

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Е. С. Баева, С. Г. Резван, В. Г. Артюхов¹

Представлены результаты исследования структурных свойств эритроцитарных клеток под действием антибактериальных препаратов различных классов (макролиды, фторхинолоны, тетрациклины, линкозамиды). Установлено, что изученные антибактериальные препараты модифицируют цитоплазматический скелет эритроцитарной клетки, индуцируя её гемолитическую активность. Характер изменения осмотической резистентности эритроцитов определяется химической природой действующего модификатора.

Ключевые слова: антибактериальные препараты; гемолиз; мембраны эритроцитов; осмотическая резистентность

ВВЕДЕНИЕ

Многолетние исследования в области антибиотикотерапии воспалительных процессов свидетельствуют о том, что антибактериальные препараты (АБП) обладают как лечебными, побочными, так и неантибактериальными эффектами [4, 6, 10, 11, 13 – 15]. Данных по доклинической оценке безопасности и токсичности антибиотиков по действию на эритроцитарные клетки человека и их компоненты в научной литературе не представлено. Однако известно, что большинство антибиотиков поступают в клетки эукариот путем пассивной диффузии [3], а их клиническая эффективность определяется распределением в органах и тканях, степенью связывания белками и способностью проникать через физиологические барьеры организма [1, 5, 8, 12]. Ввиду отсутствия в эукариотических клетках специфических мишеней для антибиотиков, действие последних направлено на самые разные клеточные популяции, в том числе, эритроцитарные. Изменение проницаемости мембран эритроцитов человека для молекул антибиотиков в значительной мере определяет течение патологического процесса и может служить критерием функционирования биомембран в организме. Выявлено также, что все антибиотики, действующие на клеточную мембрану, могут вызывать нарушения осмотических свойств клетки, не являясь при этом высокоспецифичными (Н. С. Егоров, 2006). Это особенно важно учитывать в терапии инфекций, вызванных внутриклеточными патогенами, такими как *Mycoplasma spp.* Наиболее активными АБП, подавляющими рост микоплазм, являются макролиды, тетрациклины и новые фторхинолоны. Однако их использование создает селективное давление, способствующее

отбору, выживанию и размножению резистентных штаммов, чем и обусловлена необходимость предварительного определения чувствительности исследуемых штаммов к АБП. Поэтому на первом этапе работы мы оценивали индивидуальную чувствительность штаммов *U. urealyticum*, *M. hominis*, выделенных среди населения Воронежа за 2009 – 2010 гг., к АБП [4]. Исходя из вышесказанного, представляло интерес исследовать гемолитическую активность эритроцитов под влиянием АБП, применяемых для лечения микоплазменной инфекции.

Цель работы — изучить влияние различных доз АБП на степень осмотической резистентности и динамику распада эритроцитов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах применяли суспензии эритроцитов, полученные из крови доноров путем трехкратного отмывания эритроцитарной массы центрифугированием в физиологическом растворе NaCl (0,9 %) в течение 10 мин. Содержание клеток в образцах контролировали спектрофотометрически [2]. Кинетику индуцированного антибиотиками гемолиза эритроцитов фиксировали с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-2401 PC (Япония). Гемолиз эритроцитов проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Величины светопропускания образцов измеряли при $\lambda = 490$ нм, т.к. в этой области спектра коэффициент молярной экстинкции водных растворов HbO_2 минимален [2]. Структурное состояние эритроцитов в присутствии АБП оценивали по изменению их осмотической резистентности в изо- и гипосмотическом растворе NaCl с использованием основных параметров: G — относительное количество гемолизированных клеток; G_{120} (%) — доля гемолизированных эритроцитов в гипосмотической среде; $G_{сф}$ (%) — величина, отражающая относитель-

¹ Кафедра биофизики и биотехнологии (зав. — проф. В. Г. Артюхов) Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1.

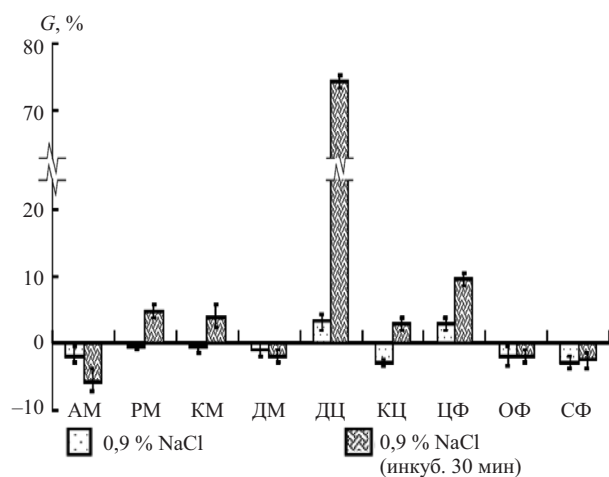


Рис. 1. Значения параметра G изоосмотического гемолиза эритроцитов, модифицированных антибактериальными препаратами.

Здесь и на рис. 2 и 3: азитромицин (АМ) — $1,34 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рокситромицин (РМ) — $7,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, кларитромицин (КМ) — $1,33 \cdot 10^{-4}$ моль/л, доксициклин (ДЦ) — $7,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л, клиндамицин (КЦ) — $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, ципрофлоксацин (ЦФ) — $1,21 \cdot 10^{-4}$ моль/л, офлоксацин (ОФ) — $1,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, спарфлоксацин (СФ) — $1,02 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

ное количество эритроцитов, находящихся в стадии сферуляции. В части опытов с целью определения максимальной степени гемолиза проводили предварительную инкубацию эритроцитов с АБП в течение 30 мин (G_{30}) при комнатной температуре (23°C). Эритроциты классифицированы по времени вступления отдельных субпопуляций клеток в процесс гемолиза — различают низко-, средне- и высокостойкие эритроциты, что обусловлено особенностями строения их мембран. Термином “низкостойкие эритроциты” обозначают клетки, которые первыми подвергаются изменению (сферуляции либо гемолизу) под действием гемолитических факторов.

В качестве модифицирующих агентов мы использовали АБП, применяемые для лечения микоплазменной инфекции, в форме порошка. Оценку воздействия примесных веществ на эритроциты и гемоглобин не проводили ввиду их низкого содержания в препарате (в среднем менее 1 %). Учитывая то, что больному назначают лекарственное средство в средней терапевтической дозе [7], в своих исследованиях расчёт концентрации АБП проводили эмпирическим методом с учётом их разовой дозы при лечении микоплазменных инфекций (для взрослого человека весом 70 кг): 1) класс макролиды: азитромицин (АМ) — $1,34 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,34 \cdot 10^{-5}$ моль/л (сумамед, Хорватия), рокситромицин (РМ) — $7,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $7,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л (Roxithromycin 90 %, Sigma-Aldrich), кларитромицин (КМ) — $1,33 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,33 \cdot 10^{-5}$ моль/л;

2) класс тетрациклины: доксициклин (ДЦ) — $7,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $7,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л (Doxycycline hyclate 98 % (TLC), Sigma-Aldrich);

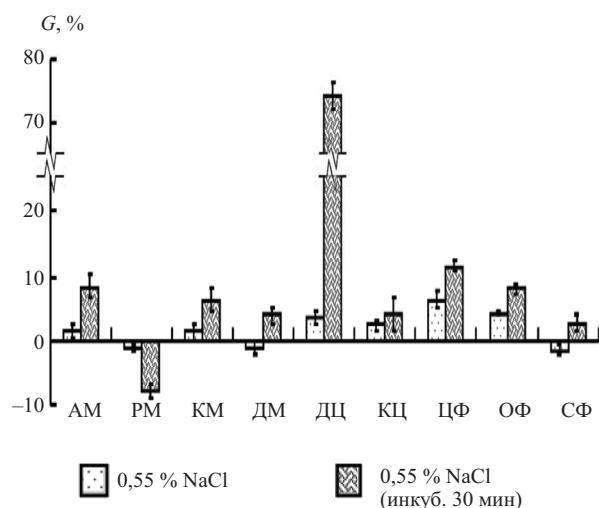


Рис. 2. Значение параметра G гипоосмотического гемолиза эритроцитов.

Обозначения те же, что на рис. 1.

3) класс линкозамиды: клиндамицин (КЦ) — $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Clindamycin, Sigma-Aldrich);

4) класс фторхинолоны: ципрофлоксацин (ЦФ) — $1,21 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,21 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Ciprofloxacin, ≥ 98 % (HPLC) Sigma-Aldrich), офлоксацин (ОФ) — $1,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Ofloxacin, Sigma-Aldrich), спарфлоксацин (СФ) — $1,02 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,02 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Sparfloxacin 98 % (HPLC) Sigma-Aldrich).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартных пакетов программ Microsoft Excel. Рассчитывали средние значения вариант в группе из 4 – 5 образцов крови разных доноров и стандартные отклонения. Полученные данные обрабатывали с использованием параметрических критериев ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные данные по изучению гемолитической активности эритроцитов человека, модифицированных АБП в изоосмотической среде (0,9 % NaCl), представлены на рис. 1. Как следует из рис. 1, АМ, ОФ и СФ инициируют предгемолитическую фазу — сферуляцию клеток ($G_{сф} \approx 2$ %). РМ, КМ и КЦ вызывают зависимое от времени усиление гемолитической активности низкостойких эритроцитов, что находит отражение в увеличении параметра $G \approx 5$ %. В опытах с ЦФ и ДЦ установлено, что максимальный гемолитический эффект индуцируется данными модификаторами после их предварительной инкубации с эритроцитами ($t = 30$ мин), приводя к гемолизу 9 и 73 % клеток, соответственно, т.е. $G = f(t)$.

При изучении гемолитической активности эритроцитов в изоосмотической среде под действием АБП в

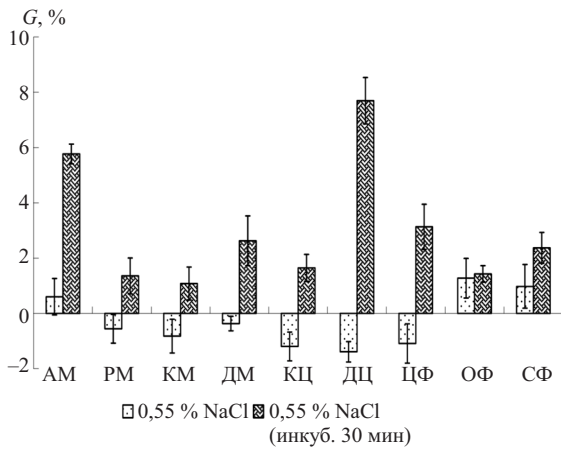


Рис. 3. Значение параметра G гипоосмотического гемолиза эритроцитов.

Обозначения те же, что на рис. 1.

меньшей концентрации установлено, что все модификаторы, за исключением ДЦ ($G_{30} = 9\%$), индуцируют сферуляцию (АМ, ОФ, СФ; $G_{сф} \approx 2\%$) либо гемолиз (РМ, КМ, КЦ, ЦФ; $G \approx 4\%$) клеток как при непосредственном, так и при длительном взаимодействии с ними.

При 0,55 % содержании хлорида натрия в инкубационной среде эритроцит становится наиболее чувствительным к эндогенным воздействиям (критическая точка резистентности), находясь в состоянии 80 – 90 % степени сферуляции [2]. В условиях гипоосмотичности все АБП, за исключением ДЦ, вызывали незначительное повышение гемолитической активности клеток, индуцируя увеличение величины $G_{120} \approx 2 - 4\%$ до 6 – 8 % за время $t_{инкуб} = 30$ мин. Результаты данного исследования представлены на рис. 2.

При оценке гемолитических свойств эритроцитов в условиях действия АБП меньшей концентрации (c) установлено, что все модификаторы, за исключением АМ и ДЦ, проявляют свойства слабых гемолитических агентов, вызывающих незначительную сферуляцию ($G_{сф} \approx 1\%$) с последующим гемолизом не более 3 % эритроцитов, т.е. $G = f(c)$ (рис. 3). Таким образом, нами установлена зависимость скорости гемолитического процесса от концентрации модифицирующего агента. Полученные данные указывают на проникновение в эритроцит АБП по пассивному механизму.

О скорости проницаемости мембранотропного вещества удобно судить по времени вступления отдельных популяций эритроцитов в стадию гемолиза. Установленное нами соотношение $G = f(t)$ показывает, что осмотическая резистентность эритроцитов, инкубированных с АБП, обусловлена возрастом клеток, а, следовательно, молекулярным составом клеточных мембран. Содержание холестерина определяет толщину гидрофобной зоны мембраны и её текучесть, чем и объясняется повышенная устойчивость молодых эрит-

роцитов к антибиотикам в условиях гипоосмотической среды. Оптимальное сочетание гидрофобных и заряженных фрагментов антибиотиков обеспечивает наиболее эффективное связывание молекулы с мембраной клетки. Выявленное в опыте снижение осмотической резистентности эритроцитов предполагает повреждение липостроматинного и спектрин-актинового комплексов, локализованных на цитоплазматической поверхности мембраны [2]. Из рис. 2, 3 вытекает, что при воздействии даже слабых гемолитических агентов (ОФ, СФ, РМ, КМ и КЦ) на устойчивость структурно-каркасного комплекса эритроцита может наступить стадия гемолиза.

Из анализа особенностей взаимодействия фторхинолонов с эритроцитами, помещёнными в среды различной осмотичности NaCl, следует, что ОФ при 0,55 % NaCl инициирует гемолиз не более 8 % клеток, а в условиях изоосмотичности величина $G_{сф}$ остаётся неизменной, что указывает на ограниченное количество клеток, чувствительных к действию данного фторхинолона. СФ, подобно эффекту химического гемолитика, вызывает накопление воды внутри клетки, а, следовательно, и развитие фазы сферуляции. В условиях гипоосмотичности СФ приводит к распаду не более 2 % клеток, что указывает на постепенное встраивание молекул модификатора в мембрану эритроцитов. Накопление молекул ЦФ в мембранах эритроцитов в условиях изоосмотичности, приводящее к распаду до 9 % клеток, а также увеличение гемолитической активности эритроцитов при 0,55 % NaCl характеризуют его как вещество с выраженными гемолитическими свойствами.

В наших исследованиях (рис. 1, 2) РМ, КМ и КЦ при 0,9 % NaCl инициируют процесс последовательного встраивания молекул антибиотиков как в низкостойкие, так и более стойкие эритроцитарные клетки, сопровождающийся гемолизом до 5 % эритроцитов. Это обусловлено различной степенью мембранотропности старых (молекулярно деградированных) и молодых (структурно целых) эритроцитов к молекулам указанных модификаторов. В условиях гипоосмотичности для данных препаратов установлена прямая связь между $G_{сф}/G_{max}$ и $t_{инкуб}$. Повышение осмотической устойчивости мембран эритроцитов под действием РМ позволяет сделать предположение о том, что его молекула связывается с белково-липидными компонентами мембран и сшивает их отдельные участки. Другой представитель макролидов — АМ — при 0,9 % NaCl инициирует развитие фазы сферуляции, а в гипоосмотической среде повышает гемолитическую активность эритроцитов, что свидетельствует о встраивании АМ в мембраны клеток.

Активное связывание ДЦ с мембранами эритроцитов указывает на низкий уровень барьера стерических ограничений. В условиях изо- и гипоосмотичности данный антибиотик вызывает накопление структур-

ных модификаций мембран, приводящих к снижению осмотической резистентности эритроцитов.

Выявленные нами эффекты антибактериальных препаратов на эритроциты указывают на возможность использования последних в качестве тест систем для анализа потенциальной токсичности АБП в рамках доклинических испытаний.

ВЫВОД

Изученные антибактериальные препараты при взаимодействии с мембранами эритроцитов индуцируют в них скрытые структурные повреждения составных компонентов. Степень изменения гемолитической активности эритроцитов определяется химической природой модификатора и временем его взаимодействия с клеткой.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева и др., *Бюл. сиб. мед.*, № 2, 62 – 70 (2006).
2. В. Г. Артюхов, М. А. Наквасина, С. Г. Резван и др., *Практикум по биофизике*, Воронеж (2001).
3. Д. Ланчини, Ф. Паренти, *Антибиотики*, Москва (1985).
4. Е. С. Херувимова, В. Г. Артюхов, С. Г. Резван, *Вестн. Воронеж. университета, Сер. Химия. Биология. Фармация*, № 2, 115 – 119 (2010).
5. Л. С. Страчунский, С. Н. Козлов, *Макролиды в современной клинической практике*, Смоленск, Русич (1998).
6. Л. С. Страчунский, Ю. Б. Белоусов, С. Н. Козлов (ред.), *Антибактериальная терапия. Практическое руководство*, Москва (2000).
7. Н. В. Логинова, Г. И. Полозов, *Введение в фармацевтическую химию*, Минск (2004).
8. С. В. Яковлев, *Антибиот. и химиотер.*, № 5, 3 – 5 (1999).
9. A. Knopik-Skrocka, J. Bielawski, K. Wrzeszcz, et al., *Biological lett.*, **44**(1), 17 – 30 (2007).
10. D. L. Brown, K. K. Desai, B. A. Vakili, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**(4), 733 – 738 (2004).
11. G. Kapur, R. P. Valentini, T. K. Mattoo, et al., *Pediatric blood and cancer*, **50**(1), 139 – 142 (2008).
12. P. Periti, T. Mazzei, E. Mini, A. Novelli, *Clin. Pharmacokin.*, **16**(4), 193 – 214 (1989).
13. S. L. Segelnick, M. A. Weinberg, *N. Y. State Dent. J.*, **76**(5), 28 – 32 (2010).
14. T. Krakauer, M. Buckley, *Antimicrob. Agent Chemother.*, **47**(11), 3630 – 3633 (2003).
15. V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 5-th ed. Williams & Willrins, Baltimore (2005).

Поступила 14.01.13

EFFECT OF ANTIBACTERIAL AGENTS OF DIFFERENT NATURE ON THE OSMOTIC RESISTANCE OF HUMAN ERYTHROCYTES

E. S. Baeva, S. G. Rezvan, and V. G. Artyukhov

Chair of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006, Russia

We have studied the structural properties of human erythrocytes under the action of antibacterial substances of different nature (macrolides, fluoroquinolones, tetracyclines, lincosamides). It has been established that antibiotics modify the cytoplasmic skeleton of erythrocytes and induce their hemolytic efficiency. The character of changes in the osmotic resistance of erythrocytes depends on the chemical structure of modifiers.

Keywords: antibiotics; hemolysis; erythrocyte membrane; osmotic resistance