектрофотометрию всех используемых в работе растворов.

Определили, что оптическая плотность физиологического раствора, который использовали для получения необходимых концентраций мексидола, в спектре поглощения даёт отклик 0,0393 (рис. 1).

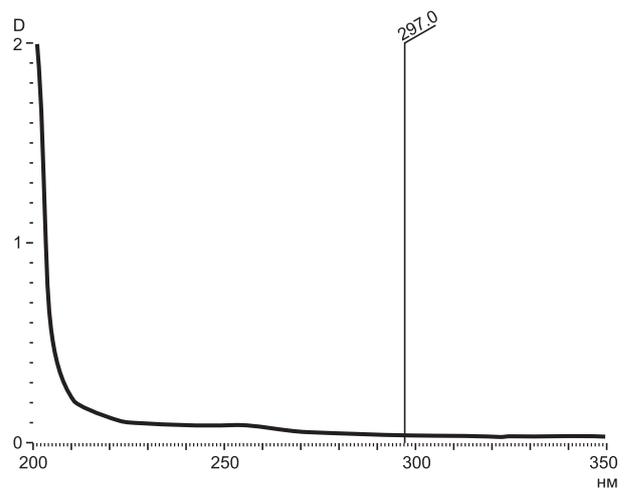


Рис. 1. Физиологический раствор, ОП = 0,0393.
Fig. 1. Saline solution, optical density 0,0393.

При измерении спектров растворов мексидола определили оптические плотности при 297 нм: 0,0279 – для концентрации мексидола 1,25 мкг/мл, 0,0543 – для 2,5 мкг/мл, 0,1031 – для 5 мкг/мл.

При спектрофотометрии надосадочной жидкости после трёхкратной отмывки эритроцитов получены высокие показатели оптической плотности (рис. 2).

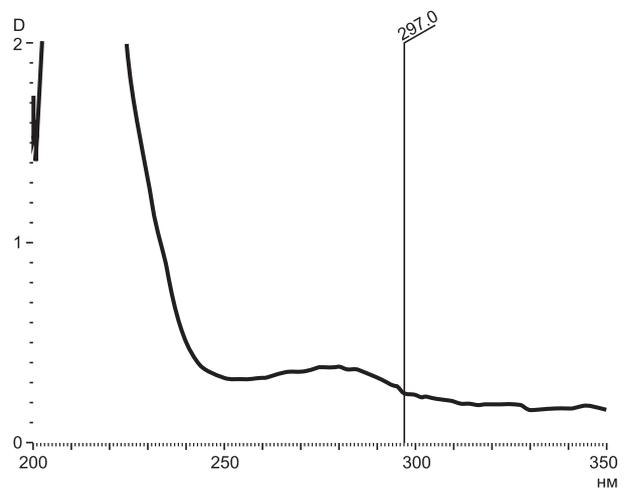


Рис. 2. Оптическая плотность надосадочной жидкости после обработки эритроцитов (0,2544).
Fig. 2. Optical density of supernatant liquid after erythrocyte treatment (0,2544).

Возможно, в процессе обработки эритроцитов физиологическим раствором с наружной части их мембраны удаляются фосфолипиды, холестерол и др. В таблице 1 перечислены некоторые метаболиты, входящие в состав смеси плазменных элементов, область ультрафиолетового (УФ) спектра которых находится в пределах от 200 до 320 нм [5].

Таблица 1
Максимумы оптической плотности основных продуктов метаболизма, характеризующих состав плазмы крови

Table 1
Maxima of optical density of the main metabolic products characterizing the composition of blood plasma

Область УФ спектра, нм	Метаболиты, входящие в состав смеси плазменных элементов
200–210	Водорастворимые пептиды, N-основания: цитозин-цитидин
212–220	Гистидин, производные ксантинов, мочевиная кислота
220–230	Ксантозид (углеводное производное ксантина)
240–250	Рибозид мочевиной кислоты, аминопурин
250–270	Гипоксантин, гуанин, аденозин, N-основания, входящие в состав РНК и ДНК: пурин, ксантин
270–280	Производные аденина, витамин А, фосфаты
280–290	Цитидин, триптофан, мочевиная кислота
290–320	Пиридоксин, ретинол, аминопурин

Спектрограмма рабочих растворов мексидола в физиологическом растворе представлена на рисунках 3, 4.

На втором этапе исследования оценили способность эритроцитов сорбировать мексидол в зависимости от времени инкубации взвеси эритроцитов с рабочими концентрациями 1,25, 2,5 и 5 мкг/мл в течение 15, 20 и 30 минут (рис. 5).

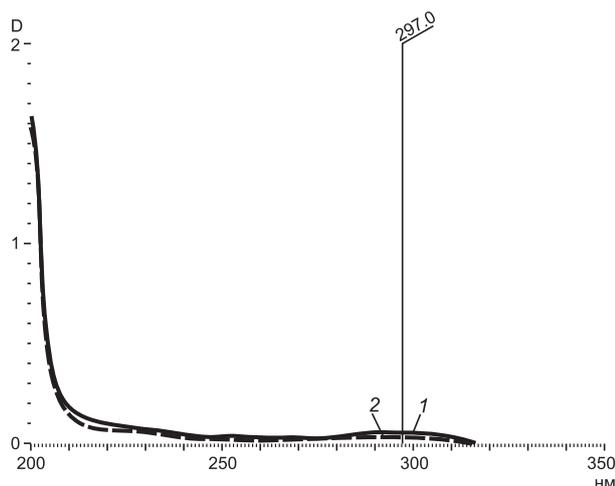


Рис. 3. Раствор мексидола в концентрациях 2,5 мкг/мл (1) и 1,25 мкг/мл (2) в физиологическом растворе. Оптические плотности составили, соответственно, 0,0543 и 0,0279.

Fig. 3. A solution of mexidol at concentrations of 2.5 µg/ml (1) and 1.25 µg/ml (2) in physiological saline. Optical densities were, respectively, 0.0543 and 0.0279.

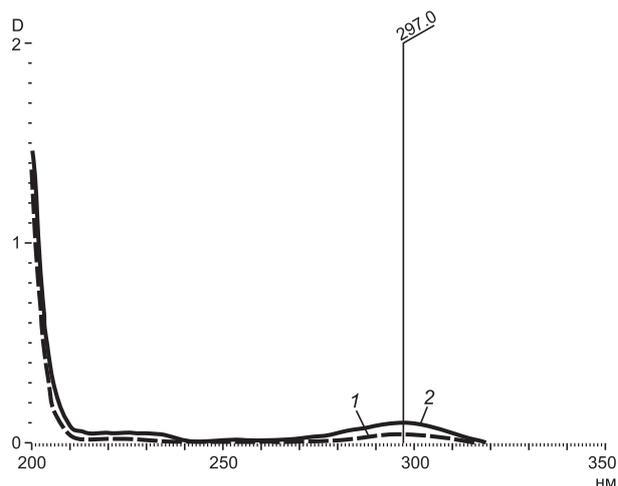


Рис. 4. УФ-спектрограмма растворов мексидола в концентрации 2,5 мкг/мл (1) – оптическая плотность 0,0543; в концентрации 5 мкг/мл (2) – оптическая плотность 0,1031.

Fig. 4. UV spectrogram of mexidol solutions at a concentration of 2.5 µg/ml (1) – optical density 0.0543; in a concentration of 5 µg/ml (2) – an optical density of 0.1031.

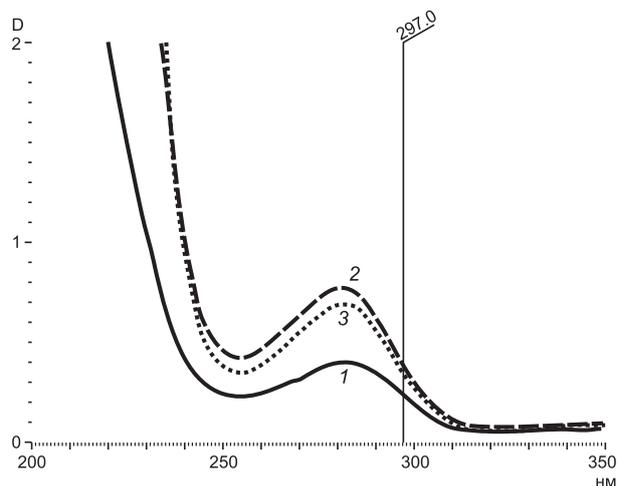


Рис. 5. Спектрограмма растворов мексидола в концентрации 1,25 мкг/мл (1), 2,5 мкг/мл (2) и 5 мкг/мл (3) с эритроцитами доноров при 30-минутной экспозиции.

Fig. 5. The spectrogram of mexidol solutions at a concentration of 1.25 µg/ml (1), 2.5 µg/ml (2) and 5 µg/ml (3) with donor erythrocytes at a 30-minute exposure.

Исследования показали, что наиболее оптимальной является 30-минутная экспозиция эритроцитов с мексидолом.

При измерении спектров надсадочной жидкости установлено, что оптическая плотность даёт высокий пик в области 297 нм. Следует отметить, что в этой же области определяется концентрация рабочих растворов мексидола. В связи с этим не представлялось возможным спектрофотометрическим методом определить изменение концентрации мексидола в надсадочной жидкости. Фармакопейный метод не позволил определить концентрацию мексидола при взаимодействии с эритроцитами. Была предпринята попытка выявить закономерность между изменениями оптической плотности при взаимодействии мексидола разной концентра-

ции с метиленовым синим, использование которого основано на обесцвечивании окрашенного раствора метиленового синего в результате хемосорбции, т. е. химической реакции окисления-восстановления между сорбентом (эритроцитом) и сорбируемым веществом (мексидолом) [8, 9]. Использовался 0,025%-й раствор метиленового синего, который добавлялся к 1 мл взвеси эритроцитов и инкубировался в течение 10 минут. Количество поглощённого красителя выражалось в процентах и рассчитывалось по формуле. В результате проведённых измерений получены данные, которые отражают регрессионную зависимость между концентрацией мексидола и оптической плотностью, то есть чем меньше концентрация мексидола, тем ниже оптическая плотность и наоборот. Эта закономерность выражается следующим уравнением:

$$Y = \exp(b_1 + b_0 \times x),$$

где Y – концентрация мексидола; x – оптическая плотность; b_0 – свободный член (const); b_1 – коэффициент переменной x .

Полученные данные представлены на рисунке 6.

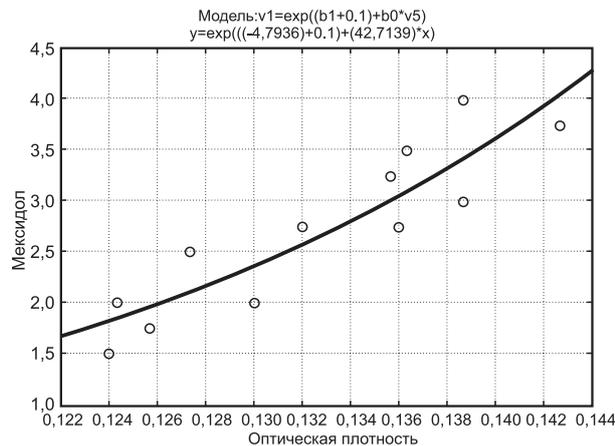


Рис. 6. Зависимость между концентрацией мексидола и оптической плотностью.

Fig. 6. Dependence between the concentration of mexidol and optical density.

Определение концентрации мексидола в биосубстратах (эритроцитах) фармакопейным методом затруднено, так как при длине волны 297 нм надосадочная жидкость эритроцитов даёт высокие экстинкции. Нами предложен метод дополнительного введения в биосреду 0,025%-го раствора метеленового синего и взаимодействия его с мексидолом в результате хемосорбции, что позволило выявить закономерность между оптической плотностью и концентрацией мексидола. Однако данный процесс сорбции мексидола требует специальных исследований. Предложенная модель уравнения позволяет определить концентрацию препарата мексидол в биологической среде.

Полученная спектральная характеристика разных концентраций мексидола может быть использована для контроля сорбции в аутоэритроцитах для направленного транспорта препарата.

**ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES**

1. Воронина Т.А. Мексидол. Основные нейротропные эффекты и механизм действия // Поликлиника. – 2009. – № 5. – С. 32–36.
 Voronina TA. (2009). Mexidol. Main neuropsychotropic effects and mechanism of action [Mexidol. Osnovnye neyropsikhotropnye efekty i mekhanizm deystviya]. *Poliklinika*, (5), 32-36.
2. Карпушина И.А., Стеблева Т.Ф., Бонитенко Е.Ю. Применение методики направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике // Биомедицинский журнал. – 2004. – № 5. – С. 404–408.
 Karpushina IA, Stebleva TF, Bonitenko EYu. (2004). Application of directional drug transport in clinical practice [Primenenie metodiki napravlennogo transporta lekarstvennykh veshchestv v klinicheskoy praktike]. *Biomeditsinskiy zhurnal*, (5), 404-408.
3. Кузнецов С.И., Володина О.П., Зязина В.О. Мексидол – средство для профилактики аритмического синдрома у больных острым коронарным синдромом // Культура физическая и здоровье. – 2013. – № 4. – С. 87–90.
 Kuznetsov SI, Volodina OP, Zyazina VO. (2013). Mexidol – a means to prevent arrhythmic syndrome in patients with acute coronary syndrome [Mexidol – sredstvo dlya profilaktiki aritmicheskogo sindroma u bol'nykh ostrym koronarnym sindromom]. *Kul'tura fizicheskaya i zdorov'e*, (4), 87-90.
4. Луцкий М.А., Назаренко Е.А., Разинкин К.А. Применение отечественного антиоксиданта-препарата Мексидол в комплексном лечении ишемического инсульта // Поликлиника. – 2008. – № 5. – С. 58–62.
 Lutskiy MA, Nazarenko EA, Razinkin KA. (2008). Application of the domestic antioxidant drug mexidol in the complex treatment of ischemic stroke [Primenenie otechestvennogo antioksidanta- preparata Mexidol v kompleksnom lechenii ishemicheskogo insul'ta]. *Poliklinika*, (5), 58-62.
5. Малахова М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации // Эфферентная терапия. – 1995. – Т. 1, № 2. – С. 61–64.
 Malakhova MYa. (1995). Methods of biochemical registration of endogenous intoxication [Metody biokhimicheskoy registratsii endogennoy intoksikatsii]. *Efferentnaya terapiya*, 1 (2), 61-64.
6. Провоторов В.М., Иванова Г.А. Роль и место эритроцитов в системе направленного транспорта различных фармакологических средств // Клиническая медицина. – 2009. – № 9. – С. 4–8.
 Provotorov VM, Ivanova GA. (2009). The role and place of erythrocytes in the directional transport system of various pharmacological agents [Rol' i mesto eritrotsitov v sisteme napravlennogo transporta razlichnykh farmakologicheskikh sredstv]. *Klinicheskaya meditsina*, (9), 4-8.
7. Постнов В.Н., Наумышева Е.Б., Королев Д.В., Галагудза М.М. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов // Биотехносфера. – 2013. – № 6. – С. 16–27.
 Postnov VN, Naumysheva EB, Korolev DV, Galagudza MM. (2013). Nanoscale carriers for drug delivery

[Nanorazmernye nositeli dlya dostavki lekarstvennykh preparatov]. *Biotekhnosfera*, (6), 16-27.

8. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В., Карибжанова Р.М. Способ диагностики интоксикации // *Лабораторное дело*. – 1988. – № 9. – С. 22–27.

Togaybaev AA, Kurguzkin AV, Rikun IV, Karibzhanova RM. (1988). A method of diagnosis of intoxication [Sposob diagnostiki intoksikatsii]. *Laboratornoe delo*, (9), 22-27.

9. Шелковский В.С. Использование окислительно-восстановительных и агрегационных свойств красителя метиленового синего в нанобиофизических исследованиях // *Биофизический вестник*. – 2015. – № 33 (1). – С. 5–29.

Shelkovskiy VS. (2015). Use of oxidation-reduction and aggregation properties of methylene blue dye in nanobiophysical studies [Ispol'zovanie oksislitel'no-vo-

stonovitel'nykh i agregatsionnykh svoystv krasitelya metilenovogo sinego v nanobiofizicheskikh issledovaniyakh]. *Biofizicheskiy vestnik*, (33), 5-29.

10. Щулькин А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики // *Фарматека*. – 2016. – № 4. – С. 65–71.

Shchulkin AV. (2016). Mexidol: modern aspects of the pharmacokinetics and pharmacodynamics [Meksidol: sovremennye aspekty farmakokinetiki i farmakodinamiki]. *Farmateka*, (4), 65-71.

11. Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. (2007). Nanotechnological applications in medicine. *Curr Opin Biotechnol*, 18 (1), 26-30.

12. Dutta RC. (2007). Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress. *Curr Pharm Des*, 13 (7), 761-769.

Сведения об авторах

Information about the authors

Кузнецова Эмма Эфраимовна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной патофизиологии и биохимии, ФБГНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел. (3952) 29-03-50)

Kuznetsova Emma Efraimovna – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolutsii, 1; tel. (3952) 29-03-50)

Горохова Виктория Григорьевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной патофизиологии и биохимии, ФБГНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Gorokhova Viktoria Grigoryevna – Candidate of Chemical Sciences, Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology

Пивоваров Юрий Иванович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией патофизиологии функциональных систем, ФБГНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Pivovarov Yuri Ivanovich – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathophysiology of Functional Systems, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology

Дмитриева Людмила Аркадьевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патофизиологии функциональных систем, заведующая лабораторией клинической диагностики, ФБГНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (e-mail: viclud2009@mail.ru)

Dmitrieva Lyudmila Arkadyevna – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer at the Laboratory of Pathophysiology of Functional Systems, Head of the Clinical Diagnostics Laboratory, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (e-mail: viclud2009@mail.ru)

Богданова Олеся Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии функциональных систем, ФБГНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (e-mail: leechka1986@mail.ru)  <http://orcid.org/0000-0002-5069-7497>

Bogdanova Olesya Vladimirovna – Junior Research Officer at the Laboratory of Pathophysiology of Functional Systems, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (e-mail: leechka1986@mail.ru)  <http://orcid.org/0000-0002-5069-7497>