

принимает непосредственное участие. Это делает ЗФ-механизм оптимальным методом для оценки содержания тканевого кислорода в сравнении с альтернативными (например, при анализе фосфоресценции [9, 10]). Поэтому использование ЗФ, обусловленной СТА, является перспективным в медицинской диагностике и фотодинамической терапии.

Список литературы:

1. Krasnovsky A. A. (Jr.) Primary Mechanisms of Photoactivation of Molecular Oxygen. History of Development and the Modern Status of Research. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, vol. 72, pp. 1065-1080.
2. Letuta S. N., Kuvandykova A. F., Pashkevich S. N., Saletskii A. M. Features of the delayed fluorescence kinetics of exogenous fluorophores in biological tissues. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2013, vol. 87, pp. 1582–1587.
3. Кучеренко М.Г. *Кинетика молекулярных фотопроцессов. Постановка и решение задач*. Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2012, 190 с. [Kucherenko M.G. *Kinetics of molecular photo processes. Problem formulation and solutions*. Orenburg: ООО ИПК «Университет», 2012, 190 p. (In Russ.)].
4. Berezin M.Y., Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.*, 2010, vol. 110, pp. 2641–2684.
5. Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.*, 2009, vol. 24, pp. 259–268
6. Узденский А.Б. *Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии*. СПб.: Наука, 2010, 192 с. [Uzdensky A.B. *Cell and molecular mechanisms of photodynamic therapy*. Saint-Peterburg: Nauka, 2010, 129 p. (In Russ.)]
7. Snyder J.W., Skovsen E., Lambert J.D.C., Poulsen L., Ogilby P.R. Optical detection of singlet oxygen from single cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, vol. 8, pp. 4280-4293
8. Li B., Lin H., Chen D., Wilson B.C., Gu Y. Singlet oxygen detection during photosensitization. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 2013, vol. 6, pp. 1330-1332.
9. Papkovsky, D., Zhdanov, A.V., Fercher, A., Dmitriev, R., Hynes, J. Phosphorescent Oxygen-Sensitive Probes. *Springer Briefs in Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, pp. 1245-1255.
10. Dmitriev R.I., Papkovsky D.B. Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012, vol. 69, pp. 2025-2039.
11. Scholz M., Dedic R., Valenta J., Breitenbach T., Hala J. Real-time luminescence microspectroscopy monitoring of singlet oxygen in individual cells. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, vol. 13, pp. 1203-1212.
12. Letuta S.N., Kuvandykova A.F., Pashkevich S.N. The Kinetics of Exogenous Phosphors Delayed Fluorescence in Tissues. *J. Anal. Oncology*, 2012, vol. 1, pp. 107-110.
13. Moiseeva E.V. *Original approaches to test antibreast cancer drugs in a novel set of mouse models*. Utrecht: Proefschrift Universiteit Utrecht, 2005, 191 p.
14. Veuthey T., Herrera G., Doderio V.I. Dyes and Stains: from molecular structure to histological application. *Frontiers in Bioscience*, 2014, vol. 19, pp. 91-112.
15. Baker A., Kanofsky J.R. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells. *Photochem. Photobiol.*, 1992, vol. 55, p. 523.

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Каплун Д.С., Шатова О.П., Зинкович И.И.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького
пр. Ильича, 16, г. Донецк, 83003, Украина
e-mail: kaplun.dascha@mail.ru

Аннотация. В эксперименте *in vitro* изучали влияние различных доз популярного противодиабетического препарата метформина (от 2 до 30 мМ) на осмотическую резистентность эритроцитов и содержание в них восстановленного глутатиона. Показано, что предварительная 60-минутная инкубация цельной крови здоровых доноров с метформином приводит к снижению резистентности эритроцитов к гипотоническим растворам. Обнаруженный эффект имеет линейный дозозависимый характер в интервале конечных концентраций метформина от 3 мМ до 10 мМ. Инкубация цельной крови с метформином приводит к существенному истощению в них пула восстановленного глутатиона, что может рассматриваться в качестве возможного механизма снижения их осмотической резистентности. Нельзя исключить и прямую модификацию метформином клеточных механизмов трансмембранного переноса ионов и воды в эритроцитах.

Ключевые слова: метформин, осмотическая резистентность эритроцитов, восстановленный глутатион.

METFORMIN INFLUENCES ON ERYTHROCYTE OSMOTIC FRAGILITY

Kaplun D.S., Shatova O.P., Zinkovych I.I.
Donetsk State Medical University. M. Gorky
pr. Il'icha, 16, Donetsk, 83003, Ukraine
e-mail: kaplun.dascha@mail.ru

Abstract. In the *in vitro* experiment studied the effect of different doses of popular antidiabetic drug metformin (2 to 30 mM) on the erythrocyte osmotic fragility and the content of reduced glutathione. It was shown that a 60-minute pre-incubation of whole blood of healthy donors with metformin leads to decrease the resistance of erythrocytes to hypotonic solutions. The observed effect is dose-dependent in the linear range of final concentrations of metformin from 3 mM to 10 mM. Incubation of whole blood with metformin leads to substantial depletion of the pool of reduced glutathione, which can be considered as a possible mechanism for reducing their osmotic fragility. We cannot exclude the direct modification by metformin of cellular mechanisms of transmembrane transport of ions and water in the red blood cells.

Keywords: metformin, osmotic fragility of red blood cells, reduced glutathione.

Введение. Один из самых назначаемых препаратов в диабетологии метформин находит применение при лечении различных по своей природе заболеваний: болезни Альцгеймера [1], синдроме поликистозных яичников [2], жировом гепатозе [3], злокачественных новообразованиях [4]. Такое разнообразие терапевтических эффектов метформина может быть объяснено его влиянием на общие механизмы патогенеза различных заболеваний, например, влияние на мембраны клеток.

Проверка этого предположения и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы исследования. Влияние метформина на клеточные мембраны оценивали по изменению осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ). Использовали образцы полученные у 17 доноров-добровольцев из локтевой вены с 8 до 10 часов утра.

Цельную кровь на оксалате в объёме 0.5 мл инкубировали в течение 60 минут в термостате при 37 °С. В первой опытной серии к цельной крови добавляли по 0.25 мл 30 mM раствора метформина приготовленном на физиологическом растворе. Во второй контрольной серии добавляли соответствующий объем физиологического раствора хлорида натрия.

После инкубации по 0.1 мл образцов крови обеих серий использовали для определения ОРЭ по методу Идельсона Л.И. [5] – оценивали по степени гемолиза эритроцитов в гипотоническом растворе 0.4 % хлорида натрия, с помощью фотоэлектроколориметрии на длине волны 540 нм.

Для оценки влияния метформина на антиоксидантную защиту эритроцитов спектрофотометрически (412 нм) определяли изменение уровня восстановленного глутатиона.

Дополнительно, на 15 образцах крови определяли зависимость показателей ОРЭ от концентрации метформина в инкубационной среде. Для этого по 0.5 мл крови инкубировали в том же режиме при разных концентрациях метформина: 2 mM; 3 mM; 5 mM; 7 mM; 10mM; 30 mM.

Статистический анализ данных – проводили с использованием пакета программы STATISTICA 10.0. Результаты в тексте представлены в виде средней арифметической и ее стандартного отклонения ($M \pm \sigma$). Различия оценивали по критерию Стьюдента, считая их достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что инкубация цельной крови с метформином в конечной концентрации 10 mM значительно влияет на устойчивость мембран эритроцитов к гипотоническим растворам. В присутствии метформина степень гемолиза статистически достоверно, в 1.12 раза превышает таковую в контрольной серии опытов, соответственно – $63.0 \pm 13.7\%$ и $51.4 \pm 10.0\%$ ($p = 0.008$).

Обнаруженное влияние метформина на ОРЭ имеет четкий дозозависимый характер. При инкубации крови с метформином в конечной концентрации 2 mM наблюдается лишь тенденция к росту степени гемолиза эритроцитов – $p = 0.65$. В случаях же инкубирования крови с метформином в концентрации 3 mM и более, ОРЭ статистически значимо ($p < 0.04$) снижается по сравнению с контролем (см. рис. 1).

Причем, в интервале концентраций метформина от 3 mM до 10 mM зависимость ОРЭ от дозы метформина имеет линейный характер.

Обнаруженные эффекты метформина на устойчивость плазматических мембран эритроцитов по отношению к гипотоническим растворам могут быть объяснены несколькими механизмами. Например, влиянием метформина на заряд клеточных мембран [6]. Нельзя исключить и прямую модификацию метформином клеточных механизмов трансмембранного переноса ионов и воды. Именно на такие реакции данного бигуанида имеются указания в литературе [7, 8]. Эффекты метформина на ОРЭ могут быть опосредованы и его известной способностью влиять на реакции углеводного обмена [6]. В пользу этой версии свидетельствуют полученные результаты об изменении пула восстановленного глутатиона в эритроцитах после их обработки метформином (см. рис. 2).

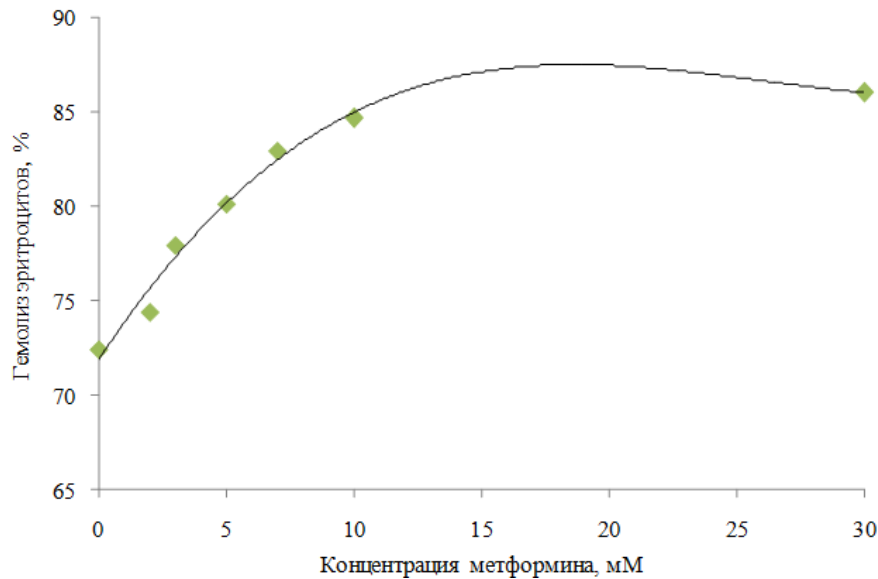


Рисунок 1 – Влияние различных концентраций метформина на гемолиз эритроцитов

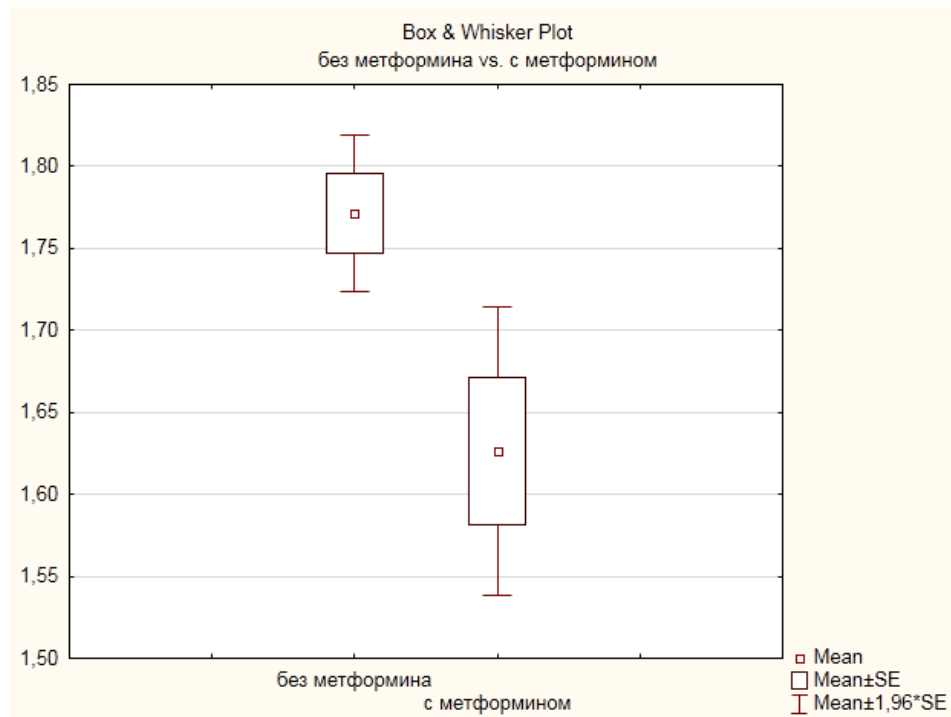


Рисунок 2 – Влияние инкубации крови с метформином (30 мМ), на концентрацию восстановленного глутатиона в эритроцитах

Предварительная инкубация цельной крови с метформином в конечной концентрации 10 мМ приводит к статистически достоверному снижению внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона – до 1.64 ± 0.23 ммоль/л, по сравнению с 1.79 ± 0.16 ммоль/л в контрольной серии ($p = 0.009$).

В качестве возможного механизма истощения восстановленного пула этого природного антиоксиданта можно предположить, например, ингибиторные влияния метформина на ферменты окислительной стадии пентозофосфатного пути. Развивающийся в этом случае дефицит кофермента НАДФН*Н, понятно, будет лимитировать работу глутатионредуктазы - тормозить восстановление глутатиона. Результирующее ослабление антирадикального потенциала эритроцитов – основа для интенсификации перекисного окисления фосфолипидов их мембран, – и может приводить к закономерному снижению стойкости мембран клеток к гипотоническим растворам.

Нельзя исключить и прямого влияния метформина на активность глутатионредуктазы. Равно как и другие возможные механизмы. Реальность и значимость всех их нуждаются в дополнительных исследованиях.

Выводы.

1. Предварительная 60-минутная инкубация цельной крови с метформином приводит к снижению резистентности эритроцитов к гипотоническим растворам. Обнаруженный эффект имеет линейный дозозависимый характер в интервале конечных концентраций метформина от 3 мМ до 10 мМ.

2. Влияние метформина на ОПЭ может быть опосредовано интенсификацией свободно-радикальных процессов за счет истощения внутриклеточного пула восстановленного глутатиона.

Список литературы / References:

1. Wang J., Gallagher D., DeVito L.M. [et al.] Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell*, 2012, vol. 11, no. 1, pp. 23-35.

2. Рыкова О.В. Диагноз СПКЯ – диагноз исключения. Современные лабораторные возможности. *Медицинские аспекты здоровья женщины*, 2014, т. 2/1, № 77, 69 с. [Rykova O.V. Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome - a diagnosis of exclusion. Modern laboratory capacity. *Medical aspects of women's health*, 2014, vol. 2/1, no. 77, 69 p. (In Russ.)]

3. Демидова И.Ю., Горохова Т.В. Механизм действия и клиническое применение метформина. *Фарматека*, 2009, т. 17, с. 12-13. [Demidova I.Yu., Gorohova T.V. The mechanism of action and clinical use of metformin. *Farmateka*, 2009, vol. 17, pp. 12-13. (In Russ.)]

4. Shawn M., Cripps R. Diabetes Mellitus and Increased Risk of Cancer: Focus on Metformin and the Insulin Analogs. *Pharmacotherapy*, 2010, vol. 30, no. 11, pp. 1159-1178.

5. Медведев Б.И., Помаскин И.Н., Николаева И.С., Маркина О.К. Адренореактивность эритроцитов в динамике развития неосложненной беременности и лечении угрозы преждевременных родов. *Вестник Южно-Уральского государственного университета*, 2009, т. 39, № 172, 125 с. [Medvedev B.I., Pomaskin I.N., Nikolaeva I.S. Markina O.K. Adrenoreactivity erythrocytes in dynamics of uncomplicated pregnancy and the treatment of preterm labor. *Bulletin of South Ural State University*, 2009, vol. 39, no. 172, 125 p. (In Russ.)]

6. Смирнова О.М. Место метформина в современном лечении профилактике сахарного диабета 2 типа. *Сахарный диабет*, 2010, т. 3, с. 83. [Smirnova O.M. Place of metformin in the modern treatment of prevention of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2010, vol. 3, p. 83. (In Russ.)]

7. Крысова А.В., Куншин А.А., Циркин В.И. Половые особенности осмотической резистентности эритроцитов человека, выявляемые при экспозиции эритроцитов в дистиллированной воде. *Физиология Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*, 2011, т. 2, № 2, с. 266-272. [Krysova A.V., Kunshin A.A., Tsirkin V.I. Sexual peculiarities of osmotic resistance of human erythrocytes, detected with an exposure of erythrocytes in distilled water. *Physiology Herald of Nizhgorodsky University of N.I. Lobachevsky*, 2011, vol. 2, no. 2, pp. 266-272. (In Russ.)]

8. Gritti M. [et al.] Metformin repositioning as antitumoral agent: selective antiproliferative effects in human glioblastoma stem cells, via inhibition of CLIC1-mediated ion current. *Oncotarget*, 2014, vol. 5, no. 22, pp. 11252-11268.

**ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МАЛОРАЗМЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
ЦИНКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ**

Ларин С.Л., Будко Е.В., Хабаров А.А.

Курский государственный медицинский университет

ул. Карла Маркса, 3, г. Курск, 305041, РФ

e-mail: sergeilarin.kursk@gmail.com

Аннотация. Проведено сравнительное изучение *in vivo* накопления и распределения малоразмерных соединений цинка: Zn(OH)₂ (размер частиц 2-3 нм, далее – ZN-НЧ), ZnO (размер частиц 1,0-0,9 мкм, далее – ZN-МЧ) полученных модифицированным конденсационным методом. Эксперимент проведен в четырех группах крыс Wistar, определение содержания Zn²⁺ проводилось методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) после внутрижелудочного введения один раз в сутки в течение 7 дней. Выявлен сопоставимый уровень всасывания и накопления растворимых и нерастворимых малоразмерных соединений цинка. Обнаружена повышенная экскреция наноразмерных частиц.

Ключевые слова: наночастицы, малоразмерные формы, нерастворимые соединения цинка, сульфат цинка, оксид цинка, гидроксид цинка, ААС, крысы Wistar, распределение в тканях, внутрижелудочное ведение.