

УДК 577.1

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ 1-(2'-ГИДРОКСИЭТИЛ)-2-МЕТИЛ-5-НИТРОИМИДАЗОЛА НА СОСТОЯНИЕ ВОДЫ В ПРИМЕМБРАННОЙ ОБЛАСТИ ЭРИТРОЦИТОВ И ИХ МОДЕЛЕЙ

П.Е. Кузнецов^{1,2}, Э.Б. Попыхова¹, С.М. Розачева¹, К.И. Евлаков¹

¹Саратовский государственный университет, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, корп. 5, тел.: (8452) 51-92-20; факс: (8452) 97-03-83, (8452) 26-26-43; эл. почта: PoryhovaEB@mail.ru.

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410015, Саратов, просп. Энтузиастов, д.13, ИБФРМ РАН.

Показано, что метронидазол снижает диффузионную подвижность приповерхностной воды, в частности, вблизи поверхности мембраны. Вероятным молекулярным механизмом этого снижения является эффект Вукса. Предполагается, что протекторное действие производных нитроимидазола, препятствующее лизису эритроцитов, обусловлено изменением диффузионной подвижности примембранной воды клеток.

Ключевые слова: метронидазол, эритроциты, биомембраны, примембранная вода.

ВВЕДЕНИЕ. Метронидазол (1-(2'-гидроксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол) (МЗ) – химиотерапевтический противомикробный и противопаразитарный препарат широкого спектра действия, подавляющий размножение анаэробных организмов. Препарат показал хорошие результаты при лечении гнойных анаэробных инфекций органов дыхания, мочевых путей, желудочно-кишечного тракта, розацеа и лейшманиоза, при профилактике инфекций перед операцией на кишечнике [1].

Так же имеются отдельные данные об эффективности МЗ при лечении больных язвенной болезнью желудка [2]. Из-за способности препарата образовывать дисульфиды при приеме внутрь, его используют для лечения алкоголизма [3]. Однако механизмы его биологического действия изучены не до конца. Сам по себе МЗ не проявляет бактериостатического действия и не влияет на состояние полинуклеотидов высших организмов. Вероятным механизмом действия антибиотика является восстановление его нитрогруппы при контакте с определенными белками анаэробов с последующей денатурацией их полинуклеотидов. С другой стороны, МЗ проявляет протекторное действие на клетки теплокровных [4].

Однако, молекулярный механизм протекторного действия низких концентраций этого соединения, препятствующего лизису клеток не ясен.

Целью настоящей работы являлось изучение механизма влияния различных концентраций 1-(2'-гидроксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазола на клеточные и искусственные мембраны.

МЕТОДИКА. В эксперименте использовали следующие реактивы и оборудование: таблетированная лекарственная форма 1-(2'-гидроксиэтил)-2-метил-

5-нитроимидазола (“Трихопол”) фирмы “PolPharma” SA (Польша); додецилсульфат натрия (ДСН) фирмы Merck (Германия); для обеспыливания воды использовали миллипоровые фильтры “Millex-GS” 0,22 мкм (Ирландия), для деаэрирования – форвакуумный насос ВМ-416М (Россия); фото- и флуориметрию, а также исследование упругого рассеяния света проводили на спектрофлуориметре “Флуорат - Панорама 02” фирмы “Люмекс” (Россия). Исследования проводили на эритроцитах белых беспородных крыс, содержащихся в виварии при стандартных лабораторных условиях, а также на липосомах из яичного лецитина. Липосомы получали инъекцией 10% спиртового раствора липида в Na - фосфатный буфер (рН = 7,4) с последующей ультразвуковой обработкой в течение 30 с (УЗ-дезинтегратор Elrap, максимальная мощность) из яичного лецитина, полученного по методике [5].

МЗ экстрагировали из таблетированной лекарственной формы “Трихопол”. Таблетки размельчали и растворяли в смеси хлороформа и бензола (1:1 об.), отфильтрованный экстракт упаривали и дважды проводили его перекристаллизацию из кипящего этанола. Чистоту МЗ контролировали ТСХ (около 94%). Исходный 0,5% раствор МЗ готовили в фосфатном буфере при рН 7,2. Затем, методом последовательных разведений готовили растворы с концентрацией 0,05%, 5×10^{-3} %, 5×10^{-4} %... 5×10^{-16} %.

Как известно, анионные детергенты при домицеллярных концентрациях вызывают гемолиз эритроцитов, параметры которого зависят от температуры, рН среды и химического состава мембраны [6]. В кювету, содержащую 1,5 мл фосфатного буфера (рН 7,2) и 80 мкл водного раствора ДСН концентрации 160 мкМ, добавляли эмульсию эритроцитов, выделенных путем центрифугирования (3000g, 15 мин) и трижды отмытых от плазмы в изотоническом 0,9% растворе NaCl. Исходная оптическая плотность суспензии при $\lambda = 670$ нм составляла 0,8 ($d = 0,5$ см), для предотвращения оседания эритроцитов суспензию периодически перемешивали. В течение 4 часов при комнатной температуре на указанной длине волны измеряли оптическую плотность эритроцитов, подвергающихся действию ДСН, как в отсутствии (контроль), так и в присутствии различных концентраций МЗ. Кинетику гемолиза регистрировали на спектрофотометре. Поскольку оптическая плотность пропорциональна количеству целых клеток, скорость гемолиза оценивали по ее изменению во времени [6,7].

Аналогичные эксперименты проводили на липосомах из яичного лецитина. Концентрация липида в эмульсии составляла 5 мг/мл; исходная оптическая плотность липосом $\lambda 450$ нм = 1,0. Полученные таким способом липосомы в течение часа при комнатной температуре инкубировали в растворах различных концентраций МЗ. Через час проводили фотометрию проб при $\lambda=450$ нм, по результатам которой судили о степени разрушения липосом.

Измерение молекулярного рассеяния света позволяет зафиксировать увеличение радиуса корреляции воды в присутствии растворенного вещества. Исследовать рассеяние света приповерхностной водой невозможно, т.к. сами липосомы сильно рассеивают свет. Поэтому мы исследовали рассеяние света объемной водой в присутствии низких концентраций МЗ, которую можно рассматривать как модель приповерхностной воды.

Для исследования диффузионной подвижности приповерхностной воды использовали метод флуоресцентного зондирования, зонд - 4-диметиламинохалкон (ДМХ), синтезированный на кафедре органической химии СГУ А.К.Рамазановым по методике [8]. Зонд вводили в пробу объемом 3 мл в виде этанольного раствора (30 мкл) концентрации 10^{-3} М, концентрация ДМХ в каждой пробе составляла 0,01 мМ. Измерение интенсивности флуоресценции ДМХ в приповерхностном слое липосом проводили при длине волны возбуждения $\lambda = 419$ нм, эмиссии в области 525 нм.

Полученные результаты обработаны с помощью компьютерной программы EXCEL-98 for WINDOWS, при построении графиков принимали многочленную аппроксимацию, полученную по методу наименьших квадратов

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Установлено, что в условиях проведения эксперимента скорость гемолиза эритроцитов хорошо описывается кинетическими кривыми первого порядка с независимой от времени константой скорости k , о чем свидетельствует линейность приведенных на рисунке 1 графиков. Тогда для зависимости оптической плотности D от времени t справедливы соотношения

$$\frac{dD(t)}{dt} = -kD(t) \Rightarrow D(t) = D(0)e^{-kt} \Rightarrow k = -\ln(D(t)/D(0)) \Rightarrow$$

$$k_{\text{отн}} = \frac{\lg(D(t)/D(0))}{\lg(D_{\text{контроль}}(t)/D_{\text{контроль}}(0))},$$

где $D_{\text{контроль}}$ – оптическая плотность суспензии эритроцитов в отсутствии МЗ, $k_{\text{отн}}$ – относительная константа скорости гемолиза. Эта константа в присутствии МЗ возрастает (рис. 2) с ростом его концентрации в пробе, значимые отличия ($p < 0.05$) от гемолиза в отсутствие МЗ наблюдались в интервале 10^{-1} – 10^{-10} %. Следовательно, в этом концентрационном интервале МЗ проявляет выраженное протекторное действие по отношению к эритроцитам.

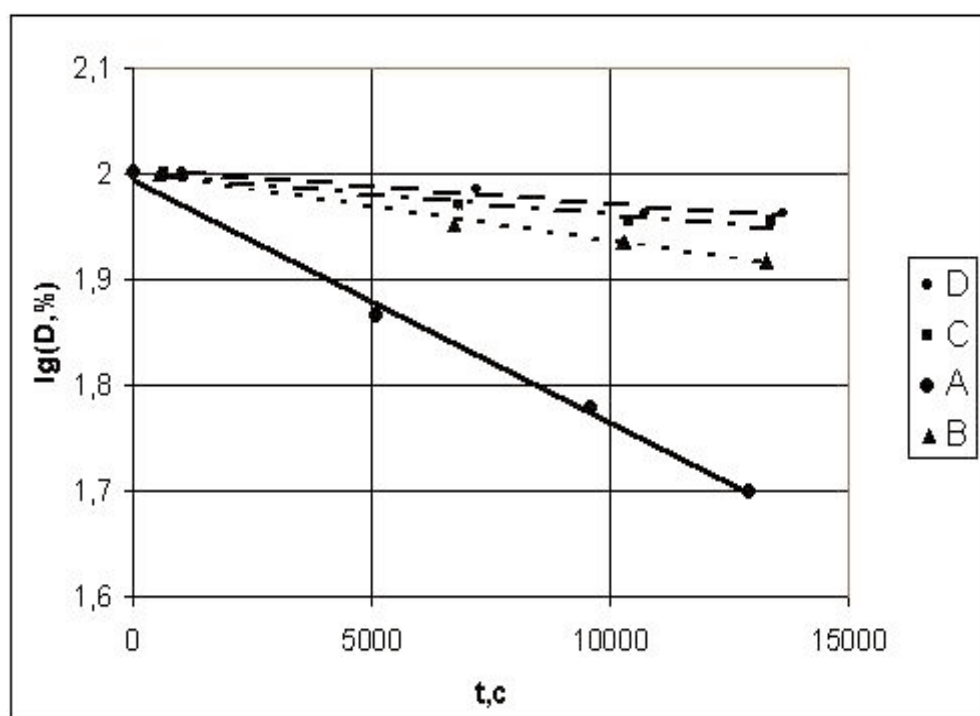


Рисунок 1.

Графики зависимости оптической плотности суспензии эритроцитов от времени в присутствии ДСН и МЗ. За 100% принята оптическая плотность суспензии эритроцитов в начальный момент времени. А – контроль (отсутствие МЗ), В – 5×10^{-9} % МЗ, С – 5×10^{-7} % МЗ, D – 0,5% МЗ.

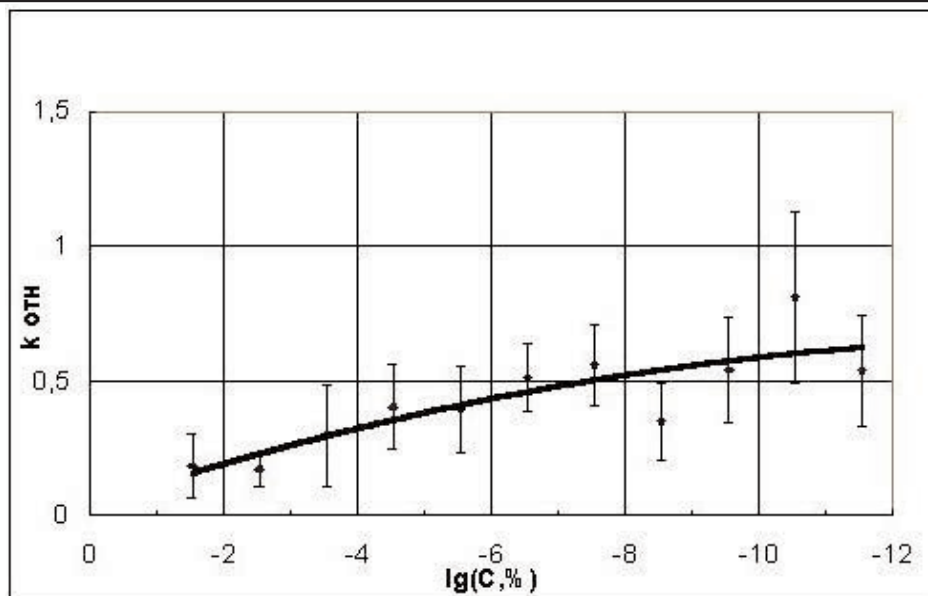


Рисунок 2.

Относительная константа скорости гемолиза эритроцитов SDS в присутствии МЗ.
За 1 принята константа скорости в отсутствии МЗ.

Для того чтобы оценить, является ли это действие МЗ на клеточную мембрану специфичным (например, обусловлено связыванием МЗ с каким-либо рецептором), мы использовали простейшую модель клетки – липосомы из яичного лецитина. Эти модели строятся из липидных бислоев и лишены белковой и полинуклеотидной компоненты. Следовательно, если присутствие МЗ будет оказывать сходное действие на липосомы, препятствуя их разрушению ДСН, то можно будет обоснованно полагать, что протекторное действие МЗ является неспецифичным. Действительно, в присутствии МЗ разрушение липосом ДСН (рис. 3) значительно замедляется. Через 1 час инкубации значимые отличия оптической плотности эмульсий от контроля ($p < 0,05$) наблюдались в интервале концентраций МЗ 10^{-1} - 10^{-13} %.

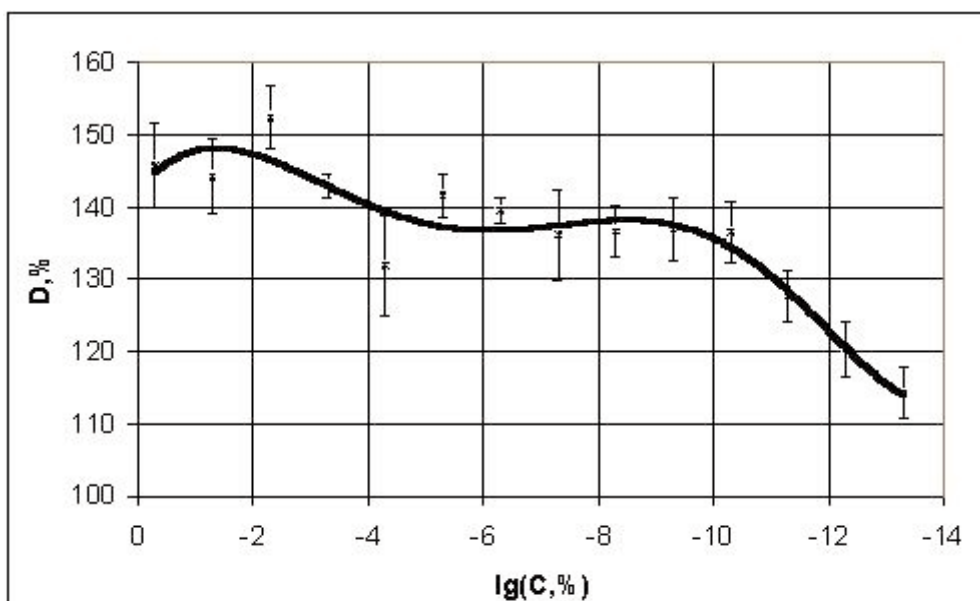


Рисунок 3.

Оптическая плотность (D) эмульсии липосом в присутствии различных концентраций МЗ.
За 100% принята оптическая плотность в отсутствии МЗ.

Следовательно, причиной протекторного действия МЗ может являться действие МЗ либо непосредственно на липидный бислой, либо на приповерхностную воду этого бислоя. Определенное сомнение в верности первого предположения внушает наличие протекторного действия на клетки и их модели в очень низких концентрациях МЗ (до 10^{-13} %), которые, вероятно, не могут существенно модифицировать структуру бислоя за счет встраивания в него молекул МЗ, не обладающих выраженной амфифильностью.

Мы предположили, что причиной этого эффекта может являться снижение диффузионной подвижности примембранной воды клеток или их моделей. В этом случае ДСН будет медленнее диффундировать через слой малоподвижной приповерхностной воды. В пользу этого предположения говорит то, что некоторые химические соединения способны вызывать такое изменение параметров водородной сетки приповерхностной воды в низких концентрациях [9-12], не проявляя при этом выраженной поверхностной активности.

Для проверки этого предположения мы использовали метод флуоресцентного зондирования. В качестве флуоресцентного зонда был выбран ДМХ. Как известно, интенсивность флуоресценции данного зонда, локализующегося в приповерхностной воде липосом, напрямую связана с подвижностью окружающих протонодонорных молекул. Снижение интенсивности его флуоресценции наблюдается при уменьшении подвижности приповерхностной воды [13]. Как видно из рисунка 4, интенсивность флуоресценции ДМХ в присутствии МЗ превышает интенсивность в его отсутствии. Значимые отличия ($p < 0,05$) наблюдались для сравнительно крупных липосом, диаметром более 500 нм. Это свидетельствует о снижении диффузионной подвижности воды при введении МЗ в примембранную область.

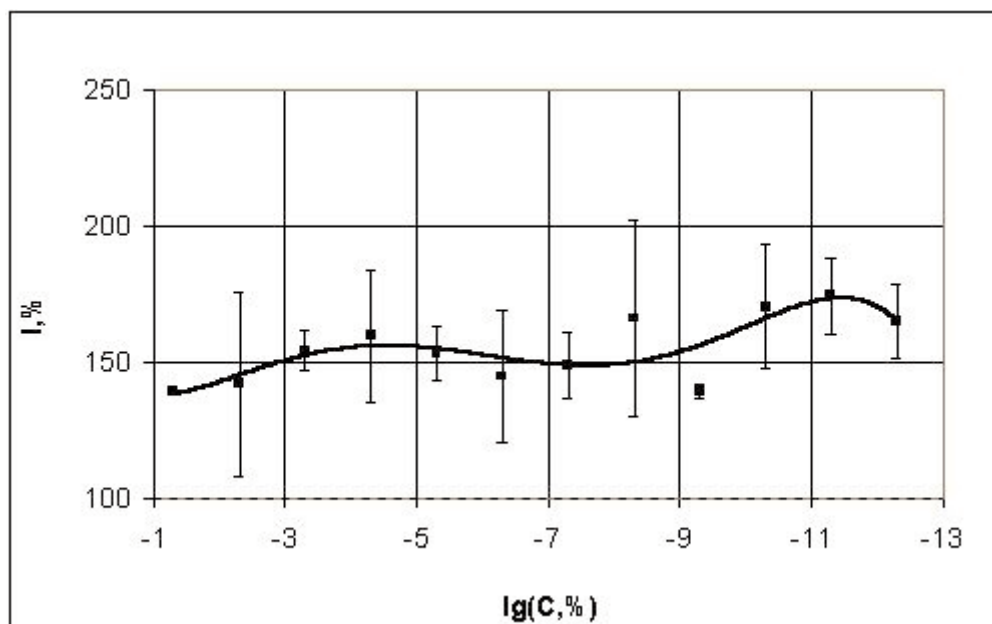


Рисунок 4.

Интенсивность флуоресценции ДМХ в примембранной области липосом $d > 500$ нм в присутствии МЗ. За 100% принята интенсивность флуоресценции в отсутствии МЗ.

Возможно, молекулярный механизм снижения подвижности связан с образованием “гигантских флуктуаций” плотности воды, возникающих в растворах в области фазового перехода второго рода типа “порядок-беспорядок”. Этот эффект был открыт М. Ф. Вуксом в 1976 г. для простых спиртов [14] и позднее обнаружен для нескольких рядов соединений различной химической

МЕТРОНИДАЗОЛ И ПРИМЕМБРАННАЯ ВОДА

структуры – морфиноподобных соединений, диоксанов, производных барбитуровой кислоты и т.д. [9-12]. Эффект Вукса связан с перестройкой сетки водородных связей воды вблизи молекулы растворенного вещества. Можно предположить, что в нашем случае имеет место подобный эффект.

Более прямым методом проверки этого предположения является изучение молекулярного рассеяния света водных растворов исследуемого соединения. При образовании “гигантских флуктуаций” плотности воды, свет рассеивается более интенсивно [14], что и было нами обнаружено (рис. 5). Значимые отличия в интенсивности рассеяния света водными растворами МЗ от рассеяния чистой водой наблюдаются в области концентраций 10^{-4} - 10^{-9} %.

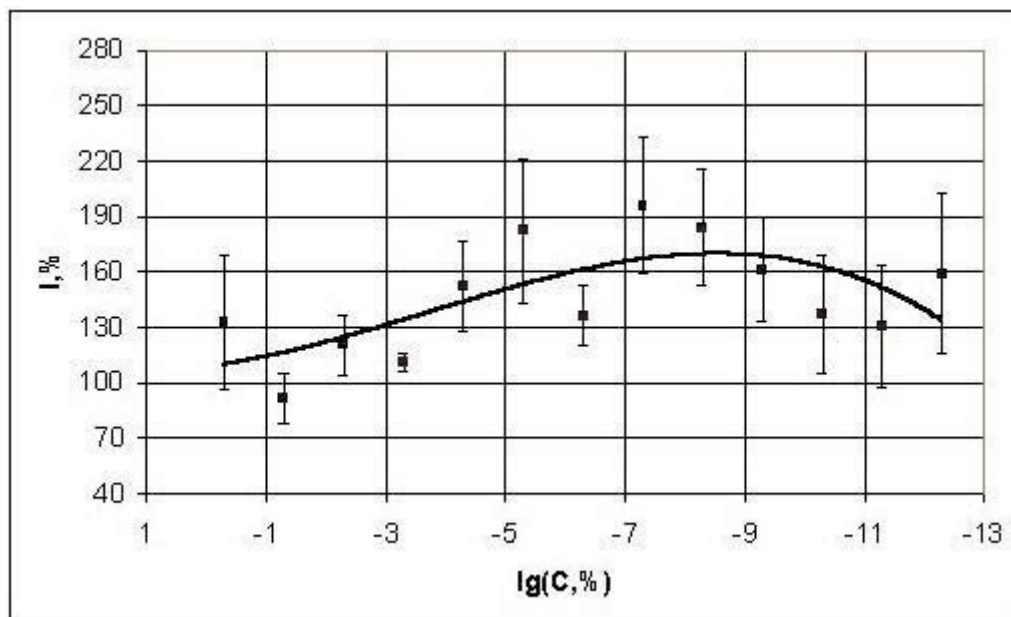


Рисунок 5.

Интенсивность упругого светорассеяния (I) водных растворов МЗ.
За 100% принято рассеяние света чистой водой.

Обнаруженное снижение подвижности воды в присутствии МЗ позволяет предположить, что его протекторное действие (в том числе - резистентность клеток и их моделей к воздействию детергентов) связано с существованием приповерхностного слоя воды с пониженной диффузионной подвижностью. Этот слой препятствует быстрой диффузии детергента к клеткам и их разрушению. Вероятно, с этим связан механизм протекторного действия МЗ на клеточные и модельные мембраны *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Машковский М.Д. (1993) Лекарственные средства, 2, М., Медицина.
2. Широкова К.И., Филлимонов К.М., Полякова А.В. (1981) Клин. мед., №2, 48-50.
3. VIDAL справочник (1996) М., Астра Фарм. Сервис.
4. Чекман И.С., Пелешук А.П., Пятак О.А. (1986) Справочник по клинической фармакологии, Киев, Здоров'я.
5. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В. Молотковский Ю.Г. (1981) Препаративная биохимия липидов. М., Наука.
6. Черницкий Е.А., Сенькович О.А., Слобожанина Е.И. (1999) Биофизика, 44(1), 66-69.

-
7. Черницкий Е.А., Сенькович О.А. (1997) Биол. мембраны, **14**, 385-393.
 8. Яновская Л.А., Умирзаков Б., Яковлев И.П. и др. (1971) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2427.
 9. Кузнецов П.Е., Злобин В.А., Назаров Г.В. и др. (2002) Тез. докл. 3 Международного симпозиума "Механизмы действия сверхмалых доз", Москва, с.229.
 10. Жиров А.А., Злобин В.А., Кузнецов П.Е. и др. (2002) Тез. докл. 3 Международного симпозиума "Механизмы действия сверхмалых доз", Москва, с.225.
 11. Кунцевич А. Д., Горбунов Ю.А., Панфилов А.В. (1998) Докл. РАН, **358**, 125-126.
 12. Кунцевич А. Д., Кузнецов П.Е., Назаров Г.В. и др. (1998) Докл. РАН, **363**, 522-523.
 13. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. (1980) Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., Наука.
 14. Вукс М.Ф., (1976) Опт. и спектр., **40**, 154-159.

Поступила: 26. 08. 2003

THE INFLUENCE OF THE 1-(2'-HYDROXYETHYL)-2-METHYL-5-NITROIMIDAZOLE ON THE STATE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES AND THEIR MODELS

P.E. Kuznetsov^{1,2}, E.B. Popryhova¹, S.M. Rogacheva¹, K.I. Evlakov¹

Saratov State University, Astrahanskay st. 83, bld. 5, Saratov, 410012 Russia; tel.: 51-92-20.
Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Entusiastov prosp. 13, Saratov, 410015 Russia.

Metronidazolium decreased diffusion mobility of membrane surface water. It is possible, that Wuks's effect represents the molecular mechanism underlying this phenomenon. We suppose, that protective action of the derivatives of the nitroimidazole on cell lysis is related to changes of the diffusion mobility of the surface water.

Key words: metronidasolum, biomembranes, surface water, erythrocytes.