

Н. А. АПОЯН, Ж. Б. САЯДЯН

К МЕТОДИКЕ ИЗУЧЕНИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ IN VITRO НА ЭРИТРОЦИТАХ

В 1966 г. Симан и Вейнштейн [3] предложили простую количественную методику *in vitro* на эритроцитах для отбора локальных анестетиков, транквилизаторов и антигистаминных препаратов. Несколько позже на основании сходства мембраны эритроцитов с мембранами лизосом подобная методика была применена для отбора противовоспалительных препаратов [2]. Целью настоящей работы была попытка подобрать более удобные условия опыта для ориентировочного отбора противовоспалительных препаратов.

Вначале нами было проведено сравнительное изучение влияния противовоспалительных препаратов—анальгина и салицилата натрия—на гемолиз эритроцитов кролика и крысы в зависимости от различных условий опыта: количества эритроцитов, времени инкубации и температуры. Затем была изучена *in vitro* на эритроцитах крысы противовоспалительная активность некоторых лечебных препаратов. За основу была взята методика Симана и Вейнштейна с некоторыми изменениями. Так, 3—5 мл гепаринизированной крови, взятой из сердца крысы или ушной вены кролика, центрифугировалось при 2000 об/мин 2—3 мин. Осадок эритроцитов отделялся от плазмы, лейкоцитов, и готовилась эритроцитарная взвесь на изотоническом растворе NaCl. Разведения препаратов готовились в гипотоническом растворе NaCl 10^{-2} — 10^{-9} М концентрации. Как изотонический, так и 0,292% гипотонический растворы NaCl готовились на фосфатном буфере рН 7,0—7,05. Количество эритроцитов подсчитывалось в камере Горяева по методу Николаева [1]. Эритроцитарная взвесь добавлялась в пробирки с испытуемыми препаратами до конечной концентрации 10^5 — 10^6 клеток/мл. Затем эта смесь осторожно перемешивалась и выдерживалась 5, 10, 30 мин при 24°C или 20 мин при 53°C. После инкубации пробирки подвергались центрифугированию при 5000 об/мин 2—3 мин. Содержание гемоглобина в надосадочном слое определялось фотоэлектроколориметром ФЭК-56 зеленым фильтром. Снижение количества гемоглобина в опытных пробирках в сравнении с контрольными указывало на задержку гемолиза эритроцитов и противовоспалительную активность препарата. Работа проведена на 50 крысах, 5 кроликах. Результаты опытов выражали в процентах, принимая гемолиз эритроцитов в контрольных пробирках за 100%. Каждая проба крови ставилась 3 раза. Процент расхождения данных каждой пробы составлял не более 3%.

Результаты опытов приведены в табл. 1—4. Как видно из табл. 1, анальгин и салицилат натрия в 10^{-2} М концентрации подавляют гемолиз эритроцитов. Степень подавления зависит от количества и индивидуальных особенностей эритроцитов. При увеличении количества эритроцитов с 10^5 до 10^6 клеток/мл наблюдается статистически достоверное усиление гемолиза. Так, в случае с салицилатом натрия гемолиз усили-

Таблица 1

Гемолиз эритроцитов крыс под действием салицилата натрия и анальгина в 10^{-2} — 10^{-3} М концентрации в зависимости от количества эритроцитов при 15-минутной инкубации и 24°C

Препарат	Количество животных	Количество эритроцитов, клеток/мл	% гемолита	
			10^{-2} М	10^{-3} М
Салицилат натрия	7	10^5	$17,4 \pm 11,75$	$85,2 \pm 8,5$
Салицилат натрия	9	10^6	$33,7 \pm 17,7$	$100,7 \pm 5,06$
Анальгин	7	10^5	$11,5 \pm 9,80$	$92,1 \pm 9,50$
Анальгин	7	10^6	$41,9 \pm 22,0$	$92,1 \pm 25,0$

Таблица 2

Влияние салицилата натрия и анальгина в 10^{-2} М концентрации на гемолиз эритроцитов в зависимости от длительности инкубации при 24°C

Препарат	Вид животного	Количество животных	Количество эритроцитов, клеток/мл	% гемолита		
				5 мин	15 мин	30 мин
Салицилат натрия	крыса	10	10^5	$18,5 \pm 10,5$	$22,5 \pm 6,58$	$22,8 \pm 11,06$
		10	10^6	$47,5 \pm 6,25$	$51,4 \pm 10,2$	$45,9 \pm 8,9$
	кролик	5	10^5	$44,7 \pm 9,1$	$53,7 \pm 5,6$	$55,1 \pm 16,75$
		5	10^6	$70,4 \pm 24,8$	$66,6 \pm 5,0$	$91,3 \pm 17,2$
Анальгин	крыса	10	10^5	$17,5 \pm 10,8$	$21,3 \pm 10,1$	$26 \pm 12,0$
		10	10^6	$50,8 \pm 21,6$	$68,0 \pm 16,3$	$68,0 \pm 12,3$
	кролик	5	10^5	$82,8 \pm 6,25$	$85,7 \pm 8,1$	$95,7 \pm 9,5$
		5	10^6	$70,4 \pm 11,4$	$80,0 \pm 9,8$	$91,3 \pm 2,75$

Таблица 3

Влияние салицилата натрия и анальгина в 10^{-2} М концентрации на гемолиз эритроцитов в зависимости от температуры

Препарат	Вид животного	Количество животных	Количество эритроцитов, клеток/мл	% гемолита	
				24°C , 15 мин	53°C , 20 мин
Салицилат натрия	крыса	10	10^5	$10,2 \pm 1,4$	$11,1 \pm 9,03$
		10	10^6	$21,3 \pm 7,0$	$24,5 \pm 2,8$
	кролик	5	10^5	$55 \pm 9,1$	$50,7 \pm 13,3$
		5	10^6	$100 \pm 5,1$	$107 \pm 15,6$
Анальгин	крыса	10	10^5	$20,0 \pm 7,1$	$17,2 \pm 1,03$
		10	10^6	$46,6 \pm 15$	$60,8 \pm 9,0$
	кролик	5	10^5	$82,8 \pm 5,0$	$84,2 \pm 9,5$
		5	10^6	$91,3 \pm 7,9$	$100 \pm 2,9$

вается с $17,4 \pm 11,75$ до $33,7 \pm 17,7$, а с анальгином—с $11,5 \pm 9,8$ до $41,9 \pm 22,0$. С увеличением разведений препарата в 10^{-3} М и выше снижается действие препаратов и соответственно возрастает гемолиз до 80—100%.

Таблица 4

Влияние антимикробных препаратов в 10^{-2} М концентрации на гемолиз эритроцитов крыс 10^5 клеток/мл при 20-минутной инкубации и 24°C

Препараты	% гемолиза	Препараты	% гемолиза
Стрептомицин	16.3	Тубазид	99.5
Налецин	28.7	Ипразид	79.8
Тетрациклин	100		

Степень подавления гемолиза не зависит от длительности инкубации при 24°C (табл. 2). Так, салицилат натрия в смеси с эритроцитами 10^5 клеток/мл при 5-минутной инкубации подавляет гемолиз эритроцитов до $18,5 \pm 10,5$ с незначительными колебаниями при 15—30-минутной инкубации, которые соответствуют $22,5 \pm 6,58$ и $22,8 \pm 11,0$.

При применении кроличьих эритроцитов в количестве 10^5 клеток/мл действие салицилата натрия значительно снижается, и гемолиз эритроцитов независимо от сроков инкубации усиливается ($44,7 \pm 9,1$; $53 \pm 5,6$; $55 \pm 16,7$ при 5, 15, 30-минутной инкубации).

Увеличение количества эритроцитов до 10^6 еще более снижает действие препарата, соответственно усиливая гемолиз до 70—100%. Сходным действием на кроличьи эритроциты обладает и анальгин.

Результаты действия салицилата натрия и анальгина на гемолиз эритроцитов крыс и кроликов при различных температурах сведены в табл. 3. Повышение температуры до 53°C при 20-минутной инкубации не выявило значительной разницы в сравнении с показателями гемолиза при 24°C и 15-минутной инкубации. Необходимо отметить, что и при инкубации 53°C они варьируют в зависимости от вида животного и количества эритроцитов в инкубируемой смеси.

Таким образом, нами подтверждается факт, на котором основана методика: высокие концентрации противовоспалительных препаратов, в частности анальгин и салицилат натрия, подавляют гемолиз в гипотоническом растворе 10^{-2} М концентрации. Степень подавления гемолиза не зависит от температуры и сроков инкубации. Установлено, что использование небольших количеств эритроцитов дает более четкие результаты и большую степень подавления гемолиза, чем увеличение количества эритроцитов до 10^6 . Последний факт не соответствует условиям методики Симана и Вейнштейна, хотя и делает более доступной ее.

Как видно из данных, эритроциты крысы являются более чувствительным объектом, чем эритроциты кролика, поэтому для ориентировочного отбора противовоспалительных препаратов можно использовать эритроциты крыс. Подавление их гемолиза до 50—60% испытуемыми препаратами требует дальнейшего изучения.

Известно, что стрептомицин, налецин, тетрациклин, тубазид и ипразид обладают противовоспалительной активностью *in vivo*. Однако в

опытах *in vitro* оказались активными только стрептомицин и налечин (табл. 4). Выявленное несоответствие опытов *in vitro* и *in vivo* ограничивает возможности широкого применения указанной методики для отбора противовоспалительных препаратов. Она, по-видимому, может быть использована для изучения препаратов из определенных химических групп.

Институт тонкой органической химии
АН АрмССР им. А. Л. Мнджояна

Поступило 13.V 1971 г.

Ն. Հ. ԱՓՈՅԱՆ, Ժ. Բ. ՍԱՅԱԴՅԱՆ

ՈՉՍՏԵՐՈՒԴ ԳԵՂԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ՀԱԿԱՐՈՐԲՈՔԱՅԻՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՄԵԹՈԴԻ ՇՈՒՐՋԸ *in vitro* ՓՈՐՉԵՐՈՒՄ ԷՐԻՏՐՈՑԻՏՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել են հակաբորբոքային պրեպարատներ՝ անալգինի և նատրի սալիցիլատի ազդեցությունը առնետների, ճագարների էրիտրոցիտների հեմոլիզի վրա՝ կախված էրիտրոցիտների քանակից, ջերմաստիճանային պայմաններից և ինկուբացիայի տարբեր ժամանակներից *in vitro* ըստ Սիմանի և Վեյնշտեյնի մեթոդի:

In vitro փորձերով հաստատվել է, որ անալգինը և նատրի սալիցիլատը ճնշում են էրիտրոցիտների հեմոլիզի պրոցեսը 10^{-2} M:

Էրիտրոցիտների ոչ մեծ քանակությունների օգտագործումը 10^5 տալիս է ավելի հստակ արդյունքներ և հեմոլիզի ճնշման բարձր աստիճան, քան նրանց ավելացումը մինչև 10^6 :

Հեմոլիզի ճնշման աստիճանը տատանվում է՝ կախված յուրաքանչյուր կենդանու էրիտրոցիտների անհատական առանձնահատկություններից:

Էրիտրոցիտների ինկուբացիայի ժամկետների մեծացումը 5, 15, 30 վրկ. սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, ինչպես նաև նրանց ջերմաստիճանային մշակման դեպքում (53°C), չի հայտնաբերում նկատելի տարբերություն հեմոլիզի ճնշման աստիճանի մեջ:

Առնետների էրիտրոցիտները ավելի զգայուն օբյեկտ են, քան ճագարներինը, այդ պատճառով էլ հակաբորբոքային պրեպարատների նախնական ընտրության համար կարելի է օգտագործել առնետների էրիտրոցիտները, իսկ փորձարկվող պրեպարատներով նրանց հեմոլիզի ճնշումը 50—60%-ով պահանջում է հետագա ուսումնասիրություն:

Հինգ հակամիկրոբային պրեպարատների հետազոտությունը ցույց տվեց հակաբորբոքային ակտիվության համապատասխանությունը *in vitro* փորձերում և մակրոօրգանիզմների վրա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Николаев Н. М. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования под ред. Е. А. Коста. М., 1968.
2. Brown J. H., Mackey H. K. and Riggilo D. A. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 125, 3, 837, 1967.
3. Seeman P. and Weinstein J. Biochem. Pharmac. 15, 11, 1737, 1966.