

ОЦЕНКА МЕМБРАНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO* / *IN VIVO*

Е.К. Власенко, С.И. Сычик, И.И. Ильюкова, В.А. Грынчак

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Минск,

Республика Беларусь

e-mail: evgenii_vlasenko@mail.ru

Введение

В результате выполнения Государственной программы «Инновационные биотехнологии» (2013–2015 г.г.) учеными Института биоорганической химии НАН Беларуси разработан оригинальный биопрепарат «Эфаламин» на основе гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты (ГЭ-АЛК). В целях обоснования и проведения мероприятий, направленных на защиту здоровья человека и среды его обитания необходимо выявить закономерности проявления токсических свойств ГЭ-АЛК при различных режимах и путях воздействия. Особая роль в проведении таких исследований принадлежит изучению токсичности соединения на теплокровных животных, в результате которого устанавливают величины пороговых и подпороговых доз.

В ряде проведенных экспериментов нами установлены основные токсикометрические характеристики ГЭ-АЛК [1, 2, 4], при этом, ряд полученных данных свидетельствует о наличии мембраноповреждающего действия препарата [4]. Для более детального выявления лимитирующих показателей воздействия и изучения механизмов токсического действия требуется проведение исследований с применением специальных методов, позволяющих определить характер взаимодействия химического вещества с мембраной, изменение активности мембранных систем и структуры самой мембраны.

Биологические мембраны первыми реагируют на неблагоприятное воздействие внешних химических факторов и во многих случаях подобные изменения лежат в основе нарушения жизнедеятельности клеток, болезни и смерти организма. Поэтому выяснение роли и изучение механизма нарушений структуры и функции мембран в патологическом процессе (в т.ч. при изучении химических интоксикаций) – одна из важнейших задач медико-биологических исследований биологически активных соединений [5].

Для изучения структурно-функционального состояния клеточных мембран уже более сорока лет используется метод флуоресцентных зондов [6]. Флуоресценция зондов отражает те изменения в мембране и клетке, которые происходят под действием биологически активного соединения, и, с помощью различных зондов можно качественно и количественно охарактеризовать его мембранотропные эффекты [5].

Настоящая работа посвящена изучению мембранотропных свойств ГЭ-АЛК путем регистрации изменений параметров флуоресценции пирена в мембранах эритроцитов крыс *in vivo* и *in vitro*.

Методы исследования

В экспериментальной работе использовали синтезированный в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси ГЭ-АЛК, представляющий собой белый кристаллический порошок со слабым характерным запахом, хорошо растворимый в воде.

Изучение структурно-функциональных свойств мембран проводили с применением флуоресцентного зонда пирена, вносимого в суспензию теней эритроцитов белых крыс. Схема эксперимента включала две серии опытов: первый – с использованием теней эритроцитов, которые подвергали воздействию ГЭ-АЛК в концентрациях 2×10^{-5} , 2×10^{-4} , 2×10^{-3} моль \times л $^{-1}$, второй - для исследований использовали белых крыс, получавших изучаемое

соединение перорально в максимально переносимой дозе 440 мг/кг в течение 30-ти суток по условиям, изложенным нами ранее [4].

Кровь отбирали в стеклянные центрифужные пробирки по 1,5 мл (в качестве антикоагулянта использовали гепарин в конечной концентрации 5 Ед/мл крови). Для получения эритроцитарной пасты кровь центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин (центрифуга ОПН-3, Россия). Супернатант и лейкоцитарную пленку отбрасывали. Эритроциты трижды промывали переосаждением в изотоническом 0,155 М охлажденном растворе NaCl.

Тени эритроцитов получали по методу J.T. Dodge [7] с незначительной модификацией. Гемолиз осуществляли ресуспендированием отмытых эритроцитов в соотношении осадок/буфер, равном 1/15 в ледяном 10 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7,2, содержащем 1 мМ ЭДТА. Лизис проводили в течение 12 часов. Тени осаждали при 4°C в течение 40 мин при 16000 g. Полученный осадок ресуспендировали в том же буфере и оставляли на 30 мин. Через 30 мин тени эритроцитов осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 30 мин, операцию повторяли 3–4 раза в том же буфере. Суспензию теней эритроцитов, полученную в изоосмотической среде, содержащей 0,100 М NaCl и 0,050 М натрий-фосфатный буфер pH 7,3, хранили при 4°C.

Регистрацию стационарных спектров флуоресценции пирена в тенях проводили на спектрофлуориметре CM 2203 «Solar» (Беларусь) при 20°C. Внедрение пирена осуществляли путем преинкубации спиртового раствора зонда (10 мг/50 мл) в суспензии теней (0,35–0,36 мг белка/мл) в 0,050 М натрий-фосфатном буфере pH 7,3, содержащем 0,100 М NaCl [8]. Конечная концентрация зонда в среде инкубации составляла 1,5 мкМ. Регистрацию спектров флуоресценции осуществляли при длинах волн возбуждения 337 и 286 нм. Микровязкость липидного окружения пирена оценивали по отношению интенсивностей эксимерной и мономерной (F_3/F_M) флуоресценции при $\lambda_{эм} = 475$ и 373 нм, соответственно. Микрополярность анализировали по отношению вибронных пиков в спектре флуоресценции мономеров с $\lambda_{эм} = 385$ и 373 нм; при длинах волн возбуждения 337 и 286 нм, соответственно. Состояние белковой компоненты теней оценивали по интенсивности флуоресценции мембранных триптофанилов $\lambda_{эм} = 330$ нм при $\lambda_{возб.} = 286$ нм. Спектральную ширину щелей на возбуждение и на испускание флуоресценции устанавливали равной 7.5 нм.

Эффективность переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков мембранных белков на пирен определяли по соотношению $(F_0 - F)/F_0$, где F_0 – интенсивность флуоресценции теней эритроцитов в отсутствие пирена, F – интенсивность флуоресценции теней эритроцитов после инкубации с пиреном.

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Количественные параметры представлены в виде среднего значения (M) и 95% доверительного интервала ($\pm 95\%$ ДИ). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что флуоресцентный зонд пирен локализуется в гидрофобной области биологических мембран и способен образовывать долгоживущие комплексы, состоящие из одной возбужденной и одной невозбужденной молекул – так называемые эксимеры. Спектр флуоресценции пирена состоит из нескольких пиков в диапазоне длин волн 350–400 нм, относящихся к мономерной форме и одного широкого пика в диапазоне 430–500 нм, соответствующего эксимерной форме пирена. Различные случаи тушения флуоресценции пирена в эксимерной и мономерной форме другими молекулами в мембране могут дать информацию о структурных изменениях липидного бислоя и мембранотропности изучаемого соединения [6].

При введении пирена в суспензию теней эритроцитов регистрировали спектр флуоресценции с пиками мономера на 373, 385, 393 нм и широкий пик эксимера на 475 нм ($\lambda_{возб.}$ 337 нм). Добавление к полученной системе ГЭ-АЛК в концентрациях 2×10^{-5} , 2×10^{-4} ,

2×10^{-3} моль \times л $^{-1}$ приводило к тушению флуоресценции пирена (рисунок 1) без заметного изменения соотношения между пиками мономера и эксимера (таблица 1).

Таблица 1 – Параметры флуоресценции пирена в суспензии теней эритроцитов при воздействии ГЭ-АЛК, усл. ед., $M(\pm 95\% \text{ДИ})$

Концентрация ГЭ-АЛК, моль \times л $^{-1}$	Интенсивность флуоресценции, $\lambda_{\text{эм.}} 475$ нм (эксимеров), F_3		Интенсивность флуоресценции, $\lambda_{\text{эм.}} 373$ нм (мономеров), F_M		Коэффициент эксимеризации (F_3/F_M), усл.ед.
	в отн.ед.	в %	в отн.ед.	в %	
контроль	61 (58-64)	100	120 (112-128)	100	0,51 (0,5-0,52)
2×10^{-5}	42 (39-45)	66	84 (78-89)	70	0,5 (0,49-0,51)
2×10^{-4}	26 (24-28)	41	51 (48-54)	43	0,51 (0,5-0,52)
2×10^{-3}	5 (4,6-5,3)	8	10 (9,3-10,6)	8	0,5 (0,49-0,51)

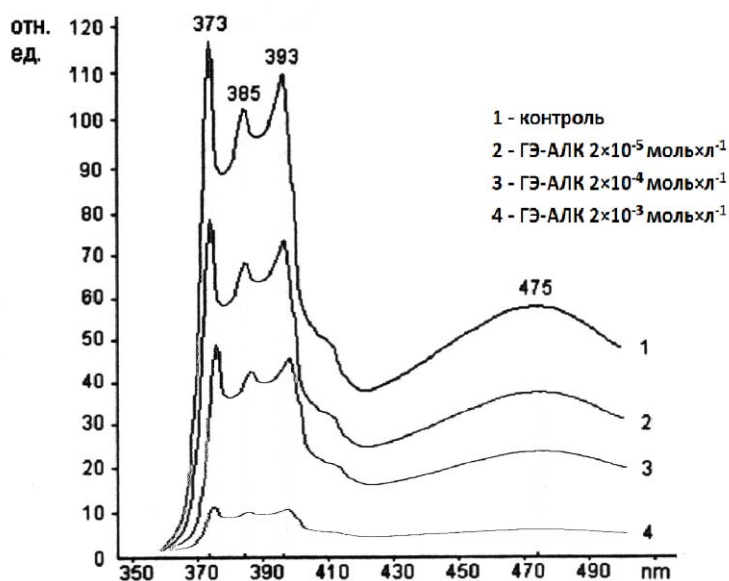


Рисунок 1 – Тушение флуоресценции пирена

Как следует из таблицы 1, тушение флуоресценции пирена происходит в широком диапазоне больших концентраций и носит дозозависимый характер. Величина коэффициента эксимеризации остается постоянной в диапазоне изученных доз и не отличается от контрольного значения. Таким образом, вероятно, причиной снижения интенсивности флуоресценции зонда без нарушения соотношения между пиками эксимера и мономера является деградация липидного бислоя при воздействии ГЭ-АЛК.

В ранее проведенном эксперименте *in vitro* на клетках эмбриональных фибробластов человека нами было показано, что ГЭ-АЛК оказывает цитотоксическое действие и заметно подавляет пролиферацию клеток [9]. Рассчитанная по параметрам клеточной гибели с применением пробит-анализа [10] величина среднеэффективной концентрации цитотоксического действия CL_{50} составляет $1,14 \times 10^{-4}$ ($1,08 \times 10^{-4} \div 1,21 \times 10^{-4}$) моль \times л $^{-1}$, $CL_{16} = 0,34 \times 10^{-4}$ моль \times л $^{-1}$, $CL_{84} = 4 \times 10^{-4}$ моль \times л $^{-1}$.

При сопоставлении установленных величин эффективных концентраций *in vitro* с данными флуоресцентного анализа, следует, что цитотоксическое действие ГЭ-АЛК реализуется в диапазоне концентраций, приводящих к снижению флуоресценции пирена как показателя деградации липидного бислоя. Данное обстоятельство должно отражать мембранотропность ГЭ-АЛК с точки зрения способности оказывать токсическое действие и позволяет использовать метод флуоресцентных зондов для углубленного изучения биологического действия данного соединения.

В субхроническом эксперименте на белых крысах динамика структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов свидетельствует о выраженном эффекте введенного ГЭ-АЛК на липид-белковые и липид-липидные взаимодействия в мембране (таблица 2, рисунок 2).

Таблица 2 – Структурные параметры мембран эритроцитов при субхроническом введении белым крысам ГЭ-АЛК в максимально переносимой дозе 440 мг/кг, усл. ед., $M(\pm 95\% \text{ДИ})$

Показатели флуоресценции пирена, усл. ед		Группы сравнения	
		Контроль	Опыт
Микровязкость	F_3/F_M (337)	0,63 (0,58-0,68)	0,81 (0,76-0,86)*
	F_3/F_M (286)	0,96 (0,91-1,01)	1,41 (1,36-1,46)*
Степень полярности	F_{385}/F_{373} (337)	0,99 (0,95-1,03)	0,98 (0,94-1,02)
	F_{385}/F_{373} (286)	1,01 (0,96-1,04)	1,03 (0,98-1,07)
Эффективность переноса энергии	$(F_0-F)/F_0$	0,121 (0,103-0,139)	0,075 (0,064-0,086)*

Примечание: * - различия статистически достоверны, $p \leq 0,05$

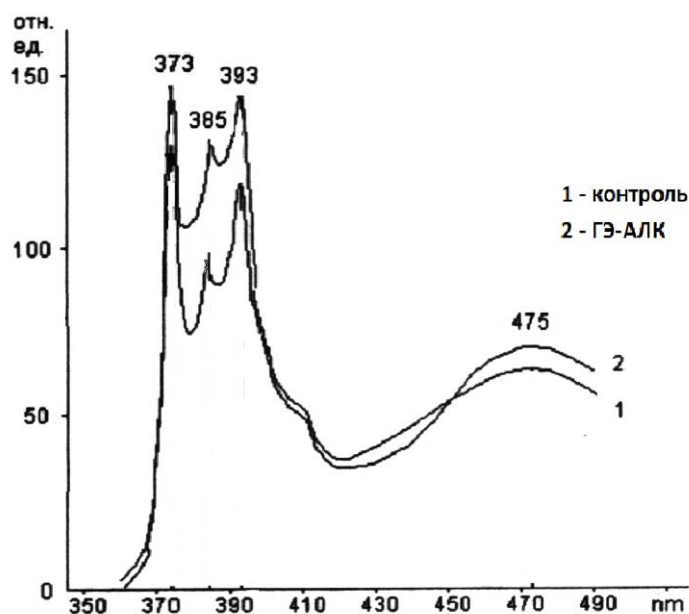


Рисунок 2 – Тушение флуоресценции пирена

Как следует из таблицы 2, последствия воздействия ГЭ-АЛК сказываются на величинах коэффициентов эксимеризации F_3/F_M (337) и F_3/F_M (286), которые после 30-тидневного введения препарата животным увеличиваются на 29% и 47%, соответственно. Поскольку по условиям методики параметр F_3/F_M (337) характеризует текучесть липидной фазы мембран, а параметр F_3/F_M (286) — текучесть аннулярных липидов [5], то полученные результаты указывают на зависимое от воздействия ГЭ-АЛК снижение микровязкости липидного бислоя и аннулярного липида.

Изучение значений параметров F_{385}/F_{373} (337) и F_{385}/F_{373} (286) не выявило достоверных отличий по сравнению с контролем, таким образом, воздействие ГЭ-АЛК не приводит к существенным изменениям полярности липидного бислоя и аннулярного (прибелкового) липида.

Исследование интенсивности безизлучательного переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков на пирен при воздействии ГЭ-АЛК выявило снижение эффективности переноса энергии $(F_0-F)/F_0$ с белков на пирен на 38%, что указывает на уменьшение погруженности белковых молекул в липидный бислой.

В субхроническом эксперименте на белых крысах были изучены кумулятивные свойства ГЭ-АЛК по схеме Кагана и Станкевича, в результате чего обнаружено, что 30-тидневное воздействие препарата в дозе 880 мг/кг приводит к повышению уровней аланинаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови подопытных животных. Также, при использовании данного подхода, ранее нами получены данные, свидетельствующие о повышении уровня содержания цитохрома P420 (неактивной формы цитохрома P450) в печени подопытных животных, получавших 440 мг/кг ГЭ-АЛК [9].

Характер изменений показателей ферментных систем указывает на проявление мембраноповреждающего действия препарата. Так, патофизиологической основой гиперферментемии (повышение уровней аланинаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы) является нарушение целостности плазматической мембраны гепатоцитов, в результате чего увеличивается ее проницаемость с прохождением в сыворотку компонентов цитоплазмы (цитоллиз) [11]. Следует отметить, что фермент аланинаминотрансфераза расположен в цитозоле клеток, а гамма-глутамилтранспептидаза локализуется на уровне цитоплазматических мембран, следовательно, воздействие препарата проявляется не только в виде «разжижения» цитоплазматической мембраны, но и приводит к потере интегрированных в нее белков.

При исследовании микросомальных монооксигеназ печени в субхроническом опыте на белых крысах при воздействии ГЭ-АЛК регистрировали увеличение уровня цитохрома P420, который представляет собой каталитически инертную форму фермента 1-й фазы детоксикации ксенобиотиков – цитохрома P450. Цитохром P450 является мембраносвязанным белком эндоплазматического ретикулаума и проявляет каталитическую активность только в присутствии фосфолипидного окружения, которое стабилизирует фермент в функционально активной конформации [12]. Таким образом, накопление цитохрома P420 может указывать на способность изучаемого препарата дестабилизировать структуру мембран эндоплазматического ретикулаума.

По результатам данного эксперимента можно сделать вывод о том, что изучаемое соединение способно оказывать мембранотропное действие на организм, которое реализуется на различных уровнях организации клетки. При этом, воздействие препарата характеризуется увеличением проницаемости мембраны и потерей (дестабилизацией) мембраносвязанных белков (ферментов).

Применение метода флуоресцентных зондов позволило более глубоко исследовать процессы мембраноповреждающего действия ГЭ-АЛК. В эксперименте на телях эритроцитов крыс, получавших препарат в течение 30-ти дней, обнаруженные изменения ряда параметров подтверждают характер мембранотропного действия вещества. Так, изменения, обнаруженные в ходе изучения параметров флуоресценции пирена - снижение микровязкости липидного бислоя и зон липид-белковых контактов, уменьшение погруженности белковых молекул в липидный бислой в полной мере соотносятся с эффектами на уровне целостного организма в диапазоне доз, которые приводят к увеличению проницаемости мембран гепатоцитов и дестабилизации мембраносвязанных белков. При этом, показатели флуоресценции позволяют выявлять ранние изменения состояния липидного бислоя и могут с успехом применяться в качестве биомаркеров мембраноповреждающего действия при изучении интоксикаций.

Выводы

Результаты проведенных *in vivo* и *in vitro* разноплановых экспериментов позволяют однозначно трактовать наличие мембранотропных (мембраноповреждающих) эффектов как биологическое свойство ГЭ-АЛК, благодаря которому реализуется его токсическое действие на организм.

Список литературы

1. Власенко Е.К., Сычик С.И., Стельмах В.А., Грынчак В.А. Особенности токсического действия гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты в условиях одно- и

многократного внутривенного введения. Токсикологический вестник. – 2015. – № 5. – С. 31–36.

2. Власенко Е.К. и др. Особенности эпикутанного действия гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты. Анализ риска здоровью. – 2015. – № 1(9). – С. 49–54.

3. Власенко Е.К., Сычик С.И., Стельмах В.А., Грынчак В.А. Токсикологическая оценка гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты при различных путях и режимах однократного воздействия. Труды БГУ. – 2014. Т. 9, ч. 2. – С. 218–223.

4. Власенко Е.К. и др. Оценка биохимического статуса белых крыс при воздействии гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты в субхроническом эксперименте. Вестник ВМГУ. – 2015. – Т. 14, № 6. – С. 104–111.

5. Владимиров, Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. Наука, 1980. – 320 с.

6. Файнгольд И.И. и др. Мембранотропные и релаксационные свойства водорастворимых производных гадолинийсодержащего эндометаллофуллерена. Известия Академии наук. Серия химическая. – 2014. – № 5. – С. 1107–1112.

7. Dodge, J.T. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes / J.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan // Arch. Biochem. Biophys. – С. 963, 100, 119–130.

8. Самойленко С.Г., Окунь И.М., Аксенцев С.Л., Конев С.В. Влияние температуры на полярность аннулярного и бислойного липида синаптических мембран. Биофизика. – 1992. – Т. 37, вып. 2. – С. 290–293.

9. Власенко, Е.К. Токсикологическая характеристика гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты в условиях хронического воздействия на белых крысах и в пролонгированном эксперименте *in vitro*. Труды БГУ. – 2014. – Т. 9, ч. 2. – С. 209–217.

10. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Беленький. – Рига : Изд-во Акад. наук Латв. ССР, 1959. – 115 с.

11. Кишкун, А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики / А.А. Кишкун. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 822 с.

12. Адрианов, Н.В. Регуляция активности ферментных систем окисления чужеродных соединений. Вестник АМН СССР. – 1988. – № 1. – С. 24–33.

FEATURES TOXIC EFFECT HEXYL ESTER OF 5-AMINOLEVULINIC ACID UNDER SINGLE AND MULTIPLE INTRAGASTRIC ADMINISTRATIONS

E.K. Vlasenko, S.I. Sychik, I.I. Ilyukova, V.A. Grynchak

Republican unitary enterprise «Scientifically Practical Center of Hygiene», Minsk, Belarus

e-mail: evgenii_vlasenko@mail.ru

Membrane-studied properties of the H-ALA were studied *in vivo* / *in vitro* experiments on erythrocyte membranes of rats by detecting changes in pyrene fluorescence parameters. After H-ALA administration in concentrations of 2×10^{-5} , 2×10^{-4} , 2×10^{-3} mol \times l $^{-1}$ on erythrocyte ghost suspension were recorded dose-dependent quenching of pyrene fluorescence, thus, the amount excimerization coefficient remained constant in the range studied doses and did not differ from the control values. In subchronic experiment on white rats dynamics of structural and functional properties of the erythrocyte membrane shows pronounced effects of introducing H-ALA on lipid-protein and lipid-lipid interactions in the membrane. Thus, the changes observed in the course of studying the pyrene fluorescence parameters – reduced the microviscosity of the lipid bilayer and areas of lipid-protein contacts, a decrease of absorption of protein molecules in the lipid bilayer fully correlate with effects on the whole organism in a dose range which lead to an increase in membrane permeability hepatocyte membrane proteins and destabilization.