

ВЛИЯНИЕ ТРИФЕНИЛТЕТРАДЕЦИЛФОСФОНИЯ БРОМИДА И ТРИБУТИЛГЕКСАДЕЦИЛФОСФОНИЯ БРОМИДА НА КЛЕТОЧНУЮ ПРОНИЦАЕМОСТЬ У ЛИЦ, ИМЕЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОЕ НАРУШЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Ольга Валериановна Орлова, Владимир Николаевич Ослопов,
Светлана Анатольевна Сидуллина*

Казанский государственный медицинский университет

Реферат

Цель. Сравнительное изучение влияния новых биологически активных веществ бромидов трифенилтетрадецилфосфония и трибутилгексадецилфосфония на проницаемость мембран клеток по натрию путём определения скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -противотранспорта в мембране эритроцита у лиц с генетически детерминированной высокой проницаемостью мембран по натрию.

Методы. Исследована кровь 8 здоровых добровольцев, которые, согласно популяционному квартильному распределению величин скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -противотранспорта в мембране эритроцита, относились к лицам IV квартиля скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -противотранспорта, то есть к лицам с высокой мембранной проницаемостью. Изучали влияние различных концентраций бромидов трифенилтетрадецилфосфония и трибутилгексадецилфосфония (обладающих антибактериальным и фунгицидным эффектом) на скорость $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -противотранспорта в мембране эритроцита *in vitro* по методу M. Canessa и соавт.

Результаты. Показано, что изменение проницаемости клеточной мембраны по натрию под влиянием веществ трифенилтетрадецилфосфония бромид (C_{14}) и трибутилгексадецилфосфония бромид (C_{16}) зависит от исходного генетически детерминированного состояния клеточной мембраны. При этом вещество C_{14} уменьшает проницаемость мембран эритроцитов по натрию у исследуемых, принадлежащих к IV квартилю скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -противотранспорта, в концентрации 0,05 мкМ, а C_{16} увеличивает проницаемость мембраны эритроцитов по натрию у тех же исследуемых в концентрациях 0,001 и 0,005 мкМ. В свете этого для создания лекарственной формы с антибактериальным и фунгицидным действием наиболее эффективным для людей IV квартиля скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -противотранспорта является биологически активное вещество трибутилгексадецилфосфония бромид, если ставится задача увеличить проницаемость мембран; а если ставится задача уменьшить проницаемость мембран, то таким веществом служит трифенилтетрадецилфосфония бромид.

Вывод. Вещества C_{14} и C_{16} по-разному влияют на проницаемость клеточных мембран по натрию у лиц, имеющих генетически детерминированную повышенную мембранную проницаемость.

Ключевые слова: проницаемость мембран эритроцитов, трифенилтетрадецилфосфония бромид, трибутилгексадецилфосфония бромид, $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -противотранспорт.

EFFECTS OF TRIPHENYLTETRADECYLPHOSPHONIUM BROMIDE AND TRIBUTYLHEXADECYLPHOSPHONIUM BROMIDE ON CELLULAR PERMEABILITY IN PATIENTS WITH HEREDITARY CELLULAR MEMBRANE HYPERPERMEABILITY

O.V. Orlova, V.N. Osloпов, S.A. Sidullina. Kazan State Medical University, Kazan, Russia.

Aim. Comparative analysis of effects of novel biologically active agents: triphenyltetradecylphosphonium bromide and tributylhexadecylphosphonium bromide on cell membrane permeability for sodium by determination of $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -counter-transport speed in erythrocyte membrane at patients with genetically determined high membrane permeability for sodium.

Methods. Blood samples of 8 healthy volunteers who were classified as persons belonging to IV population quartile according to $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -counter-transport speed in erythrocyte membrane, i.e. persons with high membrane permeability, were studied. Effects of different concentrations of triphenyltetradecylphosphonium bromide and tributylhexadecylphosphonium bromide (known by antibacterial and antifungal action) on $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -counter-transport speed in erythrocyte membrane *in vitro* according to the method proposed by M. Canessa et al. **Results.** Effect of triphenyltetradecylphosphonium bromide (C_{14}) and tributylhexadecylphosphonium bromide (C_{16}) on cell membrane permeability for sodium depends on the genetically determined baseline cell membrane state. C_{14} reduced the erythrocyte membrane permeability for sodium in studied patients belonging to IV quartile of $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -counter-transport speed if administered in a concentration of 0.05 μM . C_{16} increased membrane permeability for sodium in the same group if administered in concentrations of 0.001 and 0.005 μM . Thus, tributylhexadecylphosphonium bromide is better suitable for designing a drug with antibacterial and antifungal action for patients belonging to IV quartile of $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -counter-transport speed, if $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -counter-transport speed reduction is wanted. If $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -counter-transport speed increase is wanted, triphenyltetradecylphosphonium bromide is better suitable. **Conclusion.** C_{14} and C_{16} substances affect cell membrane permeability for sodium in patients with genetically determined high membrane permeability for sodium. **Keywords:** erythrocyte membrane permeability, tributylhexadecylphosphonium bromide, triphenyltetradecylphosphonium bromide, $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -counter-transport.

Биологически активные вещества (БАВ) C_{14} (трифенилтетрадецилфосфония бромид) и C_{16} (трибутилгексадецилфосфония бромид) синтезированы на кафедре высокомолекулярных и элементоорганических соединений Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского

(Приволжского) федерального университета. Их фармакологические свойства изучали на кафедре высокомолекулярных и элементоорганических соединений. Доказан антибактериальный и фунгицидный фармакологический эффект этих БАВ [2].

Адрес для переписки: olqa570821@yandex.ru

Один из факторов, определяющих биодоступность лекарственных форм, — интенсивность

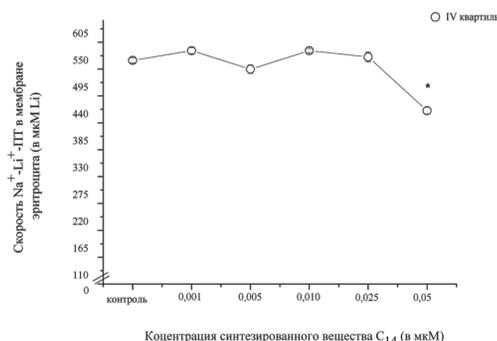


Рис. 1. Влияние C₁₄ на скорость Na⁺-Li⁺-противотранспорта (Na⁺-Li⁺-ПТ) в мембране эритроцита у лиц IV квартиля скорости Na⁺-Li⁺-ПТ. *Статистическая значимость различий (p < 0,05) между исходными величинами скорости Na⁺-Li⁺-ПТ и величинами, полученными в результате воздействия исследуемых веществ.

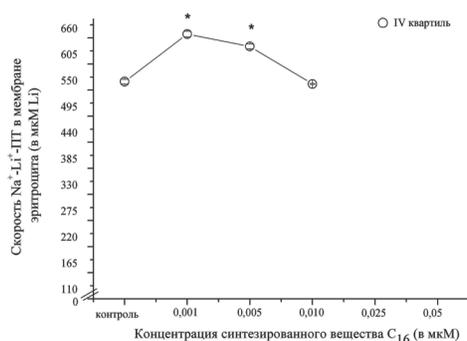


Рис. 2. Влияние C₁₆ на скорость Na⁺-Li⁺-противотранспорта (Na⁺-Li⁺-ПТ) в мембране эритроцита у лиц IV квартиля скорости Na⁺-Li⁺-ПТ. *Статистическая значимость различий (p < 0,05) между исходными величинами скорости Na⁺-Li⁺-ПТ и величинами, полученными в результате воздействия исследуемых веществ.

высвобождения из них лекарственных веществ, которая служит также одним из критериев выбора оптимального состава веществ [3]. Кинетику высвобождения лекарственного вещества из лекарственных форм изучают методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану.

В настоящее время для изучения проницаемости стали активно использовать мембраны клеток крови. В клинической практике можно оценивать проницаемость клеточной мембраны по Na⁺, изучая так называемую облегчённую диффузию Na⁺, осуществляемую белком-переносчиком, то есть Na⁺-Li⁺-противотранспорт (Na⁺-Li⁺-ПТ), по методике М. Canessa и соавт. [11]. Важно отметить, что Na⁺-Li⁺-ПТ на 80% генетически детерминирован.

В.Н. Ослоповым и соавт. [1, 8, 9, 11] были определены границы квартилей (КВ) популяционного (у 643 человек – 417 мужчин и 226 женщин) распределения величин скорости Na⁺-Li⁺-ПТ в мембране эритроцита [в микромолях Li на 1 л клеток (эритроцитов) в час, далее «в мкМ Li»]: I КВ – 38–203, II КВ – 204–271, III КВ – 272–345, IV КВ – 346–730. Условно считают, что величины скорости Na⁺-Li⁺-ПТ I КВ соответствуют низкой проницаемости по Na⁺, II КВ – средней, III КВ – умеренно высокой, IV КВ – высокой проницаемости по Na⁺. IV КВ Na⁺-Li⁺-ПТ – мембранные нарушения («мембранный дефект»).

Цель исследования – сравнительное изучение влияния новых БАВ C₁₄ (трифенилтетрадецилфосфония бромид) и C₁₆ (трибутилгексадецилфосфония бромид) на проницаемость мембран клеток по Na⁺ путём определения скорости Na⁺-Li⁺-ПТ в мембране эритроцита с позиции её генетически особого исходного состояния, в данном случае – у людей с исходно высокой проницаемостью по Na⁺, то есть имеющих генетически детерминированные мембранные нарушения (по Ю.В. Постнову). На основе полученных данных будет проводиться выбор БАВ для создания лекарственной формы с антибактериальным и

фунгицидным действием, наиболее эффективной для людей IV КВ скорости Na⁺-Li⁺-ПТ.

Исследована кровь 8 здоровых добровольцев, относящихся к IV КВ популяционного распределения величин скорости Na⁺-Li⁺-ПТ в мембране эритроцита (лица с высокой проницаемостью по Na⁺). Ранее нами были подобраны параметры определения скорости Na⁺-Li⁺-ПТ в мембране эритроцита применительно к задачам исследования и концентраций веществ для исследования *in vitro* [5–7], на что был получен патент [10].

Изучали влияние различных концентраций исследуемых веществ на скорость Na⁺-Li⁺-ПТ в мембране эритроцита *in vitro*. Определение скорости Na⁺-Li⁺-ПТ в мембране проводили по методу М. Canessa и соавт. [13], при котором изучают (путём определения концентрации ионов) обмен внутриклеточного лития в загруженных этим ионом клетках на внеклеточный натрий и магний из среды инкубации. Концентрацию лития регистрировали методом атомной абсорбционной спектроскопии в эмиссионном режиме (СА-455 ПО КОМЗ). Исследования проводили в лаборатории клеточных мембран кафедры пропедевтики внутренних болезней Казанского государственного медицинского университета (КГМУ) и в лаборатории спектроскопии кафедры медицинской и биологической физики КГМУ.

Кровь в количестве 3 мл забирали из вены самогёмом в пластиковые пробирки, смоченные гепарином (20 ЕД на 1 мл крови), содержимое перемешивали, пробирки помещали в контейнер с тающим льдом.

Максимальная скорость Na⁺-Li⁺-ПТ (V) в микромолях Li на 1 л клеток (эритроцитов) в час определялась как разность между концентрациями лития в среде, богатой натрием (A_{Na}), и в среде, свободной от натрия (A_{Mg}), через 60 мин инкубации по формуле:

$$V = (A_{Na} - A_{Mg}) \times k, \text{ где коэффициент } k=33.$$

Исследуемые вещества в различных концентрациях вносили в среду В (среда с Na^+ при 1-часовой инкубации). Исследования проводили со следующими концентрациями веществ: 0,001; 0,005; 0,01; 0,025 и 0,05 мкМ. Оценку влияния изучаемого вещества на проницаемость клеточных мембран по Na^+ проводили путём подбора такой концентрации, которая не вызывала бы гемолиза эритроцитов (гемолиз определяли визуально). Средняя величина скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+\text{-ПТ}$ у людей IV KB — 569 ± 5 мкМ Li.

У добровольцев, принадлежащих к IV KB скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+\text{-ПТ}$, при внесении исследуемых веществ в среду В были получены следующие результаты. БАВ C_{14} в концентрациях 0,001 и 0,005 мкМ не оказало влияния на проницаемость по Na^+ (588 ± 6 и 550 ± 9 мкМ Li соответственно), в то же время при концентрации 0,05 мкМ проницаемость по Na^+ уменьшилась ($465 \pm 6^*$ мкМ Li) (рис. 1). БАВ C_{16} в концентрациях 0,001 и 0,005 мкМ ($668 \pm 6^*$ и $642 \pm 5^*$ мкМ Li), наоборот, повысило проницаемость по Na^+ (рис. 2).

Таким образом, изменение проницаемости клеточной мембраны по натрию под влиянием трифенилтетрадецилфосфония бромид (C_{14}) и трибутилгексадецилфосфония бромид (C_{16}) зависит от исходного генетически детерминированного состояния клеточной мембраны. Вещество трифенилтетрадецилфосфония бромид в концентрации 0,05 мкМ уменьшило скорость $\text{Na}^+\text{-Li}^+\text{-ПТ}$ до 465 мкМ Li (на 8,2%), вещество трибутилгексадецилфосфония бромид при концентрации 0,001 мкМ повысило скорость $\text{Na}^+\text{-Li}^+\text{-ПТ}$ до 668 мкМ Li (на 11,7%), при концентрации 0,005 мкМ — до 642 мкМ Li (на 11,3%). Более низкие концентрации (0,001–0,025 мкМ) трифенилтетрадецилфосфония бромид не оказывали существенного влияния на проницаемость клеточной мембраны для Na^+ , а более высокая концентрация трибутилгексадецилфосфония бромид (0,01 мкМ) не оказала влияния на проницаемость клеточной мембраны для Na^+ .

Поясним, что мембранные нарушения по Ю.В. Постнову представляют собой определённую цепь событий и структурно-функциональных изменений в клетке, к которым относятся:

- динамические мутации и модификация функций генов, кодирующих структуру мембранных белков (в том числе переносчиков ионов);
- изменение в фосфатидилинозитной трансмембранной сигнальной системе клеток;
- повышение активности протеинкиназы С;
- усиление цитоскелет-зависимых реакций и фосфорилирования некоторых белков;
- повышение микровязкости липидного бислоя;
- увеличение скорости Na^+/H^+ , Na^+/Na^+ -обменов и Na^+/K^+ -котранспорта;
- понижение величины трансмембранного потенциала;
- увеличение скорости входа Ca^{2+} в клетку;
- уменьшение Ca^{2+} -связывающей способности внутренней поверхности плазматической мембраны;

- уменьшение кальмодулин-стимулируемой компоненты АТФ-зависимого транспорта Ca^{2+} ;

- повышение концентрации свободных Ca^{2+} и Na^+ в клетке;

- повышение pH в цитоплазме (защелачивание клетки);

- изменение преобразования энергии в митохондриях с уменьшением синтеза АТФ.

Результатом мембранных нарушений и их главной составляющей — избыточного накопления внутриклеточного Ca^{2+} — является клеточный ресеттинг, то есть механизм клеточной адаптации, предохраняющий и сохраняющий специфическую функцию клеток в условиях хронического повышения концентраций цитоплазматического Ca^{2+} .

Отметим, что большая скорость $\text{Na}^+\text{-Li}^+\text{-ПТ}$ — маркёр мембранных нарушений, так как физиологическое значение $\text{Na}^+\text{-Li}^+\text{-ПТ}$ пока остаётся неизвестным, скорее всего, оно совсем незначимо.

Таким образом, у исследуемых, принадлежащих к IV KB скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+\text{-ПТ}$, БАВ C_{14} в дозе 0,05 мкМ уменьшает проницаемость мембраны клетки по Na^+ , БАВ C_{16} в концентрациях 0,001 и 0,005 мкМ повышает проницаемость мембраны клетки по Na^+ .

ВЫВОДЫ

1. Изменение проницаемости клеточной мембраны по Na^+ под влиянием веществ трифенилтетрадецилфосфония бромид (C_{14}) и трибутилгексадецилфосфония бромид (C_{16}) зависит от исходного генетически детерминированного состояния клеточной мембраны.

2. Трифенилтетрадецилфосфония бромид (C_{14}) уменьшает проницаемость мембран эритроцитов по Na^+ у исследуемых, принадлежащих к IV квартилю скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -протivotранспорта (в концентрации 0,05 мкМ).

3. Трибутилгексадецилфосфония бромид (C_{16}) увеличивает проницаемость мембраны эритроцитов по Na^+ у исследуемых, принадлежащих к IV квартилю скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -протivotранспорта (в концентрациях 0,001 и 0,005 мкМ).

4. Для создания лекарственной формы с антибактериальным и фунгицидным действием, наиболее эффективным для индивидуумов IV квартиля скорости $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -протivotранспорта, если ставится задача увеличить проницаемость мембран, является трибутилгексадецилфосфония бромид; а если ставится задача уменьшить проницаемость мембран, то таким веществом является трифенилтетрадецилфосфония бромид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боявленская О.В. Особенности взаимосвязи состояния мембранной проницаемости эритроцитов по натрию и развития артериальной гипертензии у женщин в популяции // Рос. кардиол. ж. — 2004. — №5 (49). — С. 51–57.

2. Галкина И.В., Мельникова Н.Б., Тудрий Е.В. и др. Взаимодействие солей фосфония с липидными компо-

- нентами мембран // Фармация. — 2009. — №4. — С. 35–38.
3. Овчинникова Л.К., Ягудина Р.И. О взаимодействии лекарственных средств (часть I) // Рос. аптеки. — 2006. — №10/2. — С. 23–25.
4. Овчинникова Л.К., Ягудина Р.И. О взаимодействии лекарственных средств (часть II) // Рос. аптеки. — 2006. — №11/1. — С. 26–27.
5. Орлова О.В., Егорова С.Н., Ослопов В.Н. Исследование влияния диметилсульфоксида на проницаемость клеточных мембран // Каз. мед. ж. — 2011. — Т. ХСII, №6. — С. 901–904.
6. Орлова О.В., Ослопов В.Н., Сидуллина С.А. Влияние новых синтезированных веществ C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} на проницаемость клеточных мембран для ионов натрия в модели *in vitro* // Каз. мед. ж. — 2012. — Т. ХСIII, №3. — С. 505–507.
7. Орлова О.В., Ослопов В.Н., Сидуллина С.А. Влияние трифенилтетрадецилфосфония бромиды на скорость Na^+Li^+ -противотранспорта в мембране эритроцита у пациентов с генетически различной проницаемостью мембран по натрию // Каз. мед. ж. — 2012. — Т. ХСIII, №5. — С. 789–791.
8. Ослопов В.Н. Артериальная гипертензия и клеточная мембрана (теория и практика мембранной концепции первичной артериальной гипертензии Ю.В. Постнова) // Казань: МедДоК, 2012. — 460 с.
9. Ослопов В.Н., Заббарова А.Т., Богданов Э.И. Клиническое значение определения ионтранспортных функций клеточных мембран при гипертонической болезни и её церебральных осложнениях // Каз. мед. ж. — 2000. — Т. XXXI, №3. — С. 211–215.
10. Ослопов В.Н., Орлова О.В. Способ оценки влияния лекарственных веществ на проницаемость клеточных мембран по натрию. Патент на изобретение №2494403. Бюлл. №27 от 27.09.2013.
11. Ослопов В.Н., Пикуза О.И., Вахитов Х.М., Кораблёва А.А. Скорость натриево-литиевого противотранспорта в мембране эритроцита у часто болеющих детей // Педиатрия. — 2006. — №3. — С. 21–24.
12. Постнов Ю.В., Орлов С.Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. — М.: Медицина, 1987. — 192 с.
13. Canessa M., Adragna N., Solomon H. et al. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension // New Engl. J. Med. — 1980. — Vol. 302. — P. 772–776.

Правила для авторов —

на сайте «Казанского медицинского журнала»:

www.kazan-medjournal.ru