



УДК:615.262.1-018:576.8.094.7

Молекулярные и клеточные механизмы действия натрия 2-[(2,6-дихлорфенил)амино]фенилсалицилат на клеточные мембраны

Холодов Д.Б. Николаевский В.А. Шамарин С.Н.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила 20.10.2008 г.

Аннотация

На основании анализа данных по кислотной и осмотической резистентности эритроцитов крови в присутствии широкого диапазона концентраций диклофенака натрия ($0,7 \cdot 10^{-4}$; $1,7 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л) показано, что: указанное соединение обладает непосредственным повреждающим действием на биологические мембраны; выявлен его дозозависимый эффект повреждающего действия на мембраны эритроцитов: первый порог соответствует концентрациям $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л. и $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л., второй - концентрации $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л.; диклофенак натрия вызывает еще и скрытые повреждения в клеточных мембранах.

Ключевые слова: мембрана, эритроцит, натрия 2-[(2,6-дихлорфенил)амино]фенилсалицилат, диклофенак натрия, белок, нестероидное противовоспалительное средство

On the basis of the data analysis of acid and osmotic resistency of blood erythrocytes in the presence of a wide range of diclofenac sodium concentration ($0,7 \cdot 10^{-4}$; $1,7 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$ m/l) it is shown, that the mentioned above compound possesses a direct damaging action on biological membranes; it is revealed its dose-dependant effect of damaging action on erythrocytes membranes; the first threshold corresponds to concentration as $0,7 \cdot 10^{-4}$ m/l and $1,4 \cdot 10^{-4}$ m/l, the second - concentration $2,8 \cdot 10^{-4}$ m/l; diclofenac sodium also causes latent damages of cellular membranes, which can't be found out by other methods; diclofenac sodium probably causes an accelerated ageing of erythrocytes.

Key words: membrane, erythrocyte, Sodium 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenylsalicylate, diclofenac-natrium, protein, Non-steroid antiinflammatory drug

Введение

Современный период фармакологии характеризуется необходимостью проведения исследований на молекулярном уровне. Изучение повреждающего действия лекарственных веществ невозможно без выявления физико-химических процессов, определяющих возникновение соответствующих патологических реакций. Несмотря на несомненную клиническую эффективность, применение НПВС имеет свои ограничения вследствие повреждающего действия на слизистую оболочку желудка, паренхиму почек и печени [6].

По современным представлениям повреждающее действие НПВС на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), связано с основным механизмом их действия – тормозящим влиянием на активность фермента

циклооксигеназы, что приводит к уменьшению синтеза простагландинов и как следствие к снижению выработки защитной слизи и бикарбонатов[6].

В связи с вышеизложенным актуальным является вопрос изучения молекулярно-клеточных основ процесса взаимодействия натрия 2-[(2,6-дихлорфенил)амино]фенилсалицилат (диклофенак натрия, DF-Na) с биологическими структурами, особенно с компонентами плазматических мембран соматических клеток организма.

Целью настоящего исследования являлось выявить влияние ЛП Диклофенак на структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран и физико-химические свойства гемоглобина.

В задачи исследования входило изучить воздействие ЛП Диклофенак в концентрациях $0,7 \cdot 10^{-4}$; $1,7 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л на:

- 1) структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран
- 2) на физико-химические свойства гемоглобина.

Наиболее предпочтительным в качестве объекта исследования является использование эритроцитарных клеток и водные растворы гемоглобина, поскольку их структура к настоящему времени достаточно полно изучена и отражает состояние мембранолитических процессов в организме. Предметом исследования является гемолиз эритроцитов, денатурация гемоглобина и изменение его буферной емкости, модифицированных ЛП Диклофенак.

Материалы и методы

Мы использовали диклофенак натрия («Лотус Лабораториз Pvt. Ltd.», Индия) в концентрациях $0,7 \cdot 10^{-4}$; $1,4 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что соответствует ED_{25,50,100} Данные концентрации были получены в результате определения анальгетической активности на модели химического перитонита, вызванного уксусной кислотой.[3]. В опытах было использовано 50 беспородных белых мышей обоих полов, массой 20-30г. Полученные данные обработаны по методу «Наименьших квадратов» (пробит анализ)[5].

Суспензии эритроцитов получали по методу Л.А. Блюменфельда [1,2]. В опытах использовали кровь, полученную из хвостовых вен белых беспородных крыс (n=28), в количестве 1 мл с соблюдением требований по гуманному обращению с животными. Содержание клеток в образцах контролировали спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

Структурное состояние эритроцитов, модифицированных DF-Na, оценивали по изменению их осмотической резистентности в гипоосмотическом растворе NaCl[1,4].

Кинетику индуцированного DF-Na гемолиза эритроцитов изучали с помощью прибора КФК-3(ОАО Загорский оптико-механический завод г. Загорск). Для термостатирования кювет с исследуемыми образцами ($t^{\circ} = 24^{\circ} \text{C}$, $l = 10 \text{ мм}$) использовали термостат электрический суховоздушный ТС-1/80 СПУ(ООО «Научно-исследовательский институт медицинской инженерии» Москва) .

Степень влияния модификатора на физико-химические свойства белково-липидных комплексов плазматических мембран оценивали на модельной системе DF-Na - эритроциты - HCl по изменению химической резистентности эритроцитарных клеток к воздействию соляной кислоты ($0,1 \text{ моль/л}$) в изоосмотическом растворе NaCl ($0,85 \%$).

В качестве показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние гемоглобина, использовали величину буферной емкости его водных

растворов в диапазоне $\text{pH} = 3,0 - 11,5$, а также интенсивность светорассеяния нативных и термостатированных при $t = 40-60$ °С растворов белка [7,4].

Влияния DF-Na на физико-химические свойства белка оценивали на модельной системе DF-Na – гемоглобин по изменению оптической плотности и буферной емкости водных растворов гемоглобина [7,2].

Водно-солевые растворы оксигемоглобина в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л выделяли по методу Д.Л. Дробкина с модификацией Л.А. Блюменфельда из эритроцитов путем их осмотического гемолиза [1,7].

Полученный раствор гембелка разбавили до необходимой концентрации, которая контролируется спектрофотометрически с использованием формулы:

$$[\text{HbO}_2] = \frac{1,64 \times D_{576} + 0,64 \times D_{560} + 0,72 \times D_{540}}{10^4} \quad \text{где } [\text{HbO}_2] \text{ — концентрация}$$

оксигемоглобина; D_{576} , D_{560} , D_{540} — значения оптической плотности исследуемого раствора оксигемоглобина при длинах волн 576, 560 и 540 нм соответственно [1].

Кинетику оптической плотности белка изучали с помощью прибора КФК-3 (ОАО Загорский оптико-механический завод, Загорск). Для термостатирования кювет с исследуемыми образцами ($t^\circ = 55$ °С, $l = 10$ мм) использовали термостат электрический суховоздушный ТС-1/80 СПУ (ООО «Научно-исследовательский институт медицинской инженерии» Москва).

Кинетику буферных свойств гемоглобина оценивали с помощью прибора рН-метр рН-150М (РУП «Гомельский завод измерительных приборов»).

Анализ данных показал, что в гипоосмотической среде максимальная скорость гемолиза эритроцитов, модифицированных DF-Na в концентрациях $0,7 \cdot 10^{-4}$; $1,4 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л практически не зависит от содержания модификатора в инкубационной среде. В тоже время при повышении концентрации DF-Na в инкубационной среде увеличивается доля гемолизированных эритроцитов. При увеличении концентрации DF-Na в кислотной среде наблюдается увеличение скорости гемолиза эритроцитов, это свидетельствует о снижении кислотной резистентности эритроцитов, модифицированных DF-Na.

Обсуждение результатов

Для характеристики кислотной резистентности эритроцитов использовали величину K_{max} , которая характеризует долю эритроцитов одновременно вступивших в стадию гемолиза. Увеличение K_{max} свидетельствует об увеличении количества средне- и высокостойких эритроцитов, которые одновременно вступают в стадию гемолиза. По результатам исследования построен график зависимости K_{max} от времени инкубации – рис 1.

При добавлении в суспензию эритроцитов DF-Na в концентрации $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л регистрировали повышение значения K_{max} ($K_{\text{max}}^0 = 1,1106$; $K_{\text{max}}^{15} = 1,881$; $K_{\text{max}}^{30} = 2,216$; $K_{\text{max}}^{60} = 3,271$) что объясняется увеличением количества эритроцитов, вовлечённых в процесс гемолиза при длительности инкубации в течение времени с 0 до 60 мин, а снижение показателя K_{max} после их инкубации в течение времени 120 – 240 мин ($K_{\text{max}}^{120} = 1,804$; $K_{\text{max}}^{240} = 1,4826$) свидетельствует о повышении степени модификации «средних» и «молодых» эритроцитов DF-Na, что приводит к увеличению степени дифференцировки эритроцитарных клеток по отношению кислотному гемолитику. Из этого следует, что увеличение времени инкубации ведет

увеличению барьера проницаемости мембраны, модифицированной ЛП, к H^+ -ионам. Пик K_{max} для этой концентрации регистрируется при времени инкубации 60 мин.

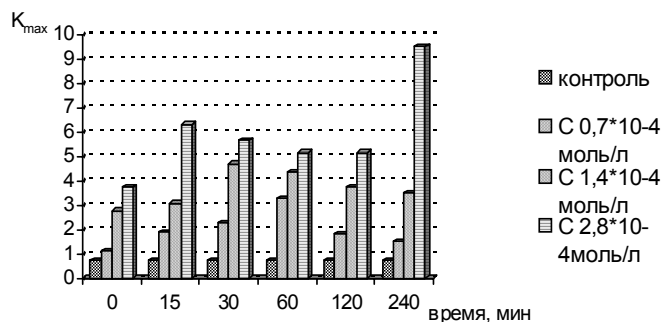


Рис. 1. Зависимость K_{max} кислотного гемолиза эритроцитов от времени инкубации

При добавлении в рабочую взвесь эритроцитов DF-Na в концентрации $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л. от 0 до 30 мин регистрировали увеличение значения K_{max} ($K_{max}^0=2,747$; $K_{max}^{15}=3,078$; $K_{max}^{30}=4,705$) что обусловлено увеличением количеством модифицированных ЛП эритроцитов со сходными структурными изменениями. В данном случае пик значения K_{max} формируется после инкубации в течение времени 30 мин. При более длительной инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, (60 – 240 мин) зарегистрировано снижение максимальной скорости гемолиза эритроцитов ($K_{max}^{60}=4,35$; $K_{max}^{120}=3,732$; $K_{max}^{240}=3,487$) что указывает на повышение степени дифференцировки «средних» и «молодых» эритроцитов по отношению к кислотному гемолитику. Это по нашему мнению обусловлено образованием большого количества комплексов DF-Na – белок, что приводит к повышению порога проницаемости мембраны к ионам H^+ .

При добавлении к эритроцитам DF-Na в концентрации $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л. регистрировали увеличение значения K_{max} при длительности инкубации в течение времени от 0 до 15 мин ($K_{max}^0=3,732$; $K_{max}^{15}=6,314$) что объясняется вовлечением большего количества эритроцитов в процесс гемолиза. Затем при инкубации в течение времени от 30 до 120 мин наблюдается снижение данного показателя ($K_{max}^{30}=5,641$; $K_{max}^{60}=5,145$; $K_{max}^{120}=5,145$), это свидетельствует о повышении степени модификации «средних» и «молодых» эритроцитов DF-Na, что приводит к увеличению степени дифференцировки эритроцитарных клеток по отношению к кислотному гемолитику. Из этого следует, что увеличение времени инкубации ведет к увеличению барьера проницаемости мембраны, модифицированной ЛП, к H^+ -ионам. Пик K_{max} для этой концентрации регистрируется при времени инкубации 15 мин. После инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, в течении 240 мин регистрировали наибольшую скорость распада эритроцитов при их взаимодействии с H^+ - ионами. Это по всей вероятности обусловлено высокой структурной однородностью как «средних» так и «молодых» эритроцитов после длительного взаимодействия с ЛП. При этом произошло выравнивание величины барьера проницаемости мембран «средних» и «молодых» эритроцитов для ионов H^+ .

Таким образом можно предположить, что модифицирующее действие DF-Na связано с химическим связыванием с белково-липидными комплексами. Что ведет к возникновению повреждений в мембране и снижению относительно контроля порога проницаемости йонов H^+ .

На следующем этапе была изучена зависимость сфероцитоза эритроцитов от длительности воздействия и содержания в инкубационной среде DF-Na ($G_{сф}$) отражающее количество эритроцитов, вовлекаемых в стадию сфероцитоза. По

результатам исследования построен график зависимости $G_{сф}$ от времени инкубации суспензии эритроцитов – Рис.2.

При добавлении в суспензию эритроцитов DF-Na в концентрации $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л регистрировали последовательное снижение $G_{сф}$ во время инкубации от 0 мин. до 60 мин ($G_{сф}^0=7,56\%$; $G_{сф}^{15}=2,63\%$; $G_{сф}^{30}=2,28\%$; $G_{сф}^{60}=1,81\%$) что объясняется ускорением перехода от стадии сфероцитоза к собственно гемолизу эритроцитов, вследствие увеличения повреждений в мембране. При времени инкубации 120 мин. наблюдается увеличение относительного количества сфероцитов ($G_{сф}^{120}=5,24\%$) за счет вовлечения в процесс сфероцитоза субпопуляции среднестойких эритроцитов.

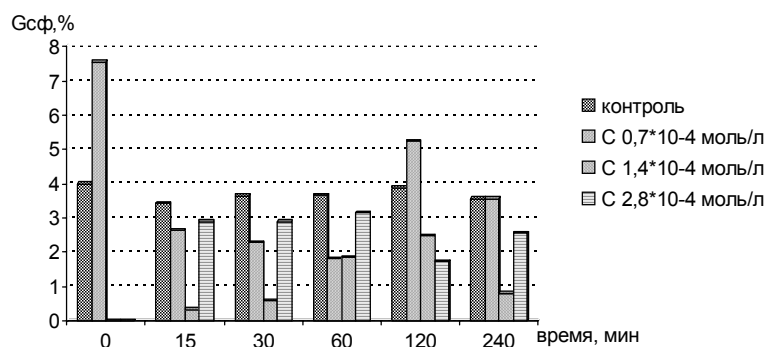


Рис. 2. Зависимость $G_{сф}$ кислотного гемолиза эритроцитов от времени инкубации

А снижение $G_{сф}$ при 240 мин ($G_{сф}^{240}=3,56\%$) говорит о более быстром переходе, в том числе и субпопуляции среднестойких эритроцитов, от стадии сфероцитоза к собственно гемолизу эритроцитов, вследствие увеличения повреждений в мембране. Без инкубации суспензии эритроцитов, модифицированных DF-Na ($t_{инкуб}$ 0 мин), увеличение относительного количества сфероцитов, по сравнению с контролем ($\Delta G_{сф}^0=3,55\%$), объясняется вовлечением большего числа «старых» эритроцитов в стадию сферуляции. Снижение данного показателя при инкубации взвеси эритроцитов в течение времени 15-60 мин. ($\Delta G_{сф}^{15}=-0,81\%$; $\Delta G_{сф}^{30}=-1,36\%$; $\Delta G_{сф}^{60}=-1,87\%$) также свидетельствует об ускорении перехода от стадии сфероцитоза к собственно гемолизу эритроцитов, вследствие увеличения повреждений в мембране. О вовлечение в процесс сферуляции субпопуляции среднестойких эритроцитов при длительности инкубации в течении 120 мин. свидетельствует увеличение показателя $G_{сф}$ относительно контроля ($\Delta G_{сф}^{120}=1,37\%$). Однако при увеличении инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, до 240 мин, снижение $G_{сф}$ до уровня контроля свидетельствует о более быстром переходе субпопуляции среднестойких эритроцитов от стадии сфероцитоза к собственно гемолизу эритроцитов, вследствие увеличения повреждений в мембране.

При добавлении в суспензию эритроцитов DF-Na в концентрации $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л выявлено резкое укорочение фазы сферуляции эритроцитов, относительно контроля, при времени инкубации 0 мин ($\Delta G_{сф}^0=-4,008\%$). это объясняется большим повреждающим действием данного препарата на «старые» эритроциты. В течение времени инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, от 15 до 120 мин. наблюдается постепенное нарастание относительного количества сфероцитов ($G_{сф}^{15}=0,32\%$; $G_{сф}^{30}=2,28\%$; $G_{сф}^{60}=1,85\%$; $G_{сф}^{120}=2,48\%$), что свидетельствует о вовлечении в процесс сферуляции субпопуляции среднестойких эритроцитов и постепенном увеличении их количества. Снижение же этого показателя при

инкубации 240 мин. ($G_{\text{сф}}^{240}=0,796\%$) свидетельствует о более быстром переходе, в том числе и субпопуляции среднестойких эритроцитов, от стадии сфероцитоза к собственно гемолизу эритроцитов, вследствие увеличения повреждений в мембране.

При добавлении в суспензию эритроцитов DF-Na в концентрации $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л нами установлено:

1) выраженное снижение относительного количества сфероцитов, относительно контроля, при инкубации 0 мин. ($\Delta G_{\text{сф}}^0=-4,008\%$), это объясняется большим повреждающим действием данного препарата на «старые» эритроциты;

2) вовлечение в процесс сферуляции субпопуляции среднестойких эритроцитов, но в большем количестве, чем при добавлении в рабочую взвесь эритроцитов DF-Na в разведении $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л при инкубировании в течение времени 15 – 60 мин. ($G_{\text{сф}}^{15}=2,90\%$; $G_{\text{сф}}^{30}=2,90\%$; $G_{\text{сф}}^{60}=3,15\%$).

Снижение значения $G_{\text{сф}}$ во время инкубации суспензии эритроцитов, модифицированных DF-Na, в течение 120 мин. ($G_{\text{сф}}^{120}=1,73$), свидетельствует о более быстром переходе, от стадии сфероцитоза к собственно гемолизу эритроцитарных клеток, вследствие увеличения повреждений в мембране. В течение времени инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, 240 мин. регистрируется увеличение относительного количества сфероцитов ($G_{\text{сф}}^{240}=2,55\%$), что говорит о вовлечении в процесс сферуляции субпопуляции высокостойких эритроцитов.

По результатам анализа максимальной скорости гипоосмотического гемолиза построен график зависимости K_{max} от времени инкубации – рис.3

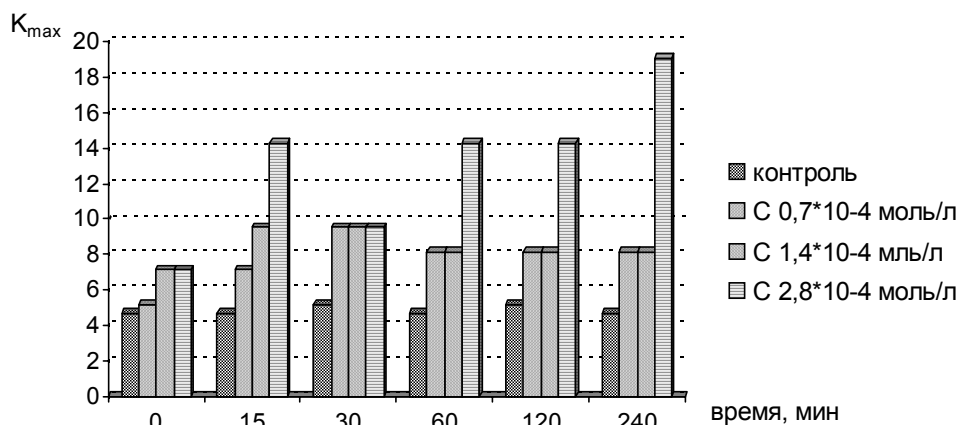


Рис. 3. Зависимость K_{max} гипоосмотического гемолиза эритроцитов от времени инкубации

При использовании DF-Na в концентрации $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л. регистрируется рост доли эритроцитов, вовлеченных в процесс гемолиза, относительно контроля при инкубации в течение времени от 0 до 30 мин. ($\Delta K_{\text{max}}^0=0,44$; $\Delta K_{\text{max}}^{15}=2,41$; $\Delta K_{\text{max}}^{30}=4,37$), что объясняется увеличением числа эритроцитов со скрытыми дефектами в результате более длительного воздействия модификатора на эритроцитарные мембраны. Снижение данного показателя при инкубации в течение времени от 60 до 240 мин. ($\Delta K_{\text{max}}^{60}=3,44$; $\Delta K_{\text{max}}^{120}=2,99$; $\Delta K_{\text{max}}^{240}=3,44$) свидетельствует о вовлечении в процесс гемолиза более устойчивой субпопуляции эритроцитов, то есть возникновение у них скрытых дефектов в мембране при взаимодействии с модификатором.

При добавлении в суспензию эритроцитов DF-Na в концентрации $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л. в течение времени инкубации 0-15 мин. наблюдается сходная с предыдущей

картина, но количество эритроцитов, вовлеченных в процесс гемолиза, увеличивается и относительно контроля ($\Delta K_{\max}^0=2,41$; $\Delta K_{\max}^{15}=5,109$) и относительно концентрации $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л ($\Delta K_{\max}^0=1,97$; $\Delta K_{\max}^{15}=2,699$). Это может говорить о более сильном повреждающем действии модификатора на мембраны эритроцитов. Исключение составляет время инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, 30 мин. где регистрируется одинаковое число эритроцитов, вовлеченных в процесс гемолиза, при добавлении в рабочую взвесь эритроцитов DF-Na в разведении $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л ($\Delta K_{\max}^{30}=0$). Что возможно объясняется эффектом насыщения связей с белковыми структурами мембраны. Снижение параметра K_{\max} при времени инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, 60-240 мин ($K_{\max}^{60}=8,156$; $K_{\max}^{120}=8,144$; $K_{\max}^{240}=8,144$) объясняется вовлечением в процесс гемолиза более устойчивой субпопуляции эритроцитов, то есть возникновение у них скрытых дефектов в мембране под воздействием модификатора. Регистрация одинакового числа эритроцитов, вовлеченных в процесс гемолиза, при добавлении в рабочую взвесь эритроцитов DF-Na в концентрации $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л., $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л. подтверждает эффект насыщения связей с белковыми структурами мембраны.

При добавлении в суспензию эритроцитов DF-Na в концентрации $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л так же наблюдается насыщение связей с белковыми структурами мембраны. При инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, в течении времени 15 мин. наблюдается увеличение показателя K_{\max} относительно контроля и концентраций $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л ($\Delta K_{\max}^{15} \text{ к.} = 9,6$; $\Delta K_{\max}^{15} \text{ к1} = 7,185$; $\Delta K_{\max}^{15} \text{ к2} = 4,486$), что объясняется увеличением числа эритроцитов со скрытыми дефектами в результате более длительного воздействия модификатора на эритроцитарные мембраны. Снижение показателя K_{\max} при инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, в течение времени 30 мин. ($K_{\max}^{30}=9,814$) свидетельствует о вовлечении в процесс гемолиза более устойчивой субпопуляции эритроцитов, то есть возникновение у них скрытых дефектов в мембране под воздействием модификатора. Рост K_{\max} при инкубации эритроцитов, модифицированных DF-Na, в течение времени 60-240 мин ($K_{\max}^{60-120}=14,3$; $K_{\max}^{240}=19,08$) свидетельствует об увеличении числа эритроцитов более устойчивой субпопуляции в процесс гемолиза, это можно объяснить тем, что модификатор в данной концентрации вызывает наибольшее количество скрытых повреждений в мембране эритроцитов.

По результатам анализа относительного количества гемолизированных эритроцитов, модифицированных DF-Na, в осмотическом гемолизе построен график зависимости G_{\max} от времени инкубации - рис. 4.

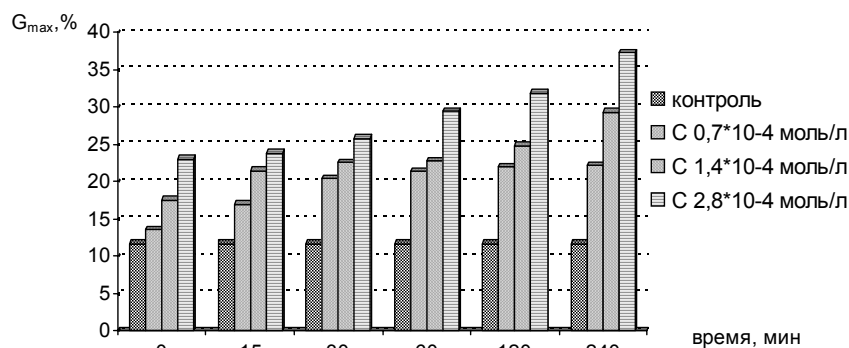


Рис. 4. Зависимость G_{\max} гипосмотического гемолиза эритроцитов от времени инкубации

Анализ данного параметра свидетельствует, что при увеличении концентрации DF-Na и времени инкубации количество гемолизированных эритроцитов возрастает пропорционально увеличению концентрации и времени инкубации. Что объясняется увеличением числа эритроцитов со скрытыми дефектами в мембране при их модификации DF-Na.

На следующем этапе исследования было изучено влияния температуры и DF-Na, в различных концентрациях на оптические свойства оксигемоглобина. Результаты приведены на графике – Рис.5.

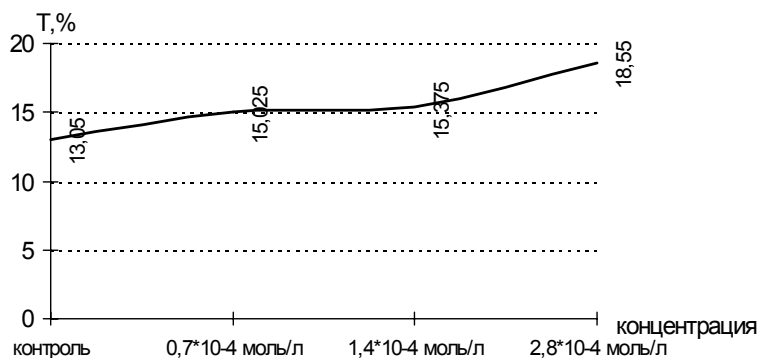


Рис. 5. Влияние диклофенака натрия на оптические свойства Hb

При действии DF-Na в концентрации $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л на белок разница между глубиной денатурации интактного и модифицированного Hb составила 15,13 %, 17,82 %, 42,15 % соответственно. Увеличение параметра светопропускания вызвано снижением числа внутримолекулярных связей (водородных), стабилизирующих пространственную структуру белка, то есть DF-Na химически активен.

Анализ буферной емкости оксигемоглоина, модифицированного DF-Na показал увеличение объема титранта (0,1M NaOH), пошедшего на титрование растворов оксигемоглобина, модифицированных DF-Na в концентрациях $0,7 \cdot 10^{-4}$; $1,4 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л, относительно контроля на 17,6%, 24,7%, 29,1% соответственно. – рис. 6

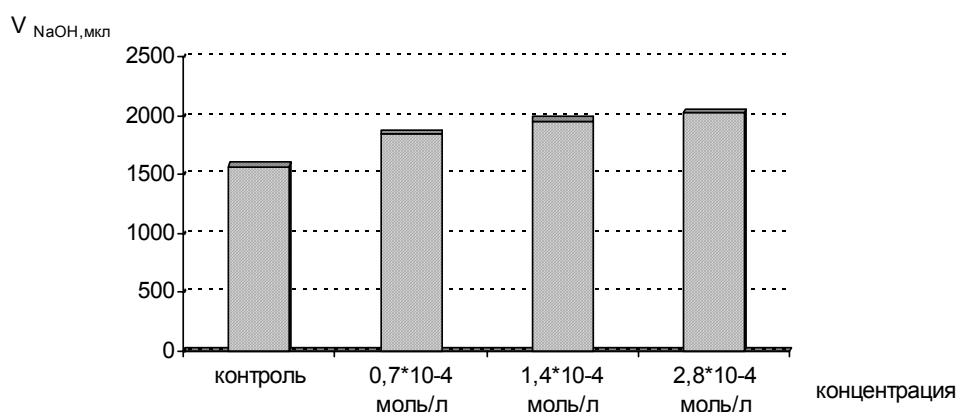


Рис. 6. Зависимость V_{NaOH} , пошедшего на титрование водного раствора Hb, от концентрации диклофенака натрия

Известно, что интервалы pH 3-5; 5-9; 9-11 отвечают за потенциометрическое титрование COO^- , гистамина, лизина и тирозина. Причем на диаграмме - Рис. 7 показано, что связь DF-Na с COO^- группами незначительна (ΔV_{NaOH}

4,6%.13,9%,14,1%). В основном DF-Na связывается с гистидином, лизином и тирозином (ΔV NaOH 21,1-21,6%; 28,8-30,9%; 34,8-35,0%).

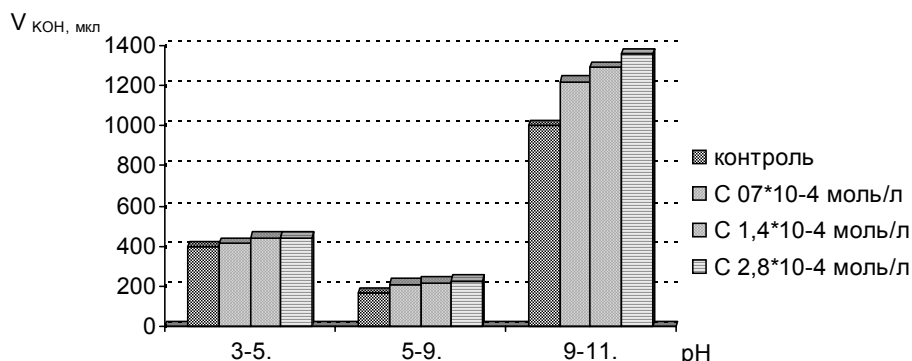


Рис. 7. Буферная емкость Hb, модифицированного диклофенаком натрия

Таким образом, при модификации водных растворов гемоглобина DF-Na буферная емкость белковых растворов увеличивается, что свидетельствует о конформационных изменениях, то есть разворачивание молекулы гемоглобина и следовательно увеличение числа ионогенных групп, способных к диссоциации. Следовательно – модификатор вызывает разворачивание молекул (денатурацию) гемоглобина вследствие разрушения или ослабления внутримолекулярных связей, стабилизирующих молекулу; кроме того возможна конформация модификатора с водородными связями внутри белковой глобулы, что также может приводить к денатурации белка, за счет ослабления или разрыва водородных связей. Причем данные изменения пропорциональны увеличению концентрации DF-Na.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов нами установлено:

1) DF-Na обладает непосредственным повреждающим действием на биологические мембраны, не связанным с блокадой фермента циклооксигеназы. А также установлен дозозависимый эффект повреждающего действия на мембраны эритроцитов.

2) DF-Na вызывает еще и скрытые повреждения в клеточных мембранах, не обнаруживаемые другими методами;

3) DF-Na вызывает необратимую денатурация белка, обусловленную снижением числа внутримолекулярных (водородных) связей, стабилизирующих пространственную структуру белка, то есть, лекарственный препарат химически активен. Причем степень денатурации зависит от концентрации.

4) Химическое связывание DF-Na с белковыми глобулами обусловлено взаимодействием, в основном, с гистидином, лизином и тирозином.

Список литературы

1. Артюхов В.Г., Резван С.Г., Гусинская В.В. и др. Структурные свойства эритроцитов и функциональная активность системы комплемента крови больных с различными формами нефропатии. // Вестник ВГУ. – 2000. – №1. – С. 130 – 133.

- 2.Блюменфельд Л.А. Биофизика. – М. Наука. 1972. – 954 с.
- 3.Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. – М. Медицина. 1974. – 143 с.
- 4.Гительзон И.И., Терсков И.А. Состав красной крови в норме и патологии. – Томск. Издательство Томского университета. 1960. – 200с.
- 5.Кудрин А.Н. Применение математики в экспериментальной клинической медицине. – М. Медицина. 1967. – 350 с.
- 6.Насонов Е.Л. Ревматология 2005: Клинические рекомендации. – М. Гэотар Медицина. 2005. – 288 с.
- 7.Резван С Г., Вашанов Г.А., Лавриненко И.А. и др. Молекулярные механизмы взаимодействия гемоглобина с серотонином.// Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2004. – Т.90. №8. – С. 46 – 47.

Николаевский Владимир Анатольевич – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии фармацевтического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел. (4732)53-03-80

Холодов Дмитрий Борисович - аспирант кафедры фармакологии фармацевтического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел. (4732)53-03-80

Шамарин Сергей Николаевич – студент фармацевтического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж

Nikolaevsky Vladimir.A. - Doctor of medicine, professor, head of chair pharmacology, Pharmaceutical faculty, Voronezh state university, Voronezh

Holodov Dmitriy B. - postgraduate of chair pharmacology, Pharmaceutical faculty, Voronezh state university, Voronezh e-mail: holodov@pharm.vsu.ru

Shamarin Sergey N. - student, Pharmaceutical faculty, Voronezh state university, Voronezh