

## Исследование влияния глицирризиновой кислоты на гемолиз эритроцитов и свойства клеточных мембран\*

О. Ю. Селютина,<sup>а,б\*</sup> Н. Э. Поляков,<sup>а</sup> Д. В. Корнеев,<sup>в</sup> Б. Н. Зайцев<sup>в</sup>

<sup>а</sup>Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского  
Сибирского отделения Российской академии наук,  
Российская Федерация, 630090 Новосибирск, ул. Акад. Ржанова, 3.  
E-mail: olga.gluschenko@gmail.com

<sup>б</sup>Новосибирский государственный университет,  
Российская Федерация, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

<sup>в</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,  
Российская Федерация, 630559 Кольцово, Новосибирская обл.

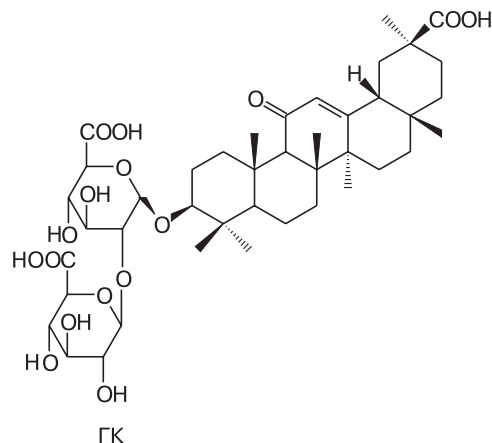
Глицирризиновая кислота благодаря своим амфифильным свойствам способна образовывать водорастворимые конъюгаты с широким рядом гидрофобных лекарственных соединений. При этом наблюдается значительное снижение терапевтической дозы последних. Для выяснения молекулярного и клеточного механизмов наблюдаемых эффектов в настоящей работе было исследовано физическими методами влияние глицирризиновой кислоты на свойства клеточных мембран. Установлено, что глицирризиновая кислота увеличивает эластичность мембран эритроцитов человека и замедляет процесс их гемолиза.

**Ключевые слова:** глицирризиновая кислота, глицирризин, гемолиз, эритроциты, мембраны, упругость мембраны, холестерин, доставка лекарств.

Современные достижения в области супрамолекулярной химии позволили вплотную подойти к решению целого ряда проблем медицины. В частности, это касается использования наноразмерных агрегатов для повышения растворимости лекарственных соединений и их адресной доставки к очагам заболевания. Данная задача особенно актуальна для малорастворимых лекарственных препаратов и цитотоксичных соединений. В последние годы высказывались предложения использовать в качестве «наноконтейнера» для лекарственных соединений ассоциатов глицирризиновой кислоты (ГК).

Глицирризиновая кислота (или глицирризин) — тритерпеновый сапонин из экстракта корней солодки. В 2012 г. солодка была названа «лекарственным растением года»<sup>1</sup>, а ГК является одной из ее основных действующих составляющих.

Глицирризиновая кислота обладает широким спектром биологической активности и с давних пор широко используется для лечения и профилактики различных заболеваний: простуды и гриппа, дерматитов, экземы, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки и т.д. Кроме того, в присутствии ГК наблюдается значительное усиление терапевтического действия многих лекарственных соединений, а в некоторых случаях даже изменение его механизма<sup>2–4</sup>. Однако молекулярный и клеточный механизмы усиления активности ле-



карств остаются неизвестны. С целью их выяснения был проведен ряд физико-химических исследований свойств ГК. Установлено, что благодаря наличию гидрофильной и гидрофобной частей в структуре глицирризиновая кислота способна образовывать прочные комплексы со многими органическими молекулами<sup>3–9</sup>. Помимо этого она проявляет свойства, типичные для мицеллообразующих веществ<sup>8–14</sup>. Исследования показали, в частности, что ГК может образовывать самоассоциаты в водных растворах<sup>6–10</sup>, структура которых зависит от концентрации ГК и от pH раствора. При низких концентрациях ( $10^{-3}$ – $10^{-5}$  моль·л<sup>-1</sup>) ГК существует в растворах преимущественно в виде димеров, в то время как при высоких концентрациях (больше  $10^{-3}$  моль·л<sup>-1</sup>) образуются крупные мицеллоподобные агрегаты<sup>15,16</sup>.

\* По материалам «Первой Российской конференции по медицинской химии» (MedChem Russia-2013) с международным участием (8–12 сентября 2013 г., Москва).

Ранее нами было установлено, что ГК способна образовывать нерастворимые комплексы с холестерином и продуктами его окисления<sup>17,18</sup>. Этот факт позволил выдвинуть гипотезу, что одним из механизмов терапевтического действия ГК как биологически активного соединения и как переносчика лекарственных препаратов является влияние на свойства клеточных мембран. В связи с этим возникает вопрос: не приводит ли ее воздействие к повреждению мембран? Для решения поставленной задачи наиболее предпочтительными в качестве объекта исследования являются эритроцитарные клетки, поскольку их структура к настоящему времени достаточно полно изучена и отражает состояние мембранолитических процессов в организме. Внутриклеточный гемолиз — основной механизм «расправы» со старыми эритроцитами, основанный на отсеивании клеток, которые потеряли эластичность. Устойчивость эритроцитов к гемолитическому воздействию является интегральным параметром, характеризующим целостность и жизнеспособность этих клеток, а также критерием их физиологического состояния.

В связи с этим представляет интерес способность различных веществ, в частности средств доставки лекарств, влиять на процесс гемолиза и на свойства клеточных мембран. В данной работе мы исследовали влияние ГК на упругость мембран эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии, а на процесс гемолиза методом оптической спектроскопии.

### Экспериментальная часть

**Материалы.** Образцы крови помещали в фосфатно-солевой буфер производства фирмы «Биолот» с pH 7.3, содержащий NaCl (0.137 моль·л<sup>-1</sup>) и KCl (0.0027 моль·л<sup>-1</sup>). Для экспериментов по осмотическому гемолизу требуется хлорид натрия особой чистоты. Для анализа использовали клетки крови человека.

**Подготовка образцов.** Суспензию эритроцитов получали из нескольких капель капиллярной крови, трижды центрифугированных (200 g, 5 мин). После каждого центрифугирования надосадочную жидкость замещали свежим буферным раствором. Для определения осмотической хрупкости полученные таким образом эритроциты помещали в растворы NaCl следующих концентраций: 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6, 0.8, 0.9%. В качестве контрольного образца, для которого предполагается полный лизис всех клеток, использовали образец в дистиллированной воде.

Измерения упругости мембран проводили в жидкости. Образцы крови для этих экспериментов готовили описанным выше способом, затем их сорбировали 10 мин на стеклах, покрытых полилизинном («Thermo», Германия), помещали в буферный раствор с добавлением различных концентраций глицирризиновой кислоты и выдерживали в течение 20–30 мин. Все измерения проводили с помощью атомно-силового микроскопа «Solver P47 Bio» производства фирмы «NT-MDT». В работе использовали контактные АСМ-зонды с радиусом острия ~20 нм и силовой постоянной 0.003–0.13 Н·м<sup>-1</sup>. В каждом эксперименте для измерений с различными концентрациями ГК использовали один и тот же АСМ-зонд. Образцы крови помещали в фосфатно-солевой буфер. Затем их трижды подвергали центрифугированию (200 g) с замещением сыворотки бу-

ферным раствором. Выделенные таким образом эритроциты вводили в тот же буферный раствор с добавлением различных концентраций ГК и выдерживали в нем.

**Оценка осмотического гемолиза.** Степень гемолиза эритроцитов изучали оптическими методами. Метод контроля основан на том, что гемоглобин практически не поглощает в диапазоне длин волн выше 650 нм. Поэтому, когда мы имеем дело с полностью разрушенными эритроцитами и раствором гемоглобина, оптическая плотность в этой области практически равна нулю. В случае же присутствия в растворе целостных эритроцитов дополнительный вклад в спектр вносит рассеяние на эритроцитах, что приводит к появлению ненулевой оптической плотности на длинах волн больше 650 нм (рис. 1). Однако наличие эритроцитов в растворе вносит искажения в спектр, что затрудняет количественную оценку осмотической стойкости эритроцитов.

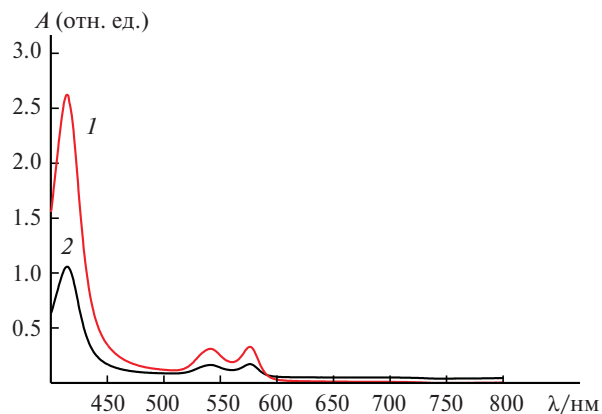
Для устранения этих помех после помещения эритроцитов в гипотонический раствор образец центрифугировали для осаждения клеток, сохранивших целостность, и для спектрофотометрического анализа использовали надосадочную жидкость. Это позволило в спектре избавиться от рассеяния на взвешенных в растворе частицах.

**Определение упругости мембран.** Для каждого образца записывали массив кривых: на поверхности, покрытой монослоем эритроцитов, выбирали участок 100×100 мкм, который покрывали сеткой 10 на 10 точек, и для каждой точки записывали силовую кривую. Таким образом, получался массив из 100 кривых. Операцию повторяли трижды для увеличения достоверного интервала.

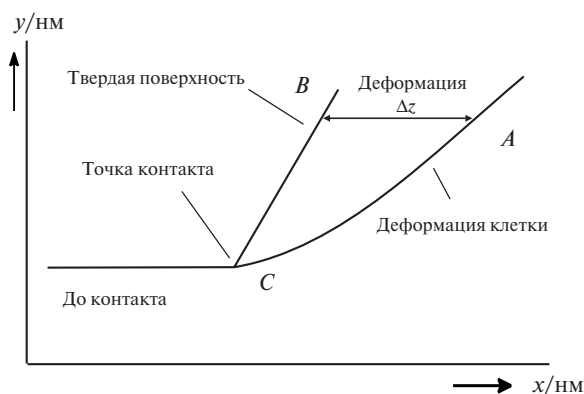
Для обработки силовых кривых была написана программа в пакете MathCAD. Алгоритм обработки следующий: по максимуму второй производной от силовой кривой определяется начало характерной области (рис. 2, точка С), затем производится аппроксимация квадратичной функцией зависимости отклонения кантилевера от Δz. Чтобы избежать неточностей, связанных с определением параметров зонда и клетки, анализировали весь множитель ξ, который позволяет определить относительное изменение модуля упругости клетки по сравнению с исходным, ничем не обработанным образцом.

$$\xi = 2E_{\text{cell}} / (\pi(1 - \eta_{\text{cell}}^2) \tan \alpha),$$

где  $E_{\text{cell}}$  — модуль Юнга мембраны,  $\eta_{\text{cell}}$  — отношение Пуассона для клетки,  $\alpha$  — половинный угол острия зонда. Измерения производили на одном типе клеток и с использованием одного и того же зонда, так что  $\eta_{\text{cell}}$  и  $\alpha$  являются



**Рис. 1.** Спектр поглощения гемоглобина: 1 — суспензия эритроцитов в 0.35%-ном растворе NaCl, наблюдается только поглощение; 2 — суспензия эритроцитов в 0.8%-ном растворе NaCl, в спектре виден вклад от рассеяния.



**Рис. 2.** Схема измерения упругости клеток ( $x$  — положение образца,  $y$  — отклонение кантилевера, кривая  $A$  соответствует мягкой клеточной поверхности, способной деформироваться под действием зонда, кривая  $B$  — жесткой недеформируемой поверхности,  $C$  — точка контакта).

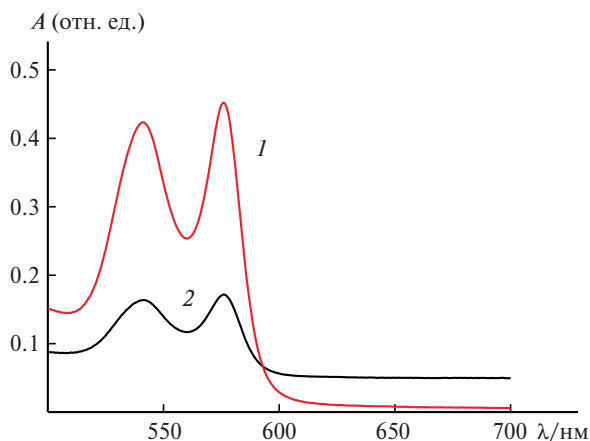
постоянными. Для каждой кривой определяли значение параметра  $\xi$  и строили распределение этого параметра для массива кривых.

### Обсуждение полученных результатов

Эритроциты в крови человека живут около трех месяцев, и в любом образце крови всегда присутствуют эритроциты разного возраста. Возраст клеток оказывает существенное влияние на свойства их мембран, в том числе на прочность и эластичность, что, в свою очередь, влияет на их осмотическую стойкость. Поэтому в одном и том же образце при фиксированной концентрации  $\text{NaCl}$  часть эритроцитов лизирует, а часть сохраняет свою целостность. Для количественной характеристики степени гемолиза эритроцитов вводят некий усредненный параметр — осмотическую хрупкость (это концентрация  $\text{NaCl}$ , при которой лизирует 50% эритроцитов в суспензии).

На рисунке 3 приведены спектры поглощения для суспензии эритроцитов в 0.4%-ном растворе  $\text{NaCl}$ . Для контрольного, необработанного образца (см. рис. 3, *a*) рассеяние на эритроцитах практически отсутствует. Для образца, обработанного раствором ГК ( $0.5 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ ), при той же концентрации  $\text{NaCl}$  в растворе присутствует вклад от рассеяния (см. рис. 3, *b*). Очевидно, что под воздействием ГК мембраны эритроцитов изменяют свои свойства таким образом, что большее количество клеток сохраняет свою целостность.

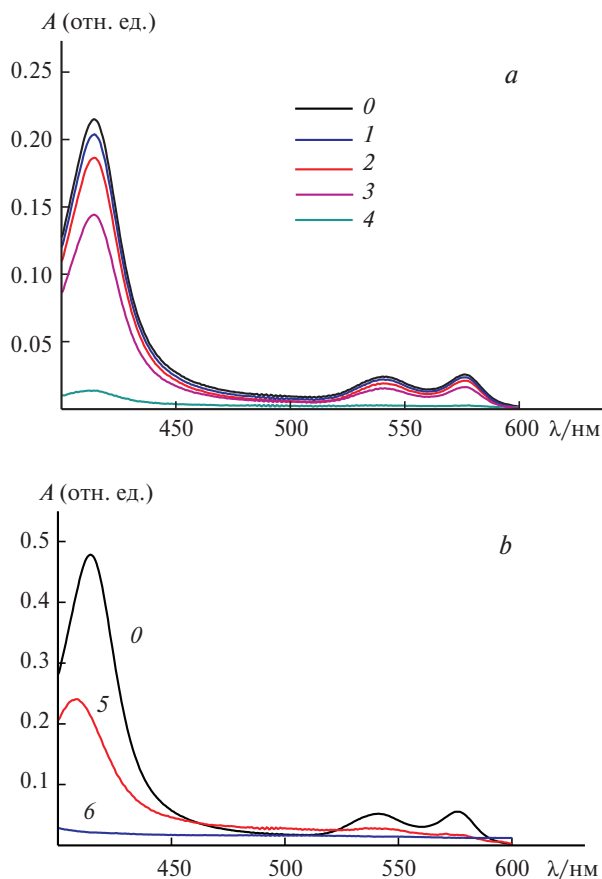
На рисунке 4 представлены спектры надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования эритроцитов, помещенных в растворы с различной концентрацией  $\text{NaCl}$ . Для контрольного образца необработанных эритроцитов видна общая тенденция понижения оптической плотности при повышении концентрации  $\text{NaCl}$  в растворе (см. рис. 4, *a*). Данная зависимость согласуется с тем фактом, что повышение концентрации соли ведет к ослаблению гемолиза. Для образцов, предварительно помещенных на 15 мин в раствор ГК ( $1 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ ), наблюдается значитель-



**Рис. 3.** Спектры поглощения образцов суспензии эритроцитов в отсутствие (1) и в присутствии (2) ГК ( $0.5 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ ).

ное ослабление гемолиза по сравнению с контрольным измерением даже в дистиллированной воде (рис. 4, *b*).

Анализ данных атомно-силовой микроскопии проводили исходя из модели Снеддона<sup>19</sup>, предполагающей коническую форму зонда микроскопа. Клетку рассматривали как эластичный и изотропный материал. В рассматриваемой модели для конического



**Рис. 4.** Спектры поглощения надосадочной жидкости в растворах с концентрацией  $\text{NaCl}$ : 0 (0), 0.35 (1), 0.5 (2), 0.8 (3), 0.9% (4, 6). *a* — образцы, необработанные ГК, *b* — образцы, обработанные ГК ( $0.5 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ ).

зонда сила действия на него со стороны клетки записывается как

$$F(\Delta z) = (2E_{\text{cell}} / (\pi(1 - \eta_{\text{cell}}^2) \tan \alpha)) \Delta z^2. \quad (1)$$

Результаты исследования влияния ГК на упругость эритроцитов приведены в таблице 1. Для трех типов образцов — контрольного (необработанного ГК) и двух обработанных растворами ГК (0.05 и 0.5 ммоль · л<sup>-1</sup>) — были произведены измерения упругости и построены графики распределения параметра  $\xi$ , характеризующего модуль Юнга, по поверхности эритроцитов.

Видно, что при увеличении концентрации ГК среднее значение параметра  $\xi$  изменяется, что свидетельствует об относительном уменьшении модуля упругости мембран по сравнению с необработанным образцом. Кроме того, уменьшается также ширина самого распределения, возможно, из-за того, что поверхность эритроцита становится более однородной.

Старение эритроцитов сопровождается появлением неоднородностей на его поверхности и снижением эластичности, что приводит к затруднению прохождения этих клеток через мелкие поры. На этом основан механизм внутриклеточного гемолиза: «постаревшие» эритроциты задерживаются в специальных фильтрах в селезенке и поглощаются макрофагами. Полученные нами результаты указывают на то, что под воздействием ГК происходит своего рода «омоложение» эритроцитов: поверхность становится менее шероховатой и повышается эластичность, что, возможно, способно приводить к продлению жизненного цикла клеток.

Осмотическая хрупкость эритроцитов может зависеть от многих факторов: отношения объема клетки к площади поверхности цитоплазматической мембраны, эластичности мембран, концентрации осмотически активного материала в клетке и от изменения количества этого материала, изменения свойств мембраны под действием физических факторов и экзогенных химических соединений. Принимая во внимание факт изменения модуля Юнга (а значит, и эластичности) мембраны под воздействием ГК, можно предположить, что увеличение осмотической стойкости эритроцитов происходит благодаря модификации мембраны, приводящей к изменению ее функциональных и механических свойств.

Таким образом, установлено, что воздействие глицирризиновой кислоты уже в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  моль · л<sup>-1</sup> делает мембраны эритроцитов существенно более эластичными и однородными. Повышение эластичности мембран может служить одной из причин для другого обнаруженного нами явления — повышения осмотической стойкости эритроцитов в присутствии глицирризиновой кислоты. Следует отметить, что полученный результат согласуется с имеющимися в литературе данными о влиянии некоторых сапонинов (группы соединений, к которым также относится глицирризиновая кислота) на гемолиз эритроцитов<sup>20</sup>. Принимая во внимание полученные ранее данные о способности глицирризиновой

**Таблица 1.** Значение параметра  $\xi$  и ширина его распределения для образцов, обработанных различными концентрациями ГК

Образец	Среднее значение $\xi/\text{Н} \cdot \text{м}^{-2}$	Ширина распределения $\xi/\text{Н} \cdot \text{м}^{-2}$
Контроль	$3 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$
После обработки ГК		
0.05 ммоль · л <sup>-1</sup>	$9 \cdot 10^{-7}$	$10^{-6}$
0.5 ммоль · л <sup>-1</sup>	$5 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$

кислоты связывать мембранный холестерин<sup>17,18</sup>, можно предположить, что «омоложение» эритроцитов также связано с изменением уровня холестерина в мембранах под действием ГК.

### Список литературы

1. S. Sakamoto, H. Nakahara, T. Uto, Y. Shoyama, O. Shibata, *BBA-Biomembranes*, 2013, **1828**, 1271.
2. G. A. Tolstikov, L. A. Baltina, E. E. Shults, A. G. Pokrovskii, *Russ. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)*, 1997, **23**, 625.
3. T. G. Tolstikova, M. Khvostov, A. O. Bryzgalov, *Mini-Reviews in Med. Chem. (Engl. Transl.)*, 2009, **9**, 1317.
4. N. E. Polyakov, T. V. Leshina, *Open Conf. Proc. J.*, 2011, **2**, 64.
5. S. Nafisi, F. Manouchehri, M. Bonsaii, *J. Photochem. Photobiol.*, 2012, **111**, 27.
6. V. A. Vavilin, N. F. Salakhutdinov, Yu. I. Ragino, N. E. Polyakov, M. B. Taraban, T. V. Leshina, E. M. Stakhneeva, V. V. Lyakhovich, Yu. P. Nikitin, G. A. Tolstikov, *Biomed. Chem.*, 2008, **54**, 301.
7. Yu. I. Ragino, V. A. Vavilin, N. F. Salakhutdinov, S. I. Makarova, E. M. Stakhneeva, O. G. Safronova, Yu. P. Nikitin, G. A. Tolstikov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2008, **145**, 285.
8. V. S. Kornievskaya, A. I. Kruppa, N. E. Polyakov, T. V. Leshina, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2007, **60**, 123.
9. K. C. James, J. B. Stanford, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1962, **5**, 445.
10. R. J. Gilbert, K. C. James, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1964, **16**, 394.
11. E. Azaz, R. Segal, *Pharm. Acta Helv.*, 1980, **55**, 183.
12. M. Kondo, H. Minamino, G. Okiyama, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1986, **37**, 177.
13. M. Maskan, *J. Food Process Eng.*, 1999, **39**, 389.
14. T. V. Romanenko, Yu. I. Murinov, *J. Phys. Chem.*, 2001, **75**, 1601.
15. В. С. Корниевская, А. И. Круппа, Н. Э. Поляков, Т. В. Лешина, *Вестн. НГУ, Сер. физ.*, 2007, **2**, 21.
16. V. S. Kornievskaya, A. I. Kruppa, N. E. Polyakov, T. V. Lyoshina, *J. Phys. Chem.*, 2007, **111**, 11447.
17. O. Yu. Gluschenko, N. E. Polyakov, T. V. Leshina, *Appl. Magn. Res.*, 2011, **41**, 283.
18. О. Ю. Глушенко, Н. Э. Поляков, Т. В. Лешина, *Химия в интересах устойчивого развития*, 2011, **6**, 649.
19. B. Vileni, M. Lekka, A. Sienkiewicz, S. Jeney, G. Stossel, J. Lekki, L. Forro, Z. Stachura, *Environ. Sci. Technol.*, 2007, **41**, 5149.
20. G. Francis, Z. Kerem, H. P. S. Makkar, K. Becker, *Brit. J. Nutr.*, 2002, **88**, 587.

Поступила в редакцию 25 октября 2013;  
после доработки — 5 марта 2014