

5. Gardos G. Biochim. Biophys. Acta, 10, 653-654, 1959.
6. Gyulkhandanyan A.V. Biol. Membr., 6(8), 1101-1114, 1993.
7. Lake W., Rasmussen H., Goodman D.P.B. J. Membr. Biol., 32, 93-113, 1977.
8. Lew V.L., Ferreira H.J. Curr. Top. Membr. Transp., 10, 217-277, 1978.
9. Lew V.L., Tsien R.Y., Miner C., Bookchip R.M. Nature, 296, 478-481, 1982.
10. Mason M.J., Mayer B., Hymel L.J. Am. J. Physiol., 33, 654-662, 1993.
11. Meltzer H.I., Kassir S. Biochim. Biophys. Acta, 755, 452-456, 1983.
12. Schwarz W., Keim H., Fehlau R., Fuhrmann G.F. Biochim. Biophys. Acta, 987, 32-36, 1989.
13. Shields M., Grygorczyk R., Fuhrmann G.F., Schwarz W., Passow M. Biochim. Biophys. Acta, 815, 223-233, 1985.
14. Szasz I., Sarcadi B., Gardos G. J. Membr. Biol., 35, 75-93, 1977.

Поступила 18.VII.1999

Биолог. журн. Армении, 2 (52), 1999

УДК 612.017.1

МЕМБРАНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ АДРИАМИЦИНА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С Fe^{3+} , Cu^{2+} И Co^{2+}

Л.А. АВАНЕСЯН, Т.К. ДАВТЯН, Ю.Т. АЛЕКСАНИЯН

*Институт эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им.
А.Б. Алексаняна, МЗ Армении, 375009, Ереван*

Установлено, что адриамицин (АДР) и его комплексы с Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} способны индуцировать агрегацию и агглютинацию эритроцитов человека, резистентность эритроцитов барана (ЭБ) к комплементзависимому гемолизу, дегрануляцию тучных клеток крыс и синтез свободных радикалов в лимфоцитах человека. Комплексообразование АДР с вышеуказанными ионами металлов приводит к модуляции мембранотропной активности АДР.

Ցույց է տրված, որ ադրիամիցինը և նրա Fe^{3+} , Cu^{2+} և Co^{2+} մետաղային միացությունները ընդունակ են խթանելու մարդու էրիթրոցիտների ագրեգացիան և ագլյուտինացիան, ոչխարի էրիթրոցիտների ռեզիստենտականությունը կոմպլեմենտ-կախյալ հեմոլիզի հանդեպ, առնետների գիրացած բջիջների դեգրանուլյացիան և ազատ ռադիկալների սինթեզը մարդու լիմֆոցիտներում: Ադրիամիցինի միացումը նշված մետաղային իոնների հետ բերում է նրա մեմբրանոտրոպ ակտիվության մոդուլյացիային:

It has been shown, that adriamycin and its metal complexes with Fe^{3+} , Cu^{2+} and Co^{2+} can induce human erythrocytes aggregation and agglutination, sheep erythrocytes resistance to complement-dependent hemolysis, rat mast cells degranulation and free radicals generation in human lymphocytes. Formation of adriamycin complexes with mentioned metal ions leads to the modulation of its membranotropic activity.

Адриамицин - металлокомплексы - агглютинация эритроцитов - дегрануляция тучных клеток - свободные радикалы

Изучение молекулярных механизмов действия различных лекарственных препаратов лежит в основе разработки эффективных и безопасных подходов к

лекарственной терапии. Начальным этапом воздействия лекарственных препаратов является их влияние на плазматическую мембрану, проницаемость, вязкость, сопряженный транспорт ионов. Исследуя влияние АДР и его комплексов на сопряженный транспорт ионов в эритроцитах человека, мы показали, что противоположные эффекты этих препаратов на Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы зависят как от способности АДР и его комплексов влиять на пути транспорта Ca^{2+} в клетки, так и от их участия в окислительно-восстановительных реакциях [6].

Целью настоящей работы явилось изучение мембранотропного действия АДР и его комплексов с Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} на процессы агрегации и агглютинации эритроцитов человека, дегрануляции тучных клеток крыс, комплементзависимого гемолиза ЭБ, а также на синтез свободных радикалов в лимфоцитах человека.

Материал и методика. Для реакции гемагглютинации были использованы эритроциты человека группы 0. В качестве антикоагулянта использовали 2%-ный цитрат Na . Перед использованием эритроциты тщательно отмывали в фосфатном буфере (рН 7.2), после чего готовили 2%-ную суспензию эритроцитов. Реакцию гемагглютинации проводили в 96-луночных пластиковых планшетах для иммунологических реакций. В экспериментах также использовали конканавалин А (Кон А) фирмы Serpa в концентрации 0.0035-50 мкг/мл. Комплексы АДР с Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} готовили в молярном соотношении 3:1 [10]. Конечная концентрация АДР и его комплексов составляла 3.5-100 мкг/мл. В экспериментах также использовали 0.02 М растворы CuSO_4 , $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и 0.2 М раствор FeCl_3 . Конечная концентрация ионов Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} в среде составляла 2.5×10^{-4} и 5×10^{-4} М соответственно. После 60 мин инкубации эритроцитов при 37° оценивали степень агглютинации.

При исследовании дегрануляции тучных клеток [4] использовали тучные клетки перитонеальной жидкости белых нелинейных крыс.

Для изучения синтеза свободных радикалов использовали тонзиллярные лимфоциты человека. Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) и цитохрома С проводили по методу [13]. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) определяли по методу [5]. Оптическую плотность определяли при 540 нм.

Комплементзависимую реакцию гемолиза ЭБ проводили по описанной методике [3]. Перед проведением реакции ЭБ инкубировали с АДР и его металлокомплексами в течение 30 мин.

Агрегацию эритроцитов человека исследовали с помощью агрегометра "Payton" 300 BD-5 (Payton Scientific Inc.) по описанной методике [1]. Скорость перемешивания - 900 об/мин, концентрация эритроцитов - 0.1%, концентрация АДР и его комплексов - 250 мкг/мл.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных экспериментов показали, что ЭБ, обработанные АДР и его металлокомплексами, более устойчивы к комплементзависимому гемолизу (рис. 1). Это свидетельствует о связывании АДР и его комплексов либо с белковыми компонентами мембран эритроцитов, препятствующем последующему взаимодействию последних с гемолизинами, либо с липидной фракцией мембран, что нарушает связывание с ней компонентов комплемента. Комплексообразование АДР с ионами металлов переходной валентности вызывает изменение способности молекулы АДР индуцировать резистентность ЭБ к комплементзависимому гемолизу (рис.1).

Как показали результаты проведенных экспериментов, АДР и его металлокомплексы способны вызывать сильно выраженную агглютинацию

эритроцитов человека. Гемагглютинирующая активность комплекса АДР- Co^{2+} была выражена слабее, чем соответствующий показатель АДР и остальных двух комплексов. Установлено также, что добавление ионов Fe^{3+} в концентрации 2.5×10^{-4} М приводит к значительной агглютинации эритроцитов. Кроме того, необходимо отметить, что при совместном действии Кона с АДР, АДР- Fe^{3+} , АДР- Cu^{2+} и в меньшей степени с АДР- Co^{2+} гемагглютинация увеличивалась, в то время

как Кона в использованной концентрации не вызывает агглютинации эритроцитов. Согласно данным литературы, изменение гемагглютинирующей активности Кона может происходить за счёт переноса ионов переходного металла с донора на лектин и изменения конформации последнего [2]. В наших исследованиях свободные ионы Cu^{2+} ингибировали, а ионы Co^{2+} и, в большей степени, Fe^{3+} стимулировали гемагглютинирующую активность Кона. Таким образом, наши результаты подтверждают данные литературы о том, что изменение содержания и(или) ориентации ионов металла в субъединицах Кона влияет на его способность связывать сахара [2].

Разрешающая способность реакции гемагглютинации оказалась недостаточной для выявления тонких различий в действии АДР и его металлокомплексов. В то же время установлено, что наибольшую агрегацию эритроцитов как по степени ее, так и по скорости индуцирует АДР- Fe^{3+} , несколько менее выражена агрегация в присутствии АДР- Cu^{2+} (рис. 2).

Комплекс АДР- Co^{2+} проявлял наименьшую агрегирующую активность, а АДР занимал промежуточное положение. Образование и стабильность эритроцитарных агрегатов зависят от ряда характеристик эритроцитарных мембран: способности к адсорбции макромолекул, липидно-белковой архитектоники, плотности поверхностного отрицательного заряда и др. [1]. АДР, связываясь с мембранами эритроцитов, может индуцировать изменения указанных свойств мембран, способствуя тем самым образованию агрегатов.

Увеличение внутриклеточного Ca^{2+} под влиянием АДР [11] и трансформация дискоцитов в эхиноциты [9] могут лежать в основе механизмов, индуцирующих

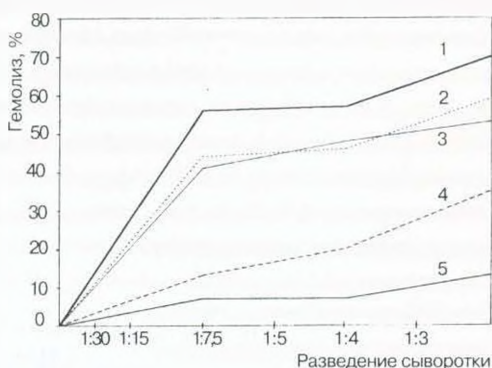


Рис. 1. Комплементзависимый гемолиз ЭБ, обработанных АДР и его металлокомплексами. 1 - контроль; 2 - АДР- Cu^{2+} ; 3 - АДР- Fe^{3+} ; 4 - АДР; 5 - АДР- Co^{2+} .

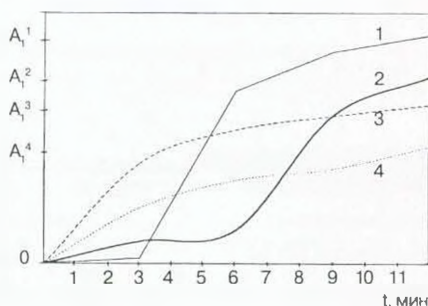


Рис. 2. Агрегатограмма индуцированной АДР и его металлокомплексами агрегации эритроцитов человека. По оси ординат - A_i степень агрегации, 0 - нулевая точка, соответствующая бедной эритроцитами суспензии (разведение 1:1000 рабочей суспензии). По оси абсцисс - время агрегации в мин. 1 - АДР- Fe^{3+} ; 2 - АДР- Cu^{2+} ; 3 - АДР; 4 - АДР- Co^{2+} .

агрегацию эритроцитов. Дезорганизация липидной фазы мембран при активации фосфолипаз [14] или изменения организации цитоскелета [8] также могут играть роль в мембранотропных эффектах АДР и его металлокомплексов.

В литературе есть данные о способности АДР вызывать дегрануляцию тучных клеток, однако точные механизмы этого эффекта остаются невыясненными [7]. В проведенных экспериментах как АДР, так и все три исследуемых комплекса в концентрации 2 мкг/мл вызывали значительную дегрануляцию тучных клеток (табл.1).

Таблица 1. Дегрануляция тучных клеток под действием АДР, АДР- Fe^{3+} , АДР- Cu^{2+} и АДР- Co^{2+}

Условия эксперимента	Дегрануляция, % от общего числа тучных клеток
Контроль	13.4%±3.4
АДР	61.2%±2.2
АДР- Fe^{3+}	42.5%±6.5
АДР- Cu^{2+}	44.5%±2.4
АДР- Co^{2+}	65.2%±4.2

Наибольший индуцирующий дегрануляцию эффект наблюдался в присутствии АДР- Co^{2+} ; наименьший - в присутствии АДР- Fe^{3+} . АДР индуцировал дегрануляцию тучных клеток на 47.8% больше, чем в контроле, в то время как АДР- Cu^{2+} - на 31.1%.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволяют заключить, что способность АДР индуцировать дегрануляцию тучных клеток изменяется при его комплексообразовании с металлами в сторону увеличения (АДР- Co^{2+}) или уменьшения (Fe^{3+} , Cu^{2+}). Следовательно, в механизмах действия АДР на дегрануляцию тучных клеток важную роль играет окислительно-восстановительное состояние его молекулы.

Результаты экспериментов по изучению влияния АДР и его комплексов с Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} на синтез свободных радикалов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние АДР, АДР- Fe^{3+} , АДР- Cu^{2+} и АДР- Co^{2+} на синтез свободных радикалов в лимфоцитах человека.

Условия эксперимента	НСТ	Восстановление цитохрома С	ПОЛ
Контроль	0.119	0.35	0.054
АДР	0.122	0.44	0.068
АДР- Fe^{3+}	0.173	0.54	0.062
АДР- Cu^{2+}	0.146	0.49	0.059
АДР- Co^{2+}	0.140	0.44	0.076

Результаты экспериментов по исследованию восстановления НСТ свидетельствуют о том, что наибольшей способностью генерировать супероксид анион обладает комплекс АДР- Fe^{3+} . АДР проявляет минимальную способность к индукции синтеза O_2^- по сравнению с изученными металлокомплексами.

Таким образом, ионы металлов переходной валентности способствуют образованию свободных радикалов при действии АДР, возможно, благодаря их способности выступать в качестве доноров или акцепторов в реакциях циклического окисления-восстановления молекул АДР.

Аналогичные результаты были получены при исследовании реакции восстановления цитохрома С под влиянием АДР и его металлокомплексов. Максимальной способностью к восстановлению цитохрома С обладал комплекс АДР- Fe^{3+} , затем АДР- Cu^{2+} . АДР и АДР- Co^{2+} индуцировали восстановление цитохрома С в одинаковой степени. Как показал сравнительный анализ, наибольшее ПОЛ обнаруживается в присутствии АДР- Co^{2+} , наименьшее - АДР- Cu^{2+} . АДР и АДР- Fe^{3+} по степени своего влияния на ПОЛ занимали промежуточное положение. Возможно, АДР- Cu^{2+} - и АДР- Fe^{3+} - индуцированный супероксид анион скорее дисмутирует в H_2O_2 супероксиддисмутазой и поэтому не вызывает ПОЛ.

Итак, как АДР, так и его комплексы с Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} способны индуцировать синтез свободных радикалов, причем эта способность варьирует в зависимости от металла, используемого для комплексообразования с АДР. Из изученных металлокомплексов наименьшей способностью к индукции синтеза свободных радикалов обладал АДР- Co^{2+} . Стимуляция АДР и его комплексами дегрануляции тучных клеток может быть опосредована свободными радикалами. Обнаружена корреляция между влиянием АДР и его комплексов на ПОЛ и на дегрануляцию тучных клеток. АДР- Co^{2+} , наиболее сильно индуцирующий ПОЛ, оказывал также наибольшее стимулирующее действие на дегрануляцию тучных клеток, в то же время АДР- Cu^{2+} и АДР- Fe^{3+} , слабо индуцирующие ПОЛ по сравнению с АДР, оказались и наименее эффективными в стимуляции дегрануляции клеток. Известно, что на начальных этапах высвобождения медиаторов из тучных клеток или базофилов происходит быстрый вход Ca^{2+} в клетки, активация сериновых протеаз и уменьшение внутриклеточного цАМФ. Увеличение внутриклеточного Ca^{2+} и уменьшение цАМФ обнаружены в клетках под влиянием АДР [8,11,14]. Нарушение метаболизма арахидоновой кислоты под влиянием АДР и его комплексов позволяет предполагать участие простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов в процессе влияния указанных препаратов на дегрануляцию тучных клеток [12].

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать заключение о том, что АДР и его комплексы с Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} обладают мембранотропной активностью. Ионы металлов переменной валентности способны модулировать мембранотропную активность АДР, что указывает на ее зависимость от окислительно-восстановительного состояния молекулы АДР.

- Поступила 8.VI.1998

УДК 630.232

Պ.Ա. ԽՈՒՐՇՈՒԴՅԱՆ, Գ.Գ. ՄՈՎՍԻՍՅԱՆ, Ա.Ա. ԶԱՐԶՕՂԼՅԱՆ

ՀՀ ՉԱԿ Բուսաբանության ինստիտուտ, 375063, Երևան

Приведены 2-летние данные о росте и развитии 12 сортов и клонов американских гибридных тополей из 5 почвенно-климатических районов Армении. Выявлено, что гибридные тополя теплолюбивы и по мере увеличения высоты над ур. м. снижаются темпы их роста. Интенсивный рост отмечается со второго года посадки, и их годичный прирост составляет 150-250 см. С точки зрения