

Сравнительная оценка влияния ультрадисперсных систем на основе комплексов хитозана и его производных с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства эритроцитов

В.Г. Шамратова, Л.А. Шарафутдинова, З.Р. Хисматуллина,
М.В. Базунова, Е.И. Кулиш, Д.Р. Валиев

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа

Контактная информация: к.б.н., доц. Шарафутдинова Люция Ахтямовна, sharafla@yandex.ru

В статье представлены результаты исследования влияния растворов хитозана, натриевой соли сукциноила хитозана и их полимер-коллоидных комплексов с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов на модели кислотного гемолиза. Анализ кислотных эритрограмм позволил определить, что изученные соединения оказывают существенное влияние на функциональное состояние мембран клеток крови крыс. Показано влияние исследуемых веществ на характер распределения эритроцитов по степени их устойчивости и на кинетические параметры (начало, интенсивность и завершение процесса их разрушения) под действием повреждающего агента (соляной кислоты). Сравнительный анализ результатов убеждает, что растворы хитозана, сукциноила хитозана и дисперсных систем на основе полимер-коллоидных комплексов хитозана и сукциноила хитозана с коллоидными частицами йодида серебра способны различным образом модулировать матричные свойства эритроцитов крови.

Ключевые слова: гемосовместимость, кислотная резистентность эритроцитов, хитозан, коллоидные частицы йодида серебра.

Введение

Поиск и внедрение новых способов направленной доставки лекарственных веществ к пораженным участкам организма, новых методов пролонгирования терапевтического действия лекарств позволяет существенно повысить эффективность медикаментозного лечения [7]. В качестве средств направленной доставки лекарственных веществ пролонгированного действия часто используются наноразмерные системы на основе природных и синтетических биодegradуемых биосовместимых полимеров, в т.ч. хитозана (ХТЗ) и его производных.

Положительный заряд макромолекул ХТЗ способствует его проникновению через клеточные мембраны и плотные слои эпителия, обеспечивает хорошую адгезию к слизистым оболочкам и бактериостатические свойства.

При создании носителей лекарственных средств на основе ХТЗ и его производных особый интерес вызывают самопроизвольно формирующиеся агрегаты макромолекул данных полисахаридов. При этом размеры агрегатов зависят от содержания ассоциирующих и заряженных групп. Однако имеющиеся экспериментальные данные противоре-

чивы. Также имеются сведения о нестабильности ассоциированных систем на основе ХТЗ и его производных [5].

Немаловажное значение имеет размер полимерных наночастиц для направленной доставки лекарственных средств. Так, известно, что полимерные носители размером порядка 100-200 нм могут обеспечить направленный транспорт противотуберкулёзных препаратов непосредственно в макрофаги, т.к. макрофаги способны поглощать инородные объекты именно таких размеров [1]. Частицы меньшего размера (от 30-40 до 200 нм) могут пассивно аккумулироваться в противоопухолевых очагах по механизму, известному как увеличенная проницаемость и удерживание. Происходит это из-за повышенного кровоснабжения и пониженного лимфатического дренажа в опухоли [12].

Одним из подходов для создания стабильных наноструктурированных систем с регулируемыми размерами является использование способности макромолекул к самосборке путем межмолекулярной ассоциации через нековалентные связи – на примере полимер-коллоидных комплексов (ПКК) ХТЗ и его производных (например, натриевой соли сукциноила хитозана (СХТЗ)) с неорганическими коллоидными частицами лиофобных зольей (например, золь йодида серебра). Коллоидные неорганические частицы лиофобных зольей могут выступать в качестве ядра при капсулировании маслорастворимых лекарственных веществ с использованием нано- и микроразмерных контейнеров [3].

Коллоидные системы доставки лекарств обычно разрабатываются как для перорального, так и для внутривенного введения препаратов [7]. Следова-

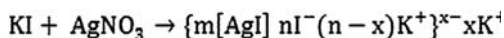
но, особую значимость приобретают данные о гемосовместимости растворов исходных полисахаридов ХТЗ и СХТЗ и дисперсных систем «ПКК ХТЗ : золь йодида серебра» и «СХТЗ : золь йодида серебра». Кровь как одна из биологических жидкостей организма отвечает качественными и количественными изменениями своего состава на какие-либо экзогенные и эндогенные факторы, а значит, служит своего рода информативным биомаркером, позволяющим установить критические точки перехода от резко выраженного токсического до стимулирующего эффекта. Таким образом, система крови играет основополагающую роль в резистентности организма к действию различных факторов. Эритроциты, как и другие клетки крови, реагируют на изменения внешней и внутренней среды, но в силу морфологической простоты, их патологические реакции малоинформативны. Поэтому действие отдельных химических веществ в субтоксических дозах, как правило, не вызывает микроскопически наблюдаемых изменений. Однако одним из проявлений их влияния могут быть сдвиги устойчивости клеток к воздействию гемолитических агентов. Нарушения функций биомембран под влиянием различных экзогенных веществ во многих случаях являются не только результатом, но и причиной патологических изменений в клетке и организме в целом [10].

В связи с вышесказанным, **целью** нашего исследования явилось изучение влияния образцов растворов ХТЗ, СХТЗ и ПКК ХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов на модели кислотного гемолиза.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ХТЗ (степень деацетилирования 82%, М.м.=80000 а.е.м.) и СХТЗ (М.м.=207 кДа, степень замещения 75%) производства ЗАО «Биопрогресс» (Россия).

Золи AgI получены по стандартной методике из 7-ми мл 0,01Н раствора нитрата серебра и 10 мл 0,01Н раствора йодида калия.



Размер частиц исходных мицелл AgI, определенный двумя независимыми методами (по данным турбидиметрии при длине волны 440 и 490 нм с помощью прибора ФЭК-56 и на анализаторе размеров частиц «Shimadzu Salid – 7101»), составил от 95 до 120 нм.

Дисперсные системы на основе ПКК СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра получены смешением водного раствора СХТЗ концентрацией 0,4% со свежеприготовленным золем AgI в объёмном соотношении 1:1 и 2:1 (далее – СХТЗ:золь AgI 1:1 и СХТЗ:золь AgI 2:1).

Дисперсные системы на основе ПКК ХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра получены смешением раствора ХТЗ в 1%-ной уксусной кислоте со свежеприготовленным золем AgI в объёмном соотношении 1:1 (далее – ХТЗ:золь AgI 1:1).

Размер частиц дисперсий СХТЗ:золь AgI 1:1, СХТЗ:золь AgI 2:1 и ХТЗ:золь AgI 1:1, определённый на анализаторе размеров частиц «Shimadzu Salid – 7101», составил от 100 до 375 нм.

Влияние растворов ХТЗ, СХТЗ и дисперсных систем на основе ПКК ХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов оценива-

ли методом регистрации кинетики кислотного гемолиза [2]. В эксперименте *in vitro* использовали кровь в количестве 0,5 мл, полученную из хвостовой вены крыс линии Wistar (n=20) массой 200-250 г, с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (Страсбург, 1986) и Федеральным законом Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Изучение степени влияния ультрадисперсных систем на основе хитозана и его производных на физико-химические свойства белково-липидных комплексов плазматических мембран осуществляли на модельной системе ХО-эритроциты–HCl по изменению химической резистентности эритроцитов к воздействию HCl (0,08 мл) в изотоническом растворе NaCl (0,85%). Гемолиз эритроцитов проводили в кварцевых кюветах с наружными размерами 20x40x10 мм и рабочим объемом 5 мл. В качестве действующих агентов использовали исходный золь AgI, водный раствор СХТЗ концентрацией 0,2% мас., раствор ХТЗ в 1%-ной уксусной кислоте концентрацией 0,5% мас., дисперсии СХТЗ:золь AgI 1:1 и СХТЗ:золь AgI 2:1, ХТЗ:золь AgI 1:1.

Интенсивность процессов гемолиза во времени регистрировали фотометрически при помощи КФК-3. Определение экстинкции проводили каждые 15 с до полного прекращения ее изменений. Уменьшение экстинкции – следствие постепенного разрушения эритроцитов, причем сначала разрушаются те клетки, резистентность которых к соляной кислоте слабее. По полученным значениям

строили кислотные эритрограммы, наглядно изображающие распределение эритроцитов по стойкости: по оси абсцисс – время гемолиза, являющееся мерой стойкости; по оси ординат – процент эритроцитов. В контроле дифференциальная кривая распределения эритроцитов по стойкости имеет вид одновершинной кривой с круто спадающими ветвями. Анализ кинетики кислотных эритрограмм проводили по следующим показателям: время начала, окончания и пика гемолиза, ширина интервала доминирующей группы эритроцитов в популяции. Рассчитывали долю клеток с разной стойкостью в общей популяции эритроцитов.

Математико-статистическую обработку результатов проводили в пакете прикладных программ Statistica v. 7.0 («StatSoft Inc.», США). Сравнение показателей кислотных эритрограмм проводили с помощью непараметрического

критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney Test), нулевую гипотезу об отсутствии различий отвергали при $p < 0,05$.

Результаты исследований

На рис. 1 представлены эритрограммы кислотной резистентности эритроцитов. У эритроцитов контрольной пробы кислотная эритрограмма одновершинная, отсутствует строгая симметричность, которая свидетельствует о некой разнородности популяции эритроцитов. Вершина кривой приходится на $2 \pm 0,3$ мин от начала гемолиза. Продолжительность гемолиза составляет $5,5 \pm 0,1$ мин. Растяннутость правой ветви эритрограммы указывает на присутствие в кровяном русле молодых форм эритроцитов в результате умеренного напряжения эритропоэза. Доля низкостойких эритроцитов в диапазоне 0-1,5 мин составила $9,13 \pm 0,87\%$ (см. табл.). Доля основной популяции зрелых эритроцитов средней

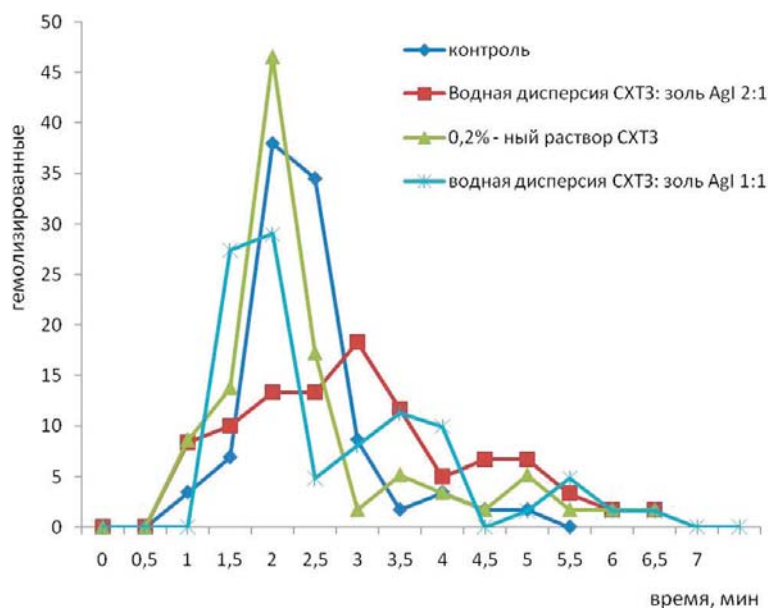


Рис. 1. Кислотные эритрограммы в контроле, после воздействия растворов натриевой соли сукциноила хитозана (СХТЗ) и полимер-коллоидных комплексов СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра.

Таблица

Показатели кислотной резистентности эритроцитов в контрольной группе и после воздействия растворов хитозана (ХТЗ), натриевой соли сукциноила хитозана (СХТЗ) и полимер-коллоидных комплексов (ПКК) хитозана и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	0,2% раствор СХТЗ	0,5% раствор ХТЗ в 1% уксусной кислоте	Водная дисперсия СХТЗ: золь AgI 2:1	Водная дисперсия СХТЗ: золь AgI 1:1	Водная дисперсия ХТЗ:Ag золь AgI 1:1
Время начала гемолиза, мин	0,5±0,01	1,00±0,1	1,5±0,4	1,00±0,1	1,5±0,2	1,5±0,3
Время окончания гемолиза, мин	5,5±0,1	6,5±0,2	6,5±0,4	6,5±0,3	6,5±0,2	6,5±0,4
Пик кислотной эритрограммы, мин	2,00±0,3	2,00±0,1	2,00±0,1	3,00±0,2*	2,0±0,1	3,00±0,2*
Ширина основания эритрограммы, мин	5,00±0,1	5,5±0,18	5,00±0,2	5,5±0,1	5,0±0,2	5,5±0,3
Процент высокостойких эритроцитов, %	12,9±1,6	11,5±1,4	13,16±2,1	34,1±4,7*	24,9±3,8*	24,6±2,9*
Процент эритроцитов повышенной устойчивости, %	4,78±0,31	8,6±1,1*	6,96±0,8	19,1±2,6*	13,00±2,1*	21,2±2,9*
Процент среднестойких эритроцитов, %	73,19±5,86	63,3±4,7	72,5±5,2	35,8±3,7*	52,3±4,6*	41,6±4,1*
Процент низкостойких эритроцитов, %	9,13±0,87	16,6±1,4*	7,38±0,6	11,0±1,8	11,29±2,3	12,6±2,5

Примечание: * – статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$).

стойкости в интервале 1,5-3 мин составила $73,19 \pm 5,86\%$, высокой стойкости в интервале 3-4,5 мин – $12,9 \pm 1,6\%$, повышенной стойкости – $4,78 \pm 0,31\%$.

После инкубации с 0,2% водным раствором СХТЗ эритрограмма сохраняет одноволновый вид и характеризуется левым сдвигом. Судя по расположению вершины эритрограммы, наибольшая

доля клеток гемолизируется на 2-й мин после воздействия HCl. Однако, в отличие от интактных эритроцитов, значительная часть клеток подвергается гемолизу уже на первых минутах. Доля низкостойких эритроцитов, которые гемолизируют в интервале 0-1,5 мин составляет $16,6 \pm 1,4\%$, что выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Таким образом, 0,2% водный

раствор СХТЗ вызывает заметное ускорение гемолиза. Доля же среднестойких эритроцитов, гемолизирующих в интервале 1,5-3 мин, составляет $63,3 \pm 4,7\%$.

При инкубации с СХТЗ:золь AgI 2:1 кислотная эритрограмма заметно отличается от таковой в контрольной группе. Кривая гемолиза в целом смещается вправо, указывая на то, значительная часть эритроцитов в эритроцитарной популяции после воздействия СХТЗ:золь AgI 2:1 повышает стойкость к повреждающему действию соляной кислоты. Так, пик эритрограммы приходится на $3,00 \pm 0,2$ мин, доля высокостойких эритроцитов, подвергнутых гемолизу в диапазоне 3-4,5 мин, составляет $34,1 \pm 4,7\%$, что примерно в 3 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Продолжительность гемолиза также выше и составляет $6,5 \pm 0,3$ мин. Доля эритроцитов повышенной устойчивости составляет $19,1 \pm 2,6\%$,

что почти в 4 раза выше, чем в контроле ($p < 0,01$). Таким образом, СХТЗ:золь AgI 2:1 увеличивает время, необходимое для осуществления процесса гемолиза. Очевидно, в данной композиции СХТЗ:золь AgI не только не вызывает повреждений мембраны эритроцитов, но и проявляет стабилизирующий эффект, что, вероятно, связано с более высокой концентрацией СХТЗ.

При анализе кривой распределения эритроцитов по стойкости после инкубации с СХТЗ:золь AgI 1:1 отмечено повышение доли эритроцитов высокой и повышенной устойчивости ($24,9 \pm 3,8\%$ и $13,00 \pm 2,1\%$ соответственно) по сравнению с интактными клетками ($p < 0,01$).

После воздействия ХТЗ:золь AgI 1:1 кривая кислотного гемолиза также отличается от таковой интактных эритроцитов контрольной группы (рис. 2). При заметном увеличении диапазона стойко-

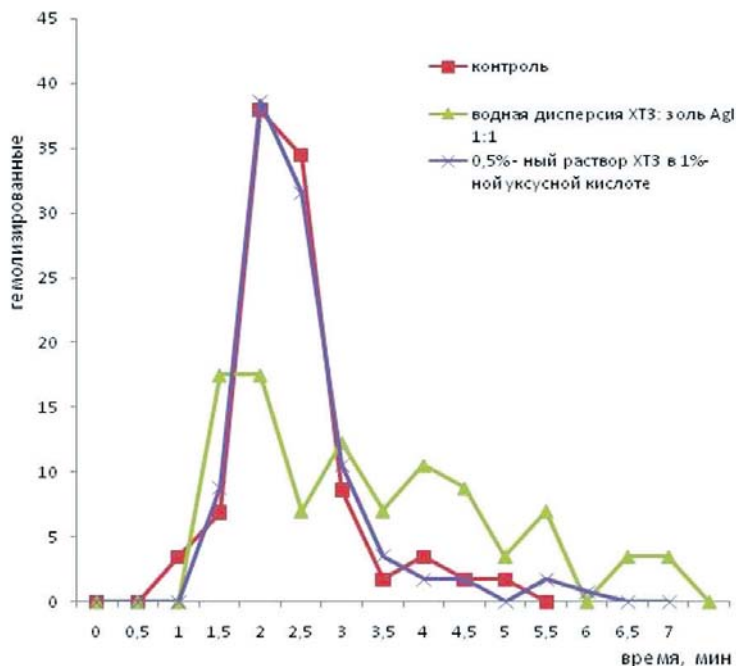


Рис. 2. Кислотные эритрограммы в контроле, после воздействия растворов хитозана (ХТЗ) и полимер-коллоидных комплексов хитозана с коллоидными частицами йодида серебра.

сти эритроцитов (6,5 мин) пик гемолиза приходится на $1,5 \pm 0,3$ мин. Однако процент гемолизированных эритроцитов к 3-й мин заметно ниже по сравнению с контролем и составляет $41,6 \pm 4,1\%$.

Контурсы кислотной эритрограммы после воздействия 0,5 % раствора ХТЗ в 1% уксусной кислоте совпадают с контрольной. Нами не было отмечено статистически значимых отличий параметров кривой распределения эритроцитов по стойкости ($p > 0,05$).

Обсуждение результатов

Характеристика функциональной полноценности клеток красной крови как интегрального показателя состояния организма имеет большое прогностическое значение. Совокупность физико-химических свойств мембран эритроцитов определяет их устойчивость к действию неблагоприятных факторов. В связи с этим, показатели устойчивости эритроцитов широко применяются в экспериментальной медицине для характеристики их функционального состояния. Нами предпринята попытка оценки устойчивости эритроцитов к кислотному гемолизу при воздействии растворов ХТЗ, СХТЗ и ПКК ХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра.

Результаты проведенных исследований показали, что изучаемые образцы оказывают существенное влияние на функциональное состояние мембран клеток крови крыс. Анализ кислотных эритрограмм позволил определить влияние ультрадисперсных систем на основе хитозана и его производных на характер распределения эритроцитов по степени их устойчивости, а также на кинетические параметры (начало, ин-

тенсивность и завершение процесса их разрушения) под действием повреждающего агента (HCl). Сравнительный анализ результатов убеждает, что протестированные объекты способны различным образом изменять структурно-функциональные свойства мембраны эритроцитов крови.

Исследование 0,2% водного раствора СХТЗ не обнаружило заметного влияния на исходную способность эритроцитов противостоять действию гемолитического агента. Данный образец ослаблял исходную базовую устойчивость эритроцитов к повреждающим воздействиям гемолитика.

Совершенно иную способность изменять функциональное состояние мембраны эритроцитов обнаружило соединение СХТЗ:золь AgI 2:1. Во все сроки наблюдения интенсивность разрушения красных клеток крови под действием соляной кислоты и общая продолжительность лизиса заметно различались с первоначальными характеристиками. Инкубация эритроцитарной массы с СХТЗ:золь AgI 2:1 увеличила долю стойких эритроцитов. По-видимому, в данной композиции СХТЗ оказывает стабилизирующий эффект на мембраны эритроцитов.

Оценивая степень резистентности после воздействия ХТЗ:золь AgI 1:1, следует отметить, что несмотря на некоторое уменьшение доли среднестойких эритроцитов (41,6%), значительно увеличивается численность эритроцитов с высокой и повышенной устойчивостью по сравнению с контролем ($24,6 \pm 2,9\%$ и $21,2 \pm 2,9\%$ соответственно; $p < 0,01$). Обнаружено более позднее вовлечение эритроцитов в процесс гемолиза, что может свидетельствовать о некотором

протективным действии указанного соединения.

Таким образом, сопоставление результатов исследования влияния ультрадисперсных систем на основе хитозана и его производных на структурно-функциональные показатели эритроцитов продемонстрировало способность одних (СХТЗ:золь AgI 2:1, ХТЗ:золь AgI 1:1, СХТЗ:золь AgI 1:1) оказывать стабилизирующее действие на мембраны эритроцитов, а других (0,2% водный раствор СХТЗ) – вызывать снижение резистентности эритроцитов.

По мнению ряда авторов, химические агенты, в первую очередь, действуют на уровне циркулирующих клеток крови, регулируя их устойчивость [8]. В условиях непосредственного контакта с клетками в кровяном русле химические вещества увеличивают или уменьшают генетически детерминированную резистентность мембран, проявляя избирательность по отношению к клеткам популяций с исходно различной устойчивостью. Обнаруженное многообразие эффектов может определяться особенностями их влияния на характер связей между белковыми и липидными компонентами мембраны, уровень активности ферментных систем клетки, величину отрицательного заряда поверхности мембран [4, 6, 9]. Известно, что кислотная резистентность эритроцитов определяет, в основном, состояние фосфолипидного бислоя мембран эритроцитов [11]. Следовательно, можно предположить, что при воздействии ультрадисперсных систем на основе хитозана и его производных происходит перестройка липидного компонента мембран эритроцитов.

Заключение

Результаты настоящих исследований позволили предположить, что растворы хитозана, натриевой соли сукциноила хитозана и полимер-коллоидных комплексов хитозана и сукциноила хитозана с коллоидными частицами йодида серебра оказывают стабилизирующее и дестабилизирующее влияние на мембраны эритроцитов в зависимости от состава образца, что свидетельствует об их различной гемосовместимости и указывает на перспективность дальнейшего поиска комплексов с потенциально протекторными свойствами.

Список литературы

1. *Болотова Г.В.* Полимерные носители для противотуберкулезных лекарственных средств на основе хитозана // Молодой ученый. 2010. Т. 2. № 5. С. 208-210.
2. *Гительзон И.И., Терсков И.А.* Эритрограммы как метод клинического исследования крови. - Красноярск: Сибирское отделение АН СССР. 1959. С. 247.
3. *Иноземцева О.А.* Формирование и физико-химические свойства полиэлектролитных нанокompозитных микрокапсул // Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2. № 9. С. 68-80.
4. *Калашникова И.В.* Механизмы взаимодействия антибиотиков пеницилинового ряда с эритроцитами человека // Бюлл. эксп. биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 10. С. 419-423.
5. *Корчагина Е.В.* Агрегация хитозана и его производных в разбавленных водных растворах: автореф. дисс.... канд. физ.-мат. наук. - М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. 2012. 232 с.
6. *Крепс Е.М.* Липиды клеточных мембран. Адаптационная функция липидов. - Л. 1981. 339 с.
7. *Лампрехт А.* Нанолечения. Концепции доставки лекарств в нанонауке. - М.: Научный мир. 2011. 232 с.
8. *Микашинович З.И.* Действие различных факторов на кровь // Бюлл. эксп. биол. 1980. № 10. С. 418-420.
9. *Ольшанская А.Я., Одиноква В.А., Квит-*

- ко Н.Н. Эритроциты в тканевом и иммунном гомеостазе // Сов. медицина. 1984. № 11. С. 43-48.
10. Савлуков А.И., Самсонов В.М., Камилов Р.Ф., Шакирова Э.Д., Яппаров Р.Н., Шакиров Д.Ф. Состояние устойчивости эритроцитов как звено адаптации организма // Медицинский вестник Башкортостана. 2011. Т. 6. № 4. С. 13-17.
11. Сахау Н.Р., Мурсаева Г.Х., Камилов Ф.Х., Фазлыева Р.М. Клинико-диагностическая оценка состояния мембран эритроцитов у больных первичным хроническим пиелонефритом // Нефрология. 2005. Т. 9. № 1. С. 47-51.
12. Nel A.E., Madler L., Velegol D. Understanding biophysicochemical interactions at the nan-bio interface // Nature Materials. 2009. № 8. P. 543-557.

Comparative assessment of influence of ultradisperse systems on the basis of complexes of a hitozan and its derivatives with colloidal particles of silver iodide on the structural and functional properties of erythrocytes

**V.G. Shamratova, L.A. Sharafutdinova, Z.R. Khismatullina,
M.V. Bazunova, E.I. Kulish, D.R. Valiev**

Results of research of influence of solutions of a hitozan, sodium salt of a sukcinol of a hitozan and their polymer-colloidal complexes with colloidal particles of silver iodide on the structural and functional properties of erythrocyte membranes on the model of an acid hemolysis are presented in article. The analysis of acid eritrogramms allowed to define that the studied combinations have essential impact on a functional condition of membranes of blood cells of rats. The effect of test substances on the distribution of red blood cells in terms of their sustainability and on kinetic parameters (the beginning, intensity and completion of process of their destruction) under the influence of the damaging agent (HCl) is shown. The comparative analysis of results convinces that solutions of a hitozan, a sukcinol of a hitozan and of a disperse systems on the basis of polymer-colloidal complexes of a hitozan, a sukcinol of a hitozan with colloidal particles of iodide of silver are capable to modulate variously matrix properties of erythrocytes of blood.

Key words: hemocompatibility, acid resistance of erythrocytes, hitozan, colloidal particles of silver iodide.