

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Важнича О.М.
УДК 615

ДО ПИТАННЯ ПРО ДЕЯКІ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ 2-ЕТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ОКСИПІРИДИНУ СУКЦИНАТУ

Важнича О.М.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Цель исследования – изучить в опытах in vitro влияние 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцината (мексидола) на асимметрию мембран и белки цитоскелета эритроцитов (Эр). 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат прибавляли к тест-системам до концентрации 0,39 мМ. Дизайн эксперимента включал инкубацию Эр в 154 мМ и 77 мМ забуференных растворах натрия хлорида с препаратом или без него (контроль) при 37°С в течение 2 часов с последующим электрофорезом белков цитоскелета и цитофлюориметрией. Показано, что в гипотонической среде препарат уменьшает число Эр с нарушенной фосфолипидной асимметрией мембраны по сравнению с контролем. В этих условиях он модифицирует спектрин-актиновый комплекс и вертикальные связи мембрана-цитоскелет, опосредованные анкирином.

Ключевые слова: 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат, мексидол, эритроцит, цитоскелет, асимметрия мембраны.

Робота є фрагментом планової ініціативної НДР «Пошук засобів та біологічно активних речовин з числа похідних 2-оксоіндолу та 3-оксипіридину для фармакокорекції адаптивних процесів при порушеннях гомеостазу різної етіології» (№ державної реєстрації 0111U004879).

Відомо, що клітинна мембрана еритроцитів є високо динамічною і модулюється компонентами цитоскелету, які утворюють під мембраною сітку філаментів, безпосередньо зв'язаних з її внутрішньою поверхнею [8]. Кооперація мембрани й цитоскелету еритроцитів зумовлює їх форму, еластичність та резистентність до ушкоджуючих факторів [14, 16], тому вона інтенсивно вивчається за умов експериментальної та клінічної патології [5, 6, 15]. Теоретичне і практичне значення мають дослідження, що стосуються впливу фармакологічних засобів на внутрішню будову еритроцитів [4, 9]. Оскільки встановлено, що оксидативний стрес відіграє значну роль у модифікації мембрано-цитоскелетного комплексу [11, 12], цілком зрозуміло необхідність вивчення впливу антиоксидантів на ці процеси. До числа таких препаратів належить 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинат, або мексидол [3].

Дані літератури й результати попередніх досліджень показали, що мексидол підвищує стійкість еритроцитів до гемолізу, ініційованого механічними та осмотичними факторами [3]. Описано, що препарат модифікує форму еритроцитів за умов ізо- та гіпоосмолярності [1]. Однак питання про його вплив на асиметрію мембран та білки цитоскелету еритроцитів раніше не досліджувалось.

Мета роботи – вивчити в дослідях in vitro вплив 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату на асиметрію мембран та білки цитоскелету еритроцитів.

Матеріали і методи дослідження

Експерименти проведені з використанням крові 12 інтактних білих щурів-самців лінії Вістар масою 180-200 г, які утримувались за стандартних умов віварію ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Кров одержували пункцією порожнин серця під ефірним наркозом за загальноприйнятою методикою [2] й стабілізували гепарином. Еритроцити, двічі відмиті стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду (NaCl), суспендували в ізотонічному (154 мМ) та гіпотонічному (77 мМ) розчинах NaCl, забуферених фосфатним буфером до pH=7,4, у співвідношенні 1:2, що відповідає гематокриту. Згрупування дослідів мало наступний вигляд: 1 – еритроцити, суспендовані в ізотонічному розчині NaCl; 2 – еритроцити, суспендовані в ізотонічному розчині NaCl, з додаванням 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату; 3 – еритроцити, суспендовані в гіпотонічному розчині NaCl; 4 – еритроцити, суспендовані в гіпотонічному розчині NaCl, із додаванням 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату. У кожній групі було по 3-4 зразки. 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинат додавали до модельних систем у такій кількості, щоб його концентрація в пробі становила 0,39 мМ і відповідала тій, яка можлива в організмі при введенні й рівномірному розподілі ефективної дози 100 мг/кг маси. Усі зразки інкубували 2 години при +37°С і використовували для визначення молекулярно-біологічних параметрів.

Ступінь порушення асиметрії мембрани еритроцитів оцінювали за зв'язуванням анексину V з фосфатидилсерином на зовнішній поверхні мембрани мембрани еритроциту методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитометрі FACS Calibur фірми Becton Dickinson (США) [13]. У ході роботи використовували набір Annexin V-FITC detection KIT I фірми BD у відповідності з Annexin V-FITC staining protocol. Для мінімізації помилки в пробі аналізували 500000 подій. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення фірми BD - CELLQuest Pro.

Тест-системи, що містять еритроцити в ізо- та гіпотонічному середовищі з додаванням 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату або без нього, також використовували для дослідження білків цитоскелету червонокривців. З цією метою клітини піддавали гемолізу, відмивали струмою від гемоглобіну і одержували «білі тіні» [10]. Електрофорез білків проводили в плоских вертикальних поліакриламідних гелях [10]. Зразки вносили по 20 мкл у комірки стартового гелю і розділяли при силі струму 25 мА протягом 12-15 годин, після чого одержані гелі фіксували 2 години в 10% розчині трихлороцтової кислоти. Білки фарбували Coomassie R-250 при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Оцінку відносного вмісту білків проводили

за допомогою денситометру та програми для персонального комп'ютера. Ідентифікацію білків здійснювали з використанням набору стандартних маркерних білків фірми Fluka. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерних програм Stat Graphics.

Дослідження асиметрії мембран і білків цитоскелету еритроцитів проведені на базі відділу кріоцитології та кількісної морфології Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків (зав. відділу – проф Л.О. Бабійчук) за консультативної та методичної допомоги проф. Л.О. Бабійчук та к.б.н. П.М. Зубова.

Результати та їх обговорення

Електрофоретичне дослідження показало, що інкубація еритроцитів у гіпотонічному розчині NaCl позначається на інтенсивності смуг електрофореграм та висоті відповідних піків денситограм у порівнянні з такими для еритроцитів, інкубованих в ізотонічному розчині NaCl (рис. 1), що свідчить про порушення взаємодії між білками мембрано-цитоскелетного комплексу і узгоджується з даними літератури стосовно ролі гіпоосмолярності в процесах еритроптозу [11].

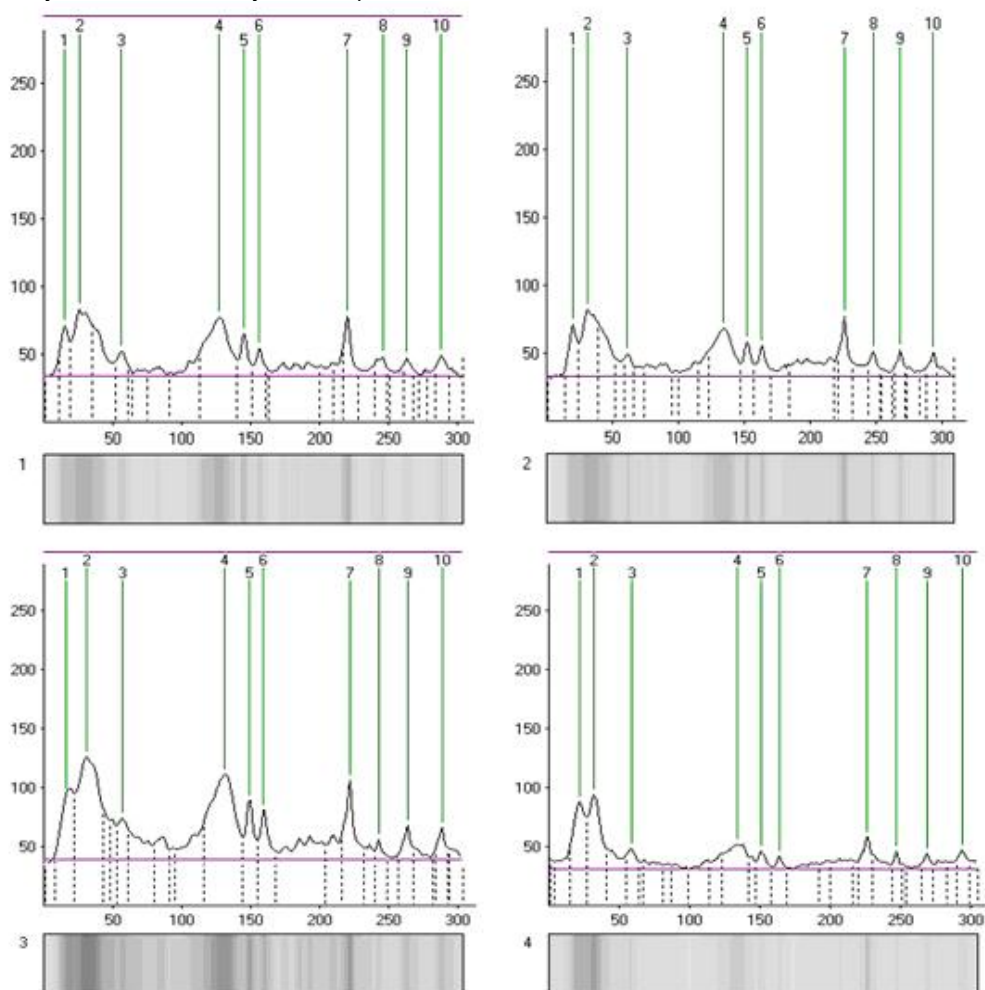


Рис. 1. Електрофореграми та денситограми білків цитоскелету еритроцитів при інкубації в ізотонічному розчині NaCl без препарату (1) та з 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинатом (2); у гіпотонічному розчині NaCl без препарату (3) та з 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинатом (4).

Внесення в модельні системи 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату створює відмінності між електрофореграмами в дослідних і контрольних зразках, що особливо помітно за умов гіпотонічного середовища (див. рис. 1).

Результати кількісного аналізу денситограм наведено в табл. 1. Вони свідчать, що вміст основних білків цитоскелету еритроцитів, інкубованих у ізотонічному розчині NaCl із додаванням похідного 3-оксипіридину, практично не відрізняється від такого в ізотонічному середовищі без препарату.

Таблиця 1
Вплив 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату (мексидолу) на вміст основних білків цитоскелету еритроцитів в ізотонічному та гіпотонічному середовищі (M±m)

Білки цитоскелету	Вміст білків цитоскелету залежно від модельної системи, %			
	154 мМ розчин NaCl	154 мМ розчин NaCl+ препарат	77 мМ розчин NaCl	77 мМ розчин NaCl + препарат
Спектрин-α	11,67±1,7	11,5±1,34	10,52±0,60	12,8±0,53*
Спектрин-β	15,78±1,25	16,03±0,87	18,38±0,57	15,19±0,98*
Анкірин	3,98±0,33	3,87±0,56	3,88±0,10	4,24±0,14
Білок смуги 3	15,9±1,3	14,57±0,21	16,22±1,59	15,32±0,3
Білок смуги 4.1	3,6±0,09	3,96±0,28	4,23±0,42	3,90±0,5
Білок смуги 4.2	3,15±0,35	3,20±0,45	3,03±0,49	3,09±0,3
Білок смуги 5	5,91±0,7	5,72±0,67	5,41±0,75	5,29±0,63
Білок смуги 6	1,9±0,21	2,10±0,16	1,87±0,07	1,99±0,11
Білок смуги 7	2,17±0,33	2,24±0,18	2,13±0,16	1,99±0,06
Білок смуги 8	2,83±0,04	2,39±0,27	2,12±0,42	2,30±0,48

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем (модельна система без препарату).

Гіпотонія середовища викликає тенденцію до підвищення вмісту спектрину-β ($p < 0,25$) у порівнянні із таким у цитоскелеті еритроцитів, інкубованих в ізотонічному розчині NaCl, за відсутності інших вірогідних змін (див. табл.1). На цьому фоні додавання мексидолу збільшує вміст спектрину-α на 2,3% ($p < 0,05$), зменшує вміст спектрину-β на 3,2% ($p < 0,05$) та підвищує вміст анкірину на 0,4% ($p < 0,25$) за відсутності статистично значущих відмінностей між іншими фракціями у дослідних та контрольних зразках.

Отже, за умов впливу на еритроцити гіпотонії 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинат змінює вміст окремих ключових фракцій білків цитоскелету еритроцитів. З огляду на роль цих білків (спектрин, анкі-

рин) [8], можна вважати, що виявлені зміни стосується спектрин-актинового комплексу та вертикальних зв'язків мембрана-цитоскелет, опосередкованих анкірином.

Графічні зображення розподілу «подій» при цитофлюориметричному визначенні зв'язування анексину з V фосфатидилсерином на зовнішній поверхні мембрани мембран еритроцитів у пробах кожної з груп представлені на рис. 2 і демонструють існування відмінностей у стані клітинних мембран як між впливом на еритроцити ізотонії та гіпотонії (рис. 2, проби 1 та 3), так і між ним та ефектом похідного 3-оксипіридину (рис. 2, проби 1 – 2 та 3 – 4).

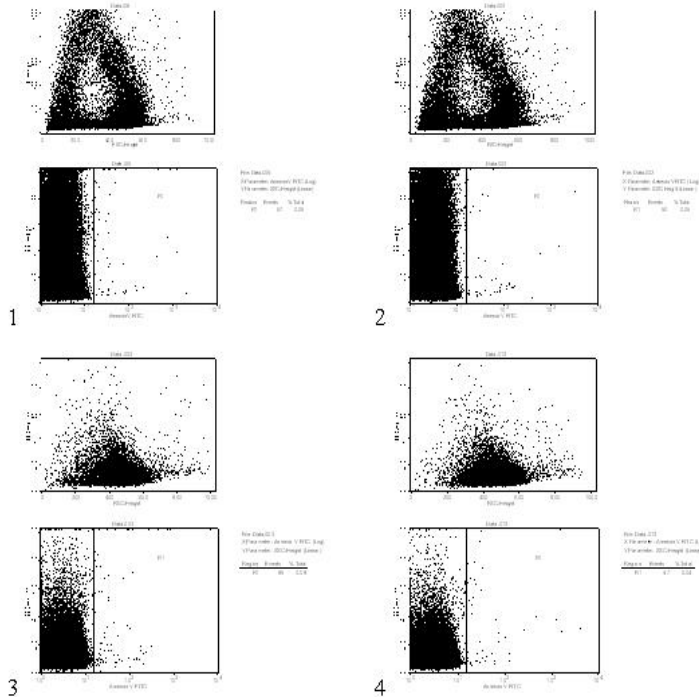


Рис. 2. Зв'язування анексину з V фосфатидилсерином на зовнішній поверхні мембрани мембран еритроцитів (розподіл «подій», цитофлюориметрія) при інкубації в ізотонічному розчині NaCl без препарату (1) та з 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинатом (2); у гіпотонічному розчині NaCl без препарату (3) та з 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинатом (4).

Показано, що після інкубації еритроцитів у ізотонічному середовищі частка клітин, які експресують фосфатидилсерин на зовнішній поверхні мембрани, становить $0,043 \pm 0,003\%$. В аналогічній модельній системі із додаванням 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату цей показник дорівнює $0,050 \pm 0,001\%$, тобто має тенденцію ($p < 0,1$) до збільшення у порівнянні з контролем.

Після інкубації еритроцитів у гіпотонічному середовищі вміст клітин із порушеною асиметрією мембран становить $0,057 \pm 0,003\%$. Це в 1,3 рази більше в порівнянні з ізотонічним середовищем ($p < 0,05$) і, вочевидь, може вважатись наслідком ушкоджуючої дії низької концентрації NaCl. За умов гіпотонії із додаванням похідного 3-оксипіридину даний показник становить $0,047 \pm 0,002\%$, що в 1,2 рази менше, ніж у контролі ($p < 0,05$).

Таким чином, за умов гіпотонії інкубаційного середовища 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинат сприяє зменшенню кількості еритроцитів з порушеною асиметрією мембран, а за умов ізотонії – демонструє протилежну тенденцію, що потребує подальшого дослідження.

Виявлені ефекти 2-етил-6-метил-3-оксипіридину стосовно асиметрії мембрани та мембрано-цитоскелетного комплексу можуть бути поєднані в єдиний механізм, якщо взяти до уваги, що зв'язування спектрину з фосфатидилхоліном забезпечує механічну стабільність мембрани [7]. Вочевидь, модифікуючи спектрин-актиновий комплекс та вертикальні зв'язки мембрана-цитоскелет, опосередковані анкірином, досліджене похідне 3-оксипіридину сприяє «утриманню» фосфатидилсерину на внутрішній поверхні мембрани еритроциту і в такий спосіб підвищує резистентність червонокривців до гіпоосмолярності, механічних та термічних факторів, що було описано раніше [1, 3]. Експериментальна перевірка цієї робочої гіпотези становитиме напрямок наших подальших досліджень.

Висновки

1. Внесення 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату (мексидолу) в гіпотонічне середовище до концентрації $0,39$ мМ призводить до модифікації взаємодій між білками мембрано-цитоскелетного комплексу еритроцитів, що стосується спектрин-актинового комплексу та вертикальних зв'язків мембрана-цитоскелет, опосередкованих анкірином.

2. 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинат ($0,39$ мМ) за умов гіпотонії інкубаційного середовища сприяє зменшенню експресії фосфатидилсерину на зовнішній поверхні мембран еритроцитів.

Література

1. Вплив синтетичного антиоксиданта мексидолу на форму еритроцитів у дослідях *in vitro* / Л.О. Бабійчук, О.М.

- Важнича, О.В. Савельєва та [ін.] // Світ медицини і біології. – 2010. – №.1 – С. 6-9.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації / наук. ред. Стефанов О.В.]. – К.: Авіцена, 2001. – 527 с.
 3. Дюмаев К.М. Антиоксиданти в профілактике и терапии патологии ЦНС / К.М. Дюмаев, Т.А. Воронина, Л.Д. Смирнов. – М.: Изд. Ин-та биомедицинской химии РАМН, 1995. – 272 с.
 4. Землянских, Н.Г. Изменения в мембранно-цитоскелетном комплексе эритроцитов, индуцированные диметилсульфоксидом, полиэтиленгликолем и низкой температурой / Н.Г. Землянских, О.Н. Денисова. – // Биофизика. – 2009. – Т.54, №4. – С.693-703.
 5. Сибірна Н.О. Порушення спектра протеїнів мембран еритроцитів при цукровому діабеті 1-го типу / Н.О. Сибірна, Т.В. Буслик // Український біохімічний журнал – 2009. – Т. 81, №6. – С. 94-103.
 6. An X. Disorders of red cell membrane / X An, N. Mohandas // British Journal of Hematology. – 2008. – Vol. 141, № 3. – P. 367-375.
 7. Bennett V. Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin / V. Bennett, J. Healy // Trends in Molecular Medicine. – 2008. – Vol. 14, №1. – P. 28-36.
 8. Burton N.M. Modeling the structure of the red cell membrane / N.M. Burton, L.J. Bruce // Biochemistry and Cell Biology. – 2011 – Vol. 89, № 2. – P. 200-215.
 9. Dos Santos J.L Recent insights on the medicinal chemistry of sickle cell disease / J.L Dos Santos, C.M. Chin // Current Medical Chemistry. – 2011. – Vol. 18, № 15. – P.2339-2358.
 10. Fairbanks G. Electrolytic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane / G. Fairbanks, T.L. Steck, D.F. Wallach // Journal of Biochemistry. – 1971. – Vol. 10. – P.2606-2617.
 11. Föller M. Erythrocyte programmed cell death / M. Föller, S.M. Huber, F. Lang // International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life. – 2008. – Vol. 60, № 10. – P. 661-668.
 12. Kriebardis A.G. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells / A.G. Kriebardis, M.H. Antonelou, K.E. Stamoulis [et al.] // Journal of Cell Molecular Medicine. – 2007. – Vol. 11, № 11. – P.48-55.
 13. Kuypers F.A. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V / F.A. Kuypers, R.A. Lewis, M. Hua // Blood. – 1996. – Vol. 87, № 3. – P.1179-1187.
 14. Mohandas N. Red cell membrane: past, present, and future / N. Mohandas, P.G. Gallagher // Blood. – 2008. – Vol. 112, № 10. – P. 3939-3948.
 15. Phenylhydrazine as a partial model for beta-thalassaemia red blood cell hemodynamic properties / Y. Ramot, A. Koshkaryev, A. Goldfarb [et al.] // British Journal of Haematology. – 2008. – Vol.140, № 6. – P. 692-700.
 16. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells / S. Svetina, D. Kuzman, R.E. Waugh [et al.] // Journal of Bioelectrochemistry. – 2004. – Vol. 62. – P. 107-113.

Summary

ON SOME MOLECULAR-BIOLOGICAL MECHANISMS OF 2-ETHYL-6-METHYL-3-OXYPYRIDINE SUCCINATE ACTION

O.M. Vazhnycha

Key words: 2-ethyl-6-methyl-3-oxypyridine succinate, mexidol, red blood cell, cytoskeleton, membrane asymmetry.

The purpose of the research is to study the influence of 2-ethyl-6-methyl-3-oxypyridine succinate (mexidol) on red blood cells (RBC) membrane asymmetry and cytoskeleton proteins in the "in vitro" experiments. 2-ethyl-6-methyl-3-

oxypyridine succinate was added to test-systems in the concentration of 0,39 mM. A design of experiment included the incubation of RBC in 154 mM and 77 mM solutions of sodium chloride with medication or without it (control) at 37°C for 2 hours with following electrophoresis of cytoskeleton proteins and cytofluorimetry. It is shown that in hypotonic medium, the preparation decreases the count of RBC with altered membrane phospholipid asymmetry as compared to control. Under these conditions it modifies spectrin-actin complex and vertical membrane-cytoskeleton bonds intermediated by ankyrin.

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

Матеріал надійшов до редакції 07.06.2012 р.