

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИОКСИДАНТОВ – ПРОИЗВОДНЫХ РЯДА АНФЕНОВ НА МОРФОЛОГИЮ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2017 г. Е.Ю. Паршина*, М.А. Силичева*, А.А. Володькин**, Л.Я. Гендель**

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119899, Москва, Ленинские горы, 1*

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 117977, Москва, ул. Косыгина, 4*

E-mail: parshinae@gmail.com

Поступила в редакцию 11.01.17 г.

После доработки 05.04.17 г.

Изучено влияние новых синтетических антиоксидантов – анфенов – на морфологию эритроцитов. Выявлены индуцируемые гидрофильным производным анфеном-1 незначительные трансформации клеток в форму эхиноцитов, а также трансформация клеток в форму стоматоцитов под действием гидрофобных производных анфена-2, 3 и 4. Полученные данные указывают на встраивание этих соединений в эритроцитарную мембрану. Распределение соединений во внутримембранном пространстве зависит от их гидрофобности. Гидрофильное соединение анфен-1 преимущественно локализуется во внешнем монослое мембраны, в то время как гидрофобные производные – во внутреннем монослое. Предполагается, что биологическая активность анфена-3 и анфена-4 по мере их продвижения в мембране может реализовываться в ее обоих монослоях, в то время как гидрофильное соединение анфен-1 оказывает незначительный мембранотропный эффект и может осуществлять свою активность только во внешнем монослое мембраны. Установлены различия в эффективности концентрационно-зависимого модифицирующего действия разных по гидрофобным свойствам соединений.

Ключевые слова: анфены, синтетические антиоксиданты, гидрофобность, морфология эритроцитов.

Одной из актуальных задач современной физико-химической биологии и фармакологии является поиск новых эффективных, нетоксичных препаратов и путей их адресной доставки непосредственно к областям реализации биологического действия. Для антиоксидантов одними из таких областей являются различные участки клеточных мембран, которые подвержены процессам перекисного окисления.

В ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН были синтезированы новые синтетические антиоксиданты – анфены, являющиеся производными L-тирозина [1,2]. Выявлены их высокая антиокислительная активность, защитные свойства отдельных производных при ожогах, радиационных поражениях, а также противоопухолевое действие [1,3]. Высокая эффективность и низкая токсичность позволили авторам предположить фармакологическую перспективность таких соединений [1].

Важным этапом дальнейших исследований биологической активности анфенов является изучение взаимодействия этих антиоксидантов

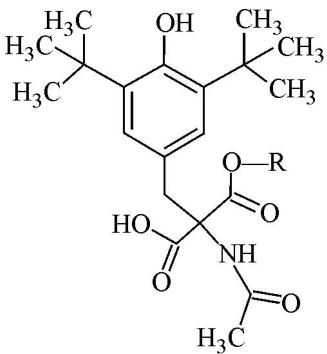
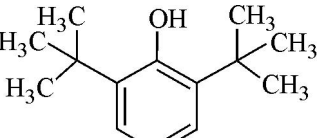
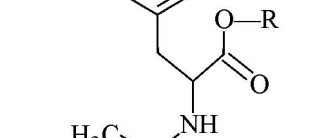
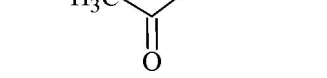
с клеточными мембранами, в том числе с плазматической мембраной эритроцитов.

Известно, что форма эритроцитов и ее изменения – один из важнейших показателей функционального состояния этих клеток. Ксенобиотики, в частности синтетические антиоксиданты, способны влиять на морфологию эритроцитов [4–8].

Согласно представлениям, развитым в работах [4,5], изменения формы эритроцитов, индуцируемые интеркалирующими в мембрану экзогенными химическими соединениями, отражают особенности распределения этих веществ во внутримембранном пространстве. При этом переход эритроцитов из нормальной дискоидной формы в форму эхиноцитов отражает распределение поступающего вещества во внешний монослой мембраны, тогда как переход в форму стоматоцитов связан с распределением вещества во внутреннем монослое.

Получение такой информации важно для понимания особенностей распределения биологически активных веществ, в частности, синте-

Структурные формулы, условные обозначения и логарифмы коэффициентов распределения анфенов в системе октанол–вода ($\lg P_{o-w}$)

Структурная формула	R	Название	$\lg P_{o-w}$
	-Na	Анфен-1 (А-1)	-0,5
	-H	Анфен-2 (А-2)	3,59
	-C ₂ H ₅	Анфен-3 (А-3)	4,45
	-C ₄ H ₉	Анфен-4 (А-4)	5,43

тических антиоксидантов в тех или иных областях структуры эритроцитарной мембраны, где возможна реализация их биологического действия.

Целью настоящей работы было изучение влияния разных по структуре бокового заместителя и по гидрофобным свойствам представителей ряда анфенов на морфологию эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали синтезированные в ИБХФ РАН производные ряда анфенов – анфены 1–4 (в дальнейшем изложении обозначены как А-1, А-2, А-3 и А-4) [1,2] (таблица).

Объектом исследований служили эритроциты из крови белых беспородных крыс (в качестве антикоагулянта применяли гепарин). Эритроциты выделяли по методике, описанной в работе [9]. В опытах использовали эритроциты, суспендированные в буфере следующего состава: 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 4 мМ Na₂HPO₄,

1 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, 10 мМ глюкозы, pH 7,4, $t = 4^\circ\text{C}$). Эритроциты хранили при 4°C и использовали в течение 8 ч. Содержание клеток в конечной суспензии (в буфере) составляло 5·10⁴ кл./мкл.

При изучении влияния анфенов на морфологию эритроцитов проводили инкубацию (продолжительность указана в подписях к рисункам) клеток с каждым из производных при температуре 20 ± 2°C. Гидрофильное производное А-1 применяли в виде водного раствора. Гидрофобные производные А-2, А-3 и А-4 применяли в виде растворов в этаноле, не содержащих других ингредиентов (концентрация этанола в образцах не превышала 0,8 об. %). Контролем служили образцы, инкубировавшиеся в идентичных условиях, но без добавления испытуемого соединения.

Фиксацию образцов в 0,5%-м растворе глутарового альдегида (Sigma, США) в буфере проводили в течение 1 ч, затем производили отмывку клеток в бидистиллированной воде [7].

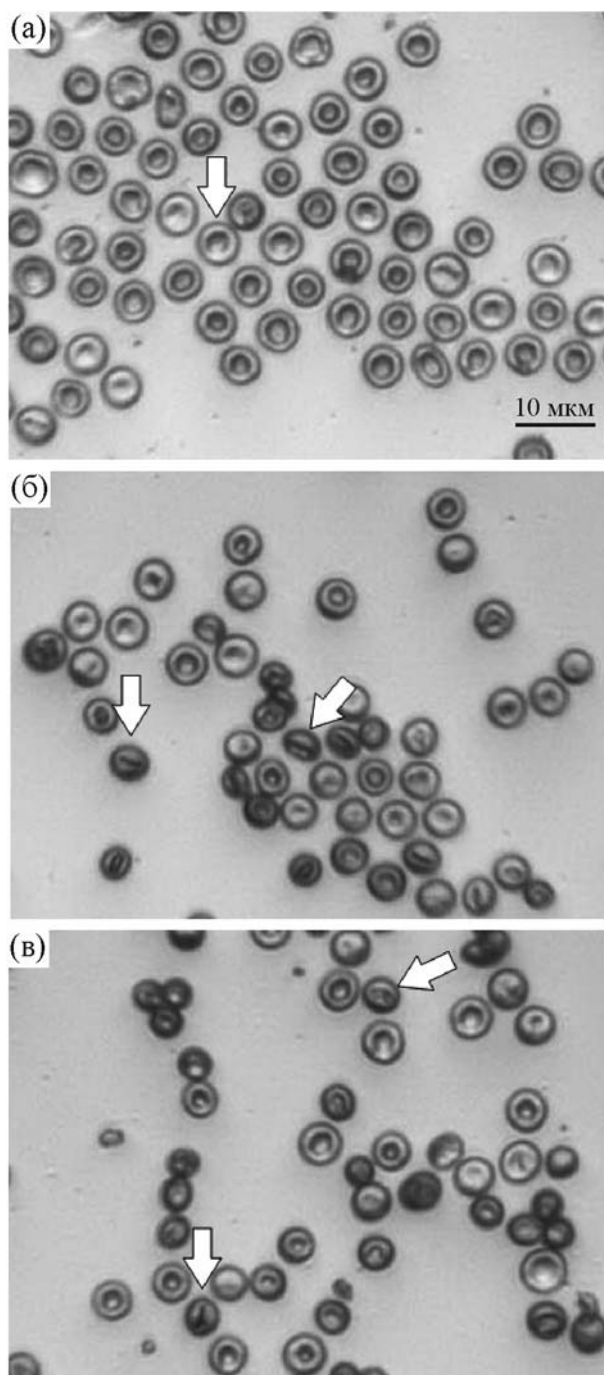


Рис. 1. Влияние анфена-3 на форму эритроцитов при различных временах инкубации с веществом. Концентрация вещества в пробе $5 \cdot 10^{-4}$ М; (а) – контролем служили суспензии эритроцитов в буфере с соответствующим объемом добавки этилового спирта, (б) и (в) – через 10 и 30 мин инкубации с А-3 соответственно. Объектив 60 \times . Стрелками отмечены: в контроле – дискоциты, при инкубации с А-3 – стоматоциты.

Клетки наносили в один слой на покровное стекло и высушивали на воздухе. Высушенные мазки наблюдали под световым микроскопом

Zeiss Axioplan (объективы 40 \times и 60 \times), микрофотографии получали с использованием видеокамеры.

Для каждого образца регистрировали несколько полей и осуществляли подсчет содержания различных морфологических форм, значения выражали в процентах от общего количества клеток. В каждом образце рассматривали 500 клеток. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены структурные формулы изученных производных ряда анфенов. Антиоксидантные свойства соединений обеспечиваются фрагментом, представленным экранированным фенолом. В структуре антиоксидантов содержатся также разные боковые заместители (R), влияющие на гидрофобные свойства производных.

Для характеристики гидрофобных свойств анфенов была проведена теоретическая оценка значений логарифмов их коэффициентов распределения в системе октанол–вода: $\lg P_{o-v} = \lg c_o/c_v$, где c_o и c_v – концентрации исследуемого вещества в неполярной фазе (октанол) и водной фазе в равновесном состоянии соответственно. Этот параметр широко применяется для характеристики гидрофобности различных органических соединений [11–14].

Значения $\lg P_{o-v}$ вычисляли с использованием метода суммирования гидрофобности фрагментов соединения с учетом корректировочных факторов [11,15].

В таблице приведены полученные значения $\lg P_{o-v}$ анфенов. Величины $\lg P_{o-v}$ указывают на то, что А-1 является гидрофильным соединением, а А-2, А-3 и А-4 обладают гидрофобными свойствами.

Методом оптической микроскопии в работе изучено влияние анфенов на морфологию эритроцитов крысы.

На рис. 1 приведены типичные результаты, полученные в экспериментах с гидрофобным соединением А-3. На рис. 1а представлена фотография эритроцитов в контроле. Видно, что основную массу эритроцитов периферической крови составляют дискоциты, другие морфологические формы (по классификации [16]: эхиноциты, стоматоциты и др.) присутствуют в малых количествах.

Введение в среду инкубации анфена-3 индуцирует изменения формы эритроцитов, выражающиеся в переходе части клеток в форму

стоматоцитов (рис. 1б,в). На морфологические изменения клеток не оказывало существенного влияния использованное в экспериментах увеличение времени инкубации с препаратом до 30 мин.

Сравнительное трансформирующее действие различных по гидрофобности анфенов на форму эритроцитов представлено на рис. 2. Видно, что гидрофильное соединение А-1 вызывает незначительное увеличение содержания эхиноцитов и снижение содержания стоматоцитов в суспензии клеток. Более гидрофобные производные вызывают увеличение числа стоматоцитов и не изменяют или вызывают снижение количества эхиноцитов по сравнению с контрольными образцами. Наиболее выраженное трансформирующее действие на клетки оказывают соединения А-3 и А-4.

На рис. 3 приведены данные по изменению содержания морфологических форм эритроцитов (дискоцитов, эхиноцитов и стоматоцитов) в суспензии клеток под влиянием различных концентраций соединений, оказывающих наиболее выраженное действие на морфологию эритроцитов – А-3 и А-4

При действии производного А-3 наблюдаются существенные изменения содержания различных морфологических форм. Этот агент индуцирует образование большого числа стоматоцитов за счет снижения содержания дискоцитов и эхиноцитов (рис. 1 и 3а). В случае более гидрофобного соединения А-4 наблюдается эффект менее выражен (рис. 3б).

Полученные данные, согласно представлениям, развитым в работах [4,5], указывают на то, что исследованные вещества обладают способностью интеркалировать в эритроцитарную мембрану. Гидрофильное соединение А-1, по-видимому, проникает во внешний монослой мембраны и вызывает увеличение его площади и образование эхиноцитов. Гидрофобные соединения способны проникать в ее внутренний монослой, что приводит к увеличению его площади и, соответственно, к трансформации клеток в форму стоматоцитов.

На рис. 4 схематично представлено предполагаемое распределение исследуемых веществ в мембране эритроцитов и соответствующие морфологические трансформации клеток, связанные с изменением площадей монослоев мембраны, согласно гипотезе сопряженного бислоя [4,5].

Различия в эффективности модифицирующего действия этих соединений в сходных концентрациях, по-видимому, связаны как с гидрофобностью, так и с объемом молекулы. На-

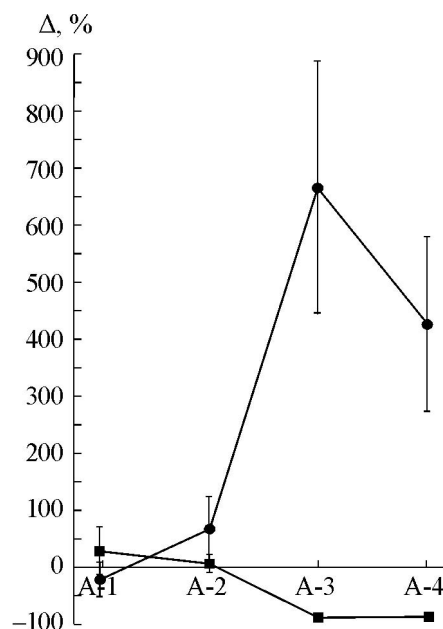


Рис. 2. Влияние производных ряда анфенов на содержание эхиноцитов (квадраты) и стоматоцитов (кружки) в суспензии эритроцитов. Концентрация веществ в пробе $5 \cdot 10^{-4}$ М; время инкубации с веществом 10 мин. $\Delta(\%) = \left(\frac{N_{\text{опыт}} - N_{\text{контроль}}}{N_{\text{контроль}}} \right) \times 100\%$,

где N – содержание клеток соответствующей формы (эхиноцитов или стоматоцитов) в контрольной пробе или в пробе, содержащей соответствующее вещество. Контролем служили суспензии эритроцитов в буфере с соответствующим объемом добавки этилового спирта в случае гидрофобных соединений.

более гидрофобное производное А-4 имеет больший объем по сравнению с А-3, и емкость мембраны для него ограничена.

Аналогичные различия в эффективности мембранотропного действия разных по гидрофобным свойствам синтетических антиоксидантов – ихфенов – были установлены в работах [8,14].

В работе выявлена концентрационная зависимость эффектов анфенов на морфологию эритроцитов. Из данных, приведенных на рис. 3, следует, что морфологические трансформации клеток усиливаются с ростом концентрации действующего вещества.

Таким образом, установлено, что гидрофобные производные ряда синтетических антиоксидантов анфенов способны оказывать стоматоцитогенное действие на морфологию эритроцитов, что, по-видимому, связано с их интеркаляцией в эритроцитарную мембрану и преимущественным распределением в ее внутреннем монослое.

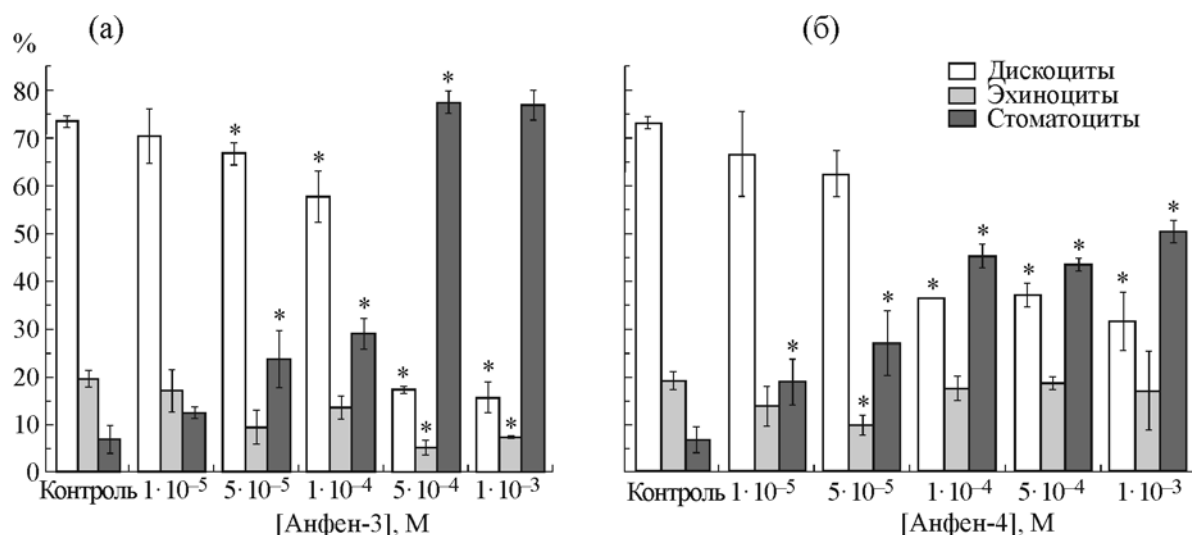


Рис. 3. Влияние различных концентраций анфена-3 (а) и анфена-4 (б) на содержание дискоцитов, эхиноцитов и стоматоцитов в суспензии эритроцитов после 10-минутной инкубации с соответствующим препаратом; * – $p < 0,05$ по критерию Стьюдента, отличия от соответствующих значений в контрольной пробе. Условия те же, что и на рис. 1.

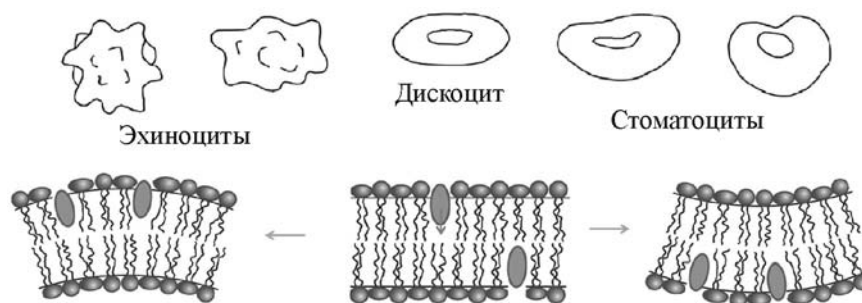


Рис. 4. Схема трансформации форм эритроцитов и соответствующего распределения экзогенных соединений между монослоями мембраны в соответствии с гипотезой сопряженного бислоя.

В связи с этим можно предположить, что биологическая активность А-3 и А-4 по мере их продвижения в мембране реализуется в обеих ее монослоях.

Эффекты данных веществ носят концентрационно-зависимый характер и наиболее выражены в области высоких концентраций действующих веществ, что следует учитывать при их возможном практическом использовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. А. Володькин, Е. Б. Бурлакова, Г. Е. Заиков и др. в сб. *Тез. докл. VIII международной конференции «Биоантиоксидант»* (Москва, 2010), сс. 90–92.
2. А. А. Володькин, Г. Е. Заиков, Л. Н. Курковская и др., *Вестн. Казанского технологич. ун-та* **17**, 177 (2012).
3. В. Н. Ерохин, А. А. Володькин, В. А. Семенов и др., в сб. *Тез. докл. Междун. конф. «Биоантиоксидант»* (Москва, 2015), с. 64.
4. M. P. Sheetz and S. J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4457 (1974).
5. M. P. Sheetz and S. J. Singer, *J. Cell Biol.* **70**, 247 (1976).
6. B. Isomaa, H. Hagerstrand, and G. Paatero, *Biochim. Biophys. Acta* **899**, 93 (1987).
7. Е. Ю. Паршина, Л. Я. Гендель и А. Б. Рубин, *Биофизика* **49** (6), 1094 (2004).
8. Е. Ю. Паршина, Л. Я. Гендель и А. Б. Рубин, *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 6, 645 (2007).
9. О. Г. Лунева, Л. Я. Гендель и К. Е. Круглякова, *Биофизика* **47** (1), 38 (2002).
10. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика* (Практика, М., 1999).
11. C. Hansch and A. Leo, *Exploring QSAR. Vol. 2. Hydrophobic, electronic and steric constants* (Wiley, New York, 1995).
12. М. А. Ландау, *Молекулярные механизмы действия физиологически активных веществ* (Наука, М., 1981).

13. К. Е. Киливник, О. С. Хмарская и О. С. Ксенжек, *Биофизика* **54** (2), 242 (2009).
14. Е. Ю. Паршина, Л. Я. Гендель и А. Б. Рубин, *Хим.-фармацевт. журн.* **2**, 2 (2012).
15. W. M. Meylan and P. H. Howard, *Perspectives in Drug Discovery and Design* **19**, 67 (2000).
16. M. Bessis, *Corpuscles: Atlas of red blood cell shape* (Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1974).

Effect of Synthetic Antioxidants – Anphen Derivatives on Erythrocyte Morphology

E.Yu. Parshina*, M.A. Silicheva*, A.A. Volod'kin, and L.Ya. Gendel****

**Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119899 Russia*

***Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 117977 Russia*

The effect of new synthetic antioxidants – anphens – on erythrocyte morphology was studied. Transformation of discocytes into echinocytes caused by hydrophylic derivative anphen-1, and cell transformation into stomatocytes under the action of hydrophobic derivatives of anphen-2, 3 and 4 were identified. Data obtained show that these compounds are intercalated into the erythrocyte membrane. Distribution of the compounds in the intermembrane space depends on their hydrophobicity. A hydrophilic compound – anphen-1 is predominantly located in the outer monolayer of the membrane and hydrophobic derivatives are seen in the inner monolayer. It is supposed that biological activity of anphen-3 and anphen-4 may be realized in both monolayers during their moving through membrane, while hydrophilic compound anphen-1 exerts negligible membrane trophic effect and may act only in the outer monolayer of the membrane. Variability in the efficiency of concentration-dependent modifying action of the compounds with different hydrophobic properties was established.

Keywords: anphens, synthetic antioxidants, hydrophobicity, erythrocyte morphology