

УДК 615:616 - 092.4

ВПЛИВ СИНТЕТИЧНОГО АНТИОКСИДАНТА МЕКСИДОЛУ НА ФОРМУ ЕРИТРОЦИТІВ У ДОСЛІДАХ IN VITRO

Л.О. Бабичук¹, О.М. Важнича², О.В. Саверська², С.В. Мокряк²
¹Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків
²ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

У досліджах in vitro вивчена дія ізо- та гіпоосмолярності середовища на патологію форми еритроцитів і досліджений вплив на ці процеси синтетичного антиоксиданту мексидолу. Встановлено, що в суспензіях еритроцитів, інкубованих 2 години при +4, +20 та +37°C. виявляються акантоцити, овалоцити, сфероцити й мішенеподібні клітини, причому під дією гіпоосмолярності (0,7-0,45% розчини натрію хлориду) закономірно зменшується число акантоцитів без істотних змін іншої патології форми еритроцитів. Мексидол, внесений у проби з розрахунку 100 мг/кг, в ізотонічному середовищі зменшує як акантоцитоз, так і сфероцитоз, у гіпотонічних середовищах – діє тільки на акантоцити, що найбільш чітко виявляється при температурах +4 і +37°C.

Ключові слова: еритроцити, патологія форми, осмолярність середовища, мексидол.

Робота була проведена відповідно до планової НДР ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія»: «Вивчення зв'язку ушкоджень органів системи травлення і кровопостачання за умов емоційного стресу та корекції» (№ державної реєстрації 0107U001557).

Відомо, що стан мембрани і цитоскелету еритроцитів зумовлює їх форму, еластичність та резистентність до пошкоджуючих факторів [11, 13]. Тому він інтенсивно вивчається за умов клінічної та експериментальної патології [12, 15]. Теоретичне і практичне значення мають дослідження, що стосуються впливу фармакологічних засобів на морфофункціональні характеристики еритроцитів [14], зокрема синтетичних антиоксидантів, до числа яких належить мексидол.

Мексидол (6-метил-2-етил-3-оксипіридину сукцинат) – синтетичний антиоксидант із нейротропними й метаболічними властивостями, що використовується при захворюваннях центральної нервової системи [1, 6, 10] і продовжує вивчатися при екстрацеребральній патології [5, 8]. Зокрема, було встановлено, що цей препарат справляє захисну дію на гематологічні показники при гострій крововтраті й стресі [2, 9]. Дані літератури й результати попередніх досліджень показали, що мексидол підвищує стійкість еритроцитів до оксидативного стресу й впливу механічних факторів, однак питання про вплив препарату на білки цитоскелету еритроцитів залишається не вирішеним. Опосередковано про таку дію можна судити за впливом препарату на утворення патологічних форм еритроцитів за умов гіпоосмолярності [3].

Метою роботи було вивчення в досліджах in vitro впливу мексидолу на патологію форми еритроцитів, обумовлену осмолярністю середовища.

Матеріал та методи дослідження. Експерименти проведені з використанням крові інтактних білих щурів. Кров одержували пункцією порожнин серця за загальноприйнятою методикою й стабілізували гепарином [4]. Еритроцити, двічі відмиті стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду (NaCl), суспендували в 0,9% розчині NaCl або в гіпотонічних середовищах (0,7%; 0,6%; 0,45% розчини NaCl, забуферені фосфатним буфером до pH=7,4) у співвідношенні 1:2, що відповідає гематокриту. До суспензій еритроцитів додавали розчин мексидолу й інкубували їх 2 години при +20°C, +4°C або +37°C. Проби без препарату слугували контролем. У кожній експериментальній і контрольній групі було по 5 проб.

Застосовували ампульований розчин мексидолу (ТОВ «Наука-Фарм», Росія). За даними виробника, він містить тільки мексидол і воду без інших стабілізуючих речовин. Розведення препарату було таким, щоб його концентрація в пробі відповідала тій, яка можлива в організмі при введенні й рівномірному розподілі ефективної дози 100 мг/кг маси.

Після інкубації робили мазки на предметних стеклах, які фіксували, фарбували за

Паппенгеймом й використовували для підрахунку еритроцитів з патологією форми [7]. Вміст акантоцитів, овалоцитів, сфероцитів і мішенеподібних форм виражали в проміле. Отримані дані статистично обробляли за допомогою стандартних комп'ютерних програм Microsoft Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. У суспензіях, приготовлених на 0,9% розчині NaCl і інкубованих при +20°C, виявлені всі види патології форми еритроцитів з перевагою акантоцитів (табл. 1). Це може бути пов'язане з наявністю певної кількості таких клітин у крові [7], а також з ушкодженням частини еритроцитів, особливо їхніх мембран, у ході приготування модельних систем та їх інкубації.

Таблиця 1

Вміст еритроцитів з патологією форми в модельних системах при +20°C і вплив мексидолу на нього (M ± m), ‰

Характер впливу	Акантоцити	Овалоцити	Сфероцити	Клітини-мішені	Усього
0,9% розчин NaCl	231 ± 66	11,4 ± 3,8	7,0 ± 3,6	4,2 ± 1,3	254 ± 67
0,9% розчин NaCl + мексидол	129 ± 15	7,2 ± 0,9	2,8 ± 1,6	5,8 ± 1,7	384 ± 13
0,7% розчин NaCl	23,4 ± 8,0*	8,8 ± 5,4	4,2 ± 2,1	0,8 ± 0,6*	37 ± 7*
0,7% розчин NaCl + мексидол	27,8 ± 9,6	5,4 ± 2,2	0,8 ± 0,8	1,0 ± 0,5	36 ± 11
0,6% розчин NaCl	134 ± 43	6,4 ± 1,9	3,4 ± 1,7	9,2 ± 4,3	153 ± 48
0,6% розчин NaCl + мексидол	51 ± 17**	5,6 ± 2,4	6,8 ± 3,4	3,0 ± 1,4	67 ± 20
0,45% розчин NaCl	67 ± 24*	6,0 ± 3,2	4,0 ± 2,1	4,3 ± 2,4	81 ± 26*
0,45% розчин NaCl + мексидол	37,2 ± 9,1	9,6 ± 3,4	3,2 ± 1,8	2,8 ± 1,7	53 ± 12

Примітки: У табл. 1 і наступних:

1. Кожна група містить по 5 спостережень.

2. Вміст нормоцитів не наведено, оскільки він дорівнює (1000 – загальна кількість патологічних форм «усього»)

3. * – p<0,05 між гіпотонічним та ізотонічним розчином NaCl;

** – p<0,05 між дослідом (+ мексидол) і відповідним контролем.

Таблиця 2

Вміст еритроцитів з патологією форми в модельних системах при +4°C і вплив мексидолу на нього (M ± m), ‰

Характер впливу	Акантоцити	Овалоцити	Сфероцити	Клітини-мішені	Усього
0,9% розчин NaCl	357 ± 11	6,4 ± 1,7	8,6 ± 2,3	11,6 ± 1,7	384 ± 13
0,9% розчин NaCl + мексидол	127 ± 35**	6,2 ± 2,6	2,4 ± 1,3**	5,8 ± 1,7**	142 ± 38**
0,7% розчин NaCl	32 ± 10*	8,2 ± 3,7	4,4 ± 2,3	7,8 ± 4,7	52 ± 11*
0,7% розчин NaCl + мексидол	24 ± 14	24,4 ± 6,7	2,8 ± 1,8	4,6 ± 3,5	56 ± 17
0,6% розчин NaCl	86 ± 32*	9,6 ± 3,5	4,6 ± 1,7	4,2 ± 2,4	105 ± 35*
0,6% розчин NaCl + мексидол	33 ± 9,8	10,8 ± 3,5	2,4 ± 1,1	0,4 ± 0,4	46,6 ± 9,2
0,45% розчин NaCl	97 ± 31*	8,8 ± 3,3	6,2 ± 2,9	15,8 ± 6,5	128 ± 31*
0,45% розчин NaCl + мексидол	20,0 ± 8,8**	7,2 ± 1,8	7,4 ± 4,7	3,8 ± 2,1	38 ± 13**

Таблиця 3

Вміст еритроцитів з патологією форми в модельних системах при +37°C і вплив мексидолу на нього (M ± m), ‰

Характер впливу	Акантоцити	Овалоцити	Сфероцити	Клітини-мішені	Усього
0,9% розчин NaCl	248 ± 30	9,0 ± 4,5	14,8 ± 4,8	11,0 ± 1,8	281 ± 30
0,9% розчин NaCl + мексидол	154 ± 43	9,4 ± 1,4	4,0 ± 1,4**	3,0 ± 1,5**	171 ± 46
0,7% розчин NaCl	32 ± 10*	11,6 ± 3,5	6,6 ± 2,4	10,2 ± 5,3	60 ± 13*
0,7% розчин NaCl + мексидол	5,0 ± 2,1**	12,4 ± 3,6	1,8 ± 1,2	0	19 ± 4**
0,6% розчин NaCl	77 ± 18*	19,0 ± 5,4	3,0 ± 1,4	6,6 ± 1,9*	105 ± 20*
0,6% розчин NaCl + мексидол	35,4 ± 5,0**	23,4 ± 7,8	3,0 ± 1,9	4,0 ± 1,8	66 ± 12
0,45% розчин NaCl	53 ± 25*	21,4 ± 8,3	9,2 ± 3,9	9,2 ± 4,2	93 ± 33*
0,45% розчин NaCl + мексидол	36 ± 16	12,2 ± 5,5	1,6 ± 1,0	1,2 ± 1,2	51 ± 18

В умовах слабкої гіпотонії (0,7% розчин NaCl) після інкубації при +20°C загальний вміст еритроцитів патологічної форми в 6,7 рази (p<0,001) менше, ніж в ізотонічному середовищі (див. табл. 1). Таке зменшення відбувається, головним чином, за рахунок акантоцитів, вміст яких знижується в 9,9 рази (p<0,001) у порівнянні з аналогічним показником при використанні 0,9% розчину NaCl. Відзначається також зменшення представництва мішенеподібних клітин в 5,3 рази (p<0,05).

За умов помірної гіпотонії (0,6% розчин NaCl) при +20°C вміст акантоцитів, овалоцитів, сфероцитів і клітин-мішеней вірогідно не відрізняється від такого в ізотонічному середовищі (див. табл. 1). За умов вираженої гіпотонії (0,45% розчин NaCl) при +20°C знову знижується вміст акантоцитів і пов'язаний з ним загальний вміст еритроцитів патологічної форми

відповідно в 3,1 і 3,4 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з аналогічними показниками в 0,9% розчині NaCl. Вплив мексидолу на патологію форми еритроцитів в описаних вище середовищах мінімальний (див. табл. 1). Під дією препарату спостерігається лише зменшення вмісту акантоцитів в 2,6 рази ($p < 0,05$) у суспензії еритроцитів, приготовленої на 0,6% розчині NaCl, у порівнянні з відповідним контролем.

У модельних системах, які інкубували при $+4^{\circ}\text{C}$, вплив гіпоосмолярності на вміст акантоцитів, овалоцитів, сфероцитів і таржетних клітин подібний тому, який має місце при інкубації при $+20^{\circ}\text{C}$ (табл. 2). Спостерігається вірогідне зменшення ($p < 0,001$) загального числа еритроцитів з патологією форми за рахунок акантоцитів у 0,7% і 0,45% розчинах NaCl у порівнянні з ізотонічним середовищем. При $+4^{\circ}\text{C}$, на відміну від інкубації при $+20^{\circ}\text{C}$, також знижується вміст акантоцитів в 4,2 рази ($p < 0,001$) і сполучений з ним загальний вміст патологічних форм в 3,7 рази ($p < 0,001$) за умов помірної гіпотонії (0,6% розчин NaCl).

Внесення мексидолу в суспензії еритроцитів, які інкубували при $+4^{\circ}\text{C}$, викликає більш виражені зрушення, чим при $+20^{\circ}\text{C}$ (див. табл. 2). В ізотонічному середовищі препарат зменшує вміст акантоцитів у 2,8 рази ($p < 0,001$), сфероцитів – у 3,6 рази ($p \leq 0,05$), таржетних клітин – у 2 рази ($p < 0,05$) і загальне число патологічних форм – у 2,7 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем. У середовищі з вираженою гіпотонією (0,45% розчин NaCl) мексидол знижує вміст акантоцитів і загальне число патологічних форм відповідно в 4,9 ($p \leq 0,05$) і 3,4 рази ($p < 0,05$).

У модельних системах, які інкубували при $+37^{\circ}\text{C}$, вплив гіпоосмолярності на вміст акантоцитів, овалоцитів, сфероцитів і таржетних клітин подібний тому, який має місце при інкубації при обох попередніх температурних режимах (табл. 3). При даній температурі вміст акантоцитів у зразках з використанням 0,7%, 0,6% і 0,45% розчинів NaCl нижчий, ніж в ізотонічному середовищі відповідно в 7,8; 3,2 і 4,7 рази ($p < 0,001$), що відбивається на загальній кількості еритроцитів з патологією форми. Помірна гіпотонія при $+37^{\circ}\text{C}$, крім того, супроводжується зниженням вмісту сфероцитів ($p < 0,05$).

У цій серії експериментів внесення мексидолу в суспензії еритроцитів на 0,9% розчині NaCl викликає зниження вмісту сфероцитів у 3,1 рази ($p < 0,05$) і таржетних клітин у 3,7 рази ($p < 0,01$) у порівнянні з контролем (див. табл. 3). У системах зі слабкою й помірною гіпотонією препарат вірогідно впливає тільки на зміст акантоцитів, зменшуючи його в 6,4 і 2,2 рази ($p < 0,05$). Отримані результати свідчать, що розходження в температурному режимі в межах від $+4$ до $+37^{\circ}\text{C}$ не є визначальними при виникненні патології форми еритроцитів у модельних системах *in vitro*. Основну роль у цьому процесі відіграє осмолярність середовища, причому при концентрації NaCl 0,7-0,45% закономірно зменшується число акантоцитів без істотних змін у кількості іншої патології форми еритроцитів. Можна припустити, що в межах використаної гіпотонії порушується іонний транспорт і починається набрякання еритроцитів, що нівелює «зазубреність» їхніх мембран.

Дія мексидола більш виразна при $+4$ і $+37^{\circ}\text{C}$ і залежить від осмолярності. В ізотонічному середовищі препарат зменшує як акантоцитоз, так і сфероцитоз, у гіпотонічних – діє тільки на акантоцити. Такий характер дії, вочевидь, свідчить про те, що мексидол здатний модифікувати й мембрани еритроцитів, і їх цитоскелет, але переважно впливає на мембранні структури, з ушкодженням яких пов'язують акантоцитоз [7]. Подібна «поверхнева» дія, ймовірно, визначається гідрофільністю препарату і є конкретним вираженням його відомих мембраностабілізуючих властивостей, найбільше повно вивчених стосовно до клітин центральної нервової системи [1, 6].

Висновки

1. У модельних системах на основі суспензій еритроцитів, інкубованих 2 години при $+4$ – $+37^{\circ}\text{C}$, виявляються акантоцити, овалоцити, сфероцити й мішенеподібні клітини, причому під дією гіпоосмолярності закономірно зменшується число акантоцитів без істотних змін у кількості іншої патології форми еритроцитів.
2. Мексидол, внесений у проби з розрахунку 100 мг/кг, в ізотонічному середовищі зменшує як акантоцитоз, так і сфероцитоз, а в гіпотонічних середовищах – діє тільки на акантоцити, що найбільш виражене при температурах $+4$ і $+37^{\circ}\text{C}$.

Перспективи подальших розробок у даному напрямку. У перспективі планується дослідити стан білків цитоскелету еритроцитів під впливом мексидолу в

дослідах *in vitro*.

Література

1. Воронина Т.А. Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы / Т.А. Воронина, С.Б. Середенко // Эксперим. и клин. фармакология. – 1998. – Т.61, № 4. – С. 3-9.
2. Девяткина Т.А. Регуляторное действие мексидола на уровень гемоглобина при остром стрессе / Т.А. Девяткина, Е.М. Важничая, Н.А. Олейник // Эксперим. и клин. фармакология. – 2007. – Т. 70, № 5. – С. 24-26.
3. Денисенко О.М. Криочутливість еритроцитів різних видів ссавців: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук. – Харків, 2006. – 12 с.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації / наук. ред. Стефанов О.В.]. – К.: Авіцена, 2001. – 527 с.
5. Иванов И.В. Влияние семакса и мексидола на течение острого панкреатита у крыс / И.В. Иванов, В.В. Яснецов // Эксперим. и клин. фармакология. – 2000. – Т. 63, № 1. – С. 41-44.
6. Изучение антистрессорного и анальгетического эффектов мексидола, диазепам, парацетамола и их комбинации / Т.А. Воронина, Г.М. Молодавкин, И.И. Бабаев [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 2006. – Т.69, №4. – С. 6-9.
7. Погорелов В.М. Лабораторно-клиническая диагностика анемий / В.М. Погорелов, Г.И. Козинец, Л.Г. Ковалева. – М.: МИА, 2004. – 173 с.
8. Противоаритмическая активность бефола, суфана, мексидола и ТЗ-146 в сочетании с некоторыми антиаритмиками / П.А. Галенко-Ярошевский, А.В. Уваров, Ю.Р. Шейх-Заде [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т.125, № 5. – С. 544-547.
9. Профілактична дія мексидолу при гострій крововтраті / Мокляк Є.В., Олійник Н.О., Важнича О.М. [та ін.] // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2008. – №1-2. – С. 18-21.
10. Яснецов В.В. Защитный эффект производных 3-гидроксипиридина в экстремальных условиях / В.В. Яснецов // Авиакосм. эколог. мед. – 2007. – Т.41, №6. – С.5-12.
11. An X. Disorders of red cell membrane / X. An, N. Mohandas // Br. J. Haematol. – 2008. – Vol.141, №3. – P. 367-375.
12. Bennett V. Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin / V. Bennett, J. Healy // Trends Mol. Med. – 2008. – Vol.14, №1. – P. 28-36.
13. Butler J. Integral protein linkage and the bilayer-skeletal separation energy in red blood cells / J. Butler, N. Mohandas, R.E. Waugh // Biophys. J. – 2008. – Vol.95, №4. – P. 1826-1836.
14. Effect of glycyrrhetic acid on membrane band 3 in human erythrocytes / C. Fiore, L. Bordin, D. Pellati [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 2008. – Vol.479, №1. – P.46-51.
15. Phenylhydrazine as a partial model for beta-thalassaemia red blood cell hemodynamic properties / Y. Ramot, A. Koshkaryev, A. Goldfarb [et al.] // Br. J. Haematol. – 2008. – Vol.140, № 6. – P. 692-700.

Реферати

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНТИОКСИДАНТА МЕКСИДОЛА НА ФОРМУ ЭРИТРОЦИТОВ В ОПЫТАХ IN VITRO

Бабийчук Л.А., Важничая Е.М., Савельева О.В.,
Мокляк Е.В.

В опытах *in vitro* изучено действие изо- и гипоосмолярности среды на патологию формы эритроцитов и исследовано влияние на эти процессы синтетического антиоксиданта мексидола. Установлено, что в суспензиях эритроцитов, инкубированных 2 часа при +4, +20 и +37°C выявляются акантоциты, овалоциты, сфероциты и мишеневидные клетки, причем под действием гипоосмолярности закономерно уменьшается число акантоцитов без существенных изменений другой патологии формы эритроцитов. Мексидол, внесенный в пробы из расчета 100 мг/кг, в изотонической среде уменьшает как акантоцитоз, так и сфероцитоз, в гипотонических средах – действует только на акантоциты, что наиболее отчетливо проявляется при температурах +4 и +37°C.

Ключевые слова: эритроциты, патология формы, осмолярность среды, мексидол.

Стаття надійшла 7.12.09

INFLUENCE OF SYNTHETIC ANTIOXIDANT MEXIDOL ON ERYTHROCYTES SHAPE IN EXPERIMENTS IN VITRO

Babiychuk L.A., Vazhnichaya Ye.M., Savelieva
O.V., Mokliak Ye.V.

In the experiments *in vitro* it is studied the action of medium iso- and hypoosmolarity on pathology of red blood cells (RBC) shape as well as the influence of synthetic antioxidant mexitol on these processes. It is set that in the suspensions of RBC, incubated during 2 hours at +4, +20 and +37°C, acantocytes, elliptocytes, spherocytes and target cells are present, thus under the action of hypoosmolarity appropriately the number of acantocytes diminishes without the substantial changes of other pathology of RBC shape. Mexitol, added in tests from the ratio of 100 mg/kg, in isotonic media decreases both acantocytosis and spherocytosis, in hypotonic media – acts only on acantocytes, that most distinctly shows up at temperatures of +4 and +37°C.

Keywords: erythrocytes, pathology of shape, medium osmolarity, mexitol.