

АЗЕРБАЙДЖАНСКАЯ РЕСПУБЛИКА

На правах рукописи

**МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ
ВОЛН И МАКРОЛАКТОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НА СТОЙКОСТЬ И ПРОВОДИМОСТЬ
КЛЕТОЧНЫХ И ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН**

Специальность: 2406.01–Биофизика

Отрасль науки: Биология

Соискатель: **Гюльнар Гаджибек кызы Султанова**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации представленной на соискание ученой
степени доктора наук

Баку – 2022

Диссертационная работа выполнена в лаборатории «Биофизика клетки» Института Ботаники НАНА, в отделе «Кинетика химических и биологических процессов» Института Биохимической Физики РАН и лаборатории «Клеточные технологии» Института Физиологии НАН Беларуси.

Научный консультант: доктор биологических наук, член-корр. НАН Азербайджана, профессор
Халил Мамедали оглы Касумов

Официальные
оппоненты:

доктор физико-математических наук,
профессор
Эльдар Али оглы Масимов

доктор физико-математических наук,
профессор
Ахмед Магомед оглы Гаджиев

доктор биологических наук, член-корр.
НАН Беларуси, профессор
Екатерина Ивановна Слобожанина

доктор биологических наук
Яшар Мирза оглы Фейзиев

Диссертационный совет ВЕД 2.31 Высшей Аттестационной Комиссии при Президенте Азербайджанской Республики, действующий на базе Бакинского Государственного Университета

Председатель

диссертационного совета: доктор биологических наук, профессор
Ральфрид Ахадович Гасанов

Ученый секретарь

диссертационного совета: доктор философии по биологии, доцент
Самира Джафар кызы Салаева

Председатель научного
семинара:

доктор физико-математических наук,
профессор
Ровшан Ибрагимхали оглы Халилов



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Исследование механизма действия ультразвукового (УЗ) излучения на клетки является актуальной задачей физико-химической биологии. В связи с широким использованием ультразвуковых методов в медицине, биологии, хозяйственной деятельности и промышленности особый интерес вызывает анализ закономерностей биологических эффектов ультразвуковых (УЗ) волн в отношении биологических систем. Биологические эффекты воздействия УЗ определяются множеством факторов, таких как: время и интенсивность воздействия, температура и давление, структура звукового поля, выбор объекта исследования и т.д. В силу сложности проведения анализа по всем указанным параметрам одновременно необходимо было выявить необходимый диапазон параметров УЗ для решения поставленных задач. С этой целью были рассмотрены зависимости устойчивости состояния клеточных мембран от интенсивности, частоты, времени и энергии ультразвукового воздействия на молекулярном, клеточном, тканевом, и организменном уровне. Однако, систематические исследования состояния клеток при совместном воздействии на них УЗ и некоторых макролактонных соединений ранее не проводились.

Известно, что биологические эффекты УЗ на клетки связаны с физическими, физико-химическими, биофизическими, биохимическими и физиологическими факторами. УЗ занял ведущее место в сфере медицинских исследований при исследовании состояния и воздействия на биологические структуры. По данным ВОЗ на сегодняшний день более 60 млн. человек ежегодно подвергаются УЗ исследованиям. В связи с этим в медицинской и хозяйственной практике важно определить оптимальные наиболее безопасные режимы воздействия УЗ как «*in vivo*», так и «*in vitro*». Эритроциты являются наиболее доступным и информативным элементом в биомедицинских исследованиях. Наиболее показательными методами изучения действия внешних и внутренних факторов на биообъекты, в частности на клетки крови, являются спектрофотометрические и микроскопические. Важной за

дачей является поиск эффективных методов исследования физико-химических свойств эритроцитов.

Известны различные методы изучения физико-химических характеристик эритроцитов, таких как облучение, криолиз, гемолиз, микроскопия, ЭПР, ЯМР. Использование УЗ при терапевтических интенсивностях несомненно могло бы дать большую информацию о механической гемолитической устойчивости эритроцитов «*in vitro*».

Опубликованы литературные данные по изучению поведения форменных элементов крови и других клеточных структурв УЗ поле^{1,2,3,4}. В связи с этим, целью настоящего исследования является разработка наиболее безопасного и информативного метода исследования совместного действия на клетки УЗ волн и макролактонных соединений с выявлением количественных критериев оценки степени эффективности их биологического действия.

При патологических процессах нарушаются структурно-функциональные свойства клеточных мембран. В связи с чем особую актуальность приобретают практические аспекты использования УЗ и мембранотропных соединений для выявления нарушений мембран клеток крови у онкологических, кардиологических и гематологических пациентов. Именно они лидируют в ряду заболеваний, приводящих к наибольшему количеству летальных исходов. В качестве модели плазматических мембран для экспериментальных исследований были выбраны мембраны эритроцитов и бислоиные липидные мембраны (БЛМ). Спектрофотометричес

¹Apfel R.E.,Holland.C.K.Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound, *Ultrasound in Medicine & Biology*, Volume 17, Issue 2, 1991, P179-185 [https:// doi. org/ 10. 1016/0301-5629\(91\)90125-G](https://doi.org/10.1016/0301-5629(91)90125-G)

²Morton, K.I., terHaar, G.R., Stratford, I.J. & Hill. C. R. The role of cavitation in the interaction of ultrasound with V79 Chinese hamster cells in vitro. *Br. J. Cancer*, 1982,45, 147-150.

³ Горняк С.А. Физические механизмы взаимодействия ультразвука с биологическими структурами и их моделями. 2003, Автор.дис. канд. Физат. наук Харьков, 26 с

⁴ Хилл Применение ультразвука в медицине. Физические основы. 2008. М:МИР (перевод с англ.)

кие методы исследования действия внешних и внутренних факторов на эритроциты, являются наиболее оптимальными для выявления их гемолитической активности. Введение в организм лекарственных препаратов приводит к изменениям структуры и функции мембран клеток⁵. Особую актуальность приобретает выявление повреждений мембран клеток крови при различных заболеваниях, а также при действии некоторых физических и химических факторов на организм. В связи с этим, важно изучение механизма комбинированного действия различных физико-химических факторов на клеточные мембраны и изыскание оптимальных режимов и концентраций их воздействия^{6,7}.

Цель и задачи исследования. Основная цель диссертационной работы – выявление биофизических механизмов действия УЗ волн на структурно-функциональные свойства эритроцитов при различных экзогенных и эндогенных воздействиях, в изучении физико-химических особенностей взаимодействия ряда макролактонных соединений и антиоксидантов с мембранами эритроцитов в поле действия УЗ волн для выявления их взаимосвязи с химической структурой соединений и механизмов их распределением внутри мембраны.

Это создает возможность получения информации о механизме действия мембраноактивных соединений и определения подходов к синтезу новых лекарственных препаратов.

Для разрешения поставленных задач определены основные этапы работы: провести сравнительный анализ эффективности действия структурно-модифицирующего действия производных полиено

⁵ Черницкий Е.А., Сенькович О.А., Розин В.В. Зависимость параметров гемолиза и везикулярной эритроцитов от концентрации Na-додецилсульфата: везикулярно-конкурентный гемолиз // Биологические мембраны. – 2000. – Т.17, №5. – С. 503–508.

⁶ Козлов С.Н., Козлов Р.С. // Современная антимикробная химиотерапия. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 3-издание, 2017, с. 400.

⁷ Solodovnikov S. P., Koroteev M.P., Kaziev G. Z., et al Electron spin resonance study of the cavitated larch wood? Russian Journal of General Chemistry, издательство Maik Nauka /Interperiodica Publishing (Russian Federation), том 81, № 1, с. 158-159

вых антибиотиков (ПА) и изучить гемолитическую активность антиоксидантов и макро лактонных соединений полиеновой структуры и выявить их оптимальные действующие концентрации;

➤ изучить закономерности изменения физико-химических свойств эритроцитов при различных режимах озвучивания, а также при действии некоторых физических факторов внешней среды обосновать возможность использования УЗ в физиотерапевтическом режиме для анализа состояния клетки диагностики повреждений клеточных мембран;

➤ провести сравнительный анализ и корреляцию действия различных соединений (ПА, этанол, ДМСО, антиканцерогены, антиоксиданты) на структурно-функциональные свойства эритроцитов и бислоевых липидных мембран (БЛМ);

➤ идентифицировать вклад эритроцитов различного возраста на гемолитическую картину красной крови (эритрона) при патологиях и установить взаимосвязь между ними;

➤ исследовать действие физических факторов на функциональное состояние мембран эритроцитов при раке молочной железы (РМЖ).

➤ выявить корреляцию поведения эритроцитов в поле действия УЗ и разработать модель поведения клеток в физиотерапевтическом режиме озвучивания, выявить приоритетные составляющие УЗ волн в механизме воздействия на клетки крови и разработать физическую модель поведения клеток в УЗ поле.

Научная новизна. Обоснована возможность применения УЗ в физиотерапевтическом режиме озвучивания для анализа состояния биологических мембран. Предложен спектрофотометрический метод исследования кинетики гемолиза эритроцитов в поле УЗ волн для анализа состояния мембран клеток крови также при действии различных физических и химических факторов. Впервые проведено систематическое исследование механических свойств мембран клеток красной крови различных возрастных фракций *in vivo* в кровяном русле и *in vitro* при злокачественных образованиях. Проведено изучение влияния ряда ПА с известной структурой молекул на механические свойства и структурные

особенности мембраны эритроцитов. Установлено, что полиены индуцируют морфологические изменения эритроцитов, оказывая модифицирующее действие на клеточные мембраны. Обнаружены различия в кинетике и эффективности трансформирующего действия различных по структуре и гидрофобным свойствам производных ПА. Показана зависимость гемолитической активности от концентрации и структуры производных ПА. Выявлено изменение микровязкости поверхностных, где расположена АХЭ-аза и более глубоких областей мембраны эритроцитов. Проведено комплексное исследование действия ряда соединений (антиоксиданты, полиеновые антибиотики, этанол, ДМСО, цитостатики) на механические свойства мембран красных кровяных клеток. Показан эффект селективного действия некоторых макролактонных соединений – амфотерицина В, леворина, нистатина, филипина на резистентность и проводимость плазматических (эритроциты) и бислойных мембран. Впервые выявлена степень изменения функционального состояния эритроцитарных мембран больных злокачественными новообразованиями при комбинированном действии ультразвука, гамма-терапии, антиоксидантов, этанола, антиканцерогенов и ПА. Отмечено, что при действии некоторых мембрано – активных соединений - антиоксидантов и ПА, наблюдаются три типа их влияния на мембранные характеристики эритроцитов: ингибирование и активирование гемолиза и практически отсутствие изменений мембранных характеристик эритроцитов. Проведено изучение концентрационной зависимости действия диметилсульфоксида (ДМСО) и этанола на эритроциты крови. Установлено, что в концентрациях, используемых при приготовлении растворов ПА и антиоксидантов, ДМСО и этанол не оказывают негативного влияния на клетки крови. Методом МТТ – теста впервые показано эффективное действие метиллеворина, а также амфотерицина В на пролиферацию и метаболизм опухолевых клеток *HeLa* и *С6*. Впервые предложена сравнительная модель движения эритроцитов в различных участках кровяного русла как аналог их поведения в поле действия ультразвука в физиотерапевтическом режиме озвучивания

($f=0.88\text{МГц}$, $I=0.1-1.0\text{Вт/см}^2$).

Практическое значение работы. Представленная модель поведения клеток в поле ультразвуковых волн и полученные при этом характеристики механической стойкости эритроцитов (время и скорость гемолиза, коэффициент полураспада) могут быть рекомендованы в качестве тест-метода для контроля за состоянием клеток как в норме, так и при патологии. Гемолитические эффекты, вызванные исследуемыми препаратами (ПА, антиоксиданты, антиканцерогены, ДМСО и пестициды), дают возможность для определения эффективных концентраций их использования в медицинской практике и хозяйственной деятельности. Определена возможность выявления структурно-функциональных изменений мембран эритроцитов в качестве диагностического теста для выбора наиболее эффективных препаратов и их концентраций. Разработан экспресс метод для определения биологической активности ПА. Ряд изученных препаратов можно рекомендовать для их практического использования в борьбе с вирусными, бактериальными и грибковыми заболеваниями человека и животных. Разработанный метод УЗ воздействия на клетки в физиотерапевтическом режиме может быть использован для мониторинга изменения состояния эритроцитов при онкологических и гематологических и вирусных заболеваниях.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

➤ Предложен метод исследования механических факторов ультразвукового поля на биологические мембраны позволяющий оценивать скрытые повреждения мембран эритроцитов и режимы терапевтических воздействий;

➤ Изучен спектр различных условий воздействия УЗ в зависимости от интенсивности, частоты, времени, а также факторов окружающей среды на биологические объекты. Данная методика позволяет оценить степень изменения функционального состояния клеточных мембран в зависимости от возраста клеток в кровяном русле, локализации опухоли, концентрации и химической структуры препарата;

➤ Анализ действия препаратов на биологические клетки

позволяет приблизиться к пониманию механизмов их связывания с исследуемыми объектами (эритроцитами и БЛМ) путем образования в них новых транспортных систем - ионных каналов без нарушения структуры мембраны, а также для защиты ее от механической травмы путем создания защитной оболочки нано размеров вокруг мембраны клетки. Выявлена зависимость степени модифицирующего действия изученных антибиотиков от их структуры;

➤ Разделение клеток красной крови на возрастные фракции, имеющие место в кровяном русле человека и животных *in vivo*, позволяет выявить роль каждой из этих групп на гемолитическую картину исследуемых групп крови в контроле и при патологиях. Выявлена связь динамики развития онкологического процесса у человека и животных с физико-химическими характеристиками форменных элементов крови;

➤ Изучение механических свойств эритроцитов методом УЗ гемолиза дает возможность выяснить степень воздействия некоторых соединений – антиоксидантов на основе оксипиридинов, полиеновых антибиотиков и некоторых антиканцерогенных препаратов в пределах концентрациях 0,01-10% в исследуемой суспензии на структурно-функциональные характеристики клеток организма и предложить оптимальные концентрации их использования в биомедицинской практике;

➤ Изучение поведения клеток в УЗ поле дает возможность провести анализ механизмов воздействия составляющих УЗ на исследуемые объекты и представить физическую модель поведения клеток под действием УЗ физиотерапевтического режима. Показана общность воздействия на эритроциты механических факторов сердечно-сосудистой системы и УЗ волн физиотерапевтического режима озвучивания, что позволило предложить механизм действия УЗ на клетки крови как аналог модели поведения клеток в кровяном русле человека;

➤ Изучен спектр различных условий воздействия УЗ в зависимости от интенсивности, частоты и времени, а также факторов окружающей среды на биологические объекты. Данная методика позволяет оценить степень изменения функционального

состояния клеточных мембран в зависимости от возраста клеток в кровяном русле, локализации опухоли, концентрации и химической структуры препарата;

➤ Разделение клеток красной крови на возрастные фракции, имеющие место в кровяном русле человека и животных *in vivo*, позволяет выявить роль каждой из этих групп на гемолитическую картину исследуемых групп крови в контроле и при патологиях. Выявлена связь динамики развития онкологического процесса у человека и животных с физико-химическими характеристиками форменных элементов крови. **Объекты исследования.** В качестве объектов исследования были выбраны эритроциты и их тени, БЛМ, опухолевые клетки NKLy, S-37, HeLa и C6, макролактонные соединения, антиоксиданты из группы оксипиридинов.

Методики исследования. Исследования проводились методами УЗ, осмотического и кислотного гемолиза, определения АХЭ-азной активности, разделения эритроцитов на возрастные фракции в градиенте плотности, ЭПР, МТТ–теста, статистической обработки данных, компьютерными методиками. **Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались на: Конференции «Перспективы развития экспериментальной биологии» БГУ 2002; XVII Международном биологическом конгрессе в г. Адана (Турция), 2004; IV Международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», Минск, 2005; IV Международной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, 2006; Международной научной конференции «Генетические ресурсы лекарственных ароматических растений». Москва, 2006; Международном симпозиуме «Природные катаклизмы и глобальные проблемы современной цивилизации» Баку, 2007; VII Международном симпозиуме «Новые нетрадиционные растения и перспективы их использования», Пушкино, 2007; Республиканской конференции, посвященной 70-летию Института Ботаники НАНА, Баку, 2008; IV Международном симпозиуме «Механизмы действия сверхмалых доз», Москва, 2008; IV Международной научно-практической конференции «Наука и современность-2010», Новосибирск, 2010;

XVIII Международной конференции «Биоантиоксидант», Москва, 2010; Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологической и химической экологии», Москва, 2012; 5 th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery (WCDATD), Sweden, Uppsala, 2013; First European West Conference of biology and medicine, Austria, 2014; Мат. III Межд. Микол. Форума, Москва, 2015, 2016, 2017; Inter. Conf. “Innoative Approaches to Conservation of biodiversity, Баку, 2016; Международной конференции по случаю 95-летию акад. В.Ю. Ахундова, Баку 2017; Российском Онкологическом Конгрессе, Москва, 2017, Российском Гематологическом Съезде 2018, Межд. научн. конференциях «Наука-медицине» Институт физиологии, Минск 2017, 2018, 2019, Межд. Конф. Посвященной 90-летию акад. В.Дж. Гаджиева, Баку, 2018; Симп. по микологии по случаю 120-летию акад. В.И. Ульянищева, Баку, 2018; VI Съезд Биофизиков России, Сочи 2019; Конф. по случаю COVID 19, Баку, 2020; БФФХ Севастополь «Актуальн. вопросы биол. физ. и хим.» 2020; Конгресс «Совр. Пробл. фармации», по случаю (90)-летию АМУ, Баку 2021, Конф. «Qarabaqın biomüxtəlifliyi, torpaq və su ehtiyatları, keçmişi, bu günü və gələcəyi» Bakı 2021,

Публикации. Всего автором опубликовано 90 научных работ, из них основные результаты диссертации представлены в виде 74 печатных работ в зарубежных и республиканских научных изданиях. Из них по теме диссертации 52 статей в западных журналах и материалах конференций, и 20 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 285 страницах машинописного текста и содержит 60 рисунков и 24 таблиц. Работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, методической части, результатов и обсуждения, выводов и библиографического списка литературы, включающего 420 наименований. Работа выполнена в лаборатории «Биофизика клетки» Института Ботаники НАНА в 1990-2018 гг., частично в отделе «Кинетика химических и биоло-

гических процессов» Института Биохимической Физики РАН в 1991-1995 гг. и лаборатории «Клеточные технологии» Института Физиологии НАН Беларуси в 2015, 2016 и 2017 гг. в рамках договора о научно-техническом сотрудничестве между Институтом Ботаники НАНА и Институтом Физиологии НАН Беларуси и при финансовой поддержке Фонда Развития Науки при Президенте Азербайджанской Республики- **Грант № EIF-BGM-3-BRTFR-2+/2017-15/12/3.**

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Использование ультразвука и макролактонных соединений в фундаментальных исследованиях плазматических мембран

Интерес к использованию УЗ в медицине и биологии возник в 50-годах 20 века и обусловлен возможностью получения информации от тканей с помощью УЗ волн.

Использование УЗ в медицине и биологии дает возможность его воздействия в качестве фактора воздействия и фактора исследования биологических структур с целью получения информации о них. Эти взаимодействия зависят не только от свойств исследуемой ткани, но и от характеристик УЗ поля, приводящих к видоизменению клеток и тканей. Проведенный нами анализ исследований различных аспектов применения терапевтического УЗ в медико-биологической практике позволяет предположить, что основными факторами разрушительного действия УЗ являются кавитация, акустические течения, микропотоки, сдвиговые напряжения, радиационное давление и лизис клеток, что необходимо учитывать при выборе режимов работы ультразвуковых приборов, используемых в клинической медицине и медико-биологической промышленности. Эффективность действия характеризуется минимальными изменениями параметров (напр. температуры, акустического давления и т.д.) в исследуемом объекте в процессе УЗ озвучивания.

Исследованию гемолитической активности ПА посвящено

достаточное количество работ ^{8, 9}, однако кинетические характеристики совместного действия ПА и УЗ на гемолиз эритроцитов ранее не были исследованы. Некоторые ПА, в том числе и амфотерицин В, обладают нефротоксичностью и гемолитической активностью¹⁰. На ранних этапах исследования филипина предполагалось, что он обладает только детергентными свойствами. Впоследствии было обнаружено каналообразующие свойства этого антибиотика. Методом сканирующей электронной микроскопии выявлено, что филипин при высоких концентрациях, взаимодействуя с мембраной, вызывает образование ниш диаметром 25 нм¹¹. Путем гемолитического тестирования получено подтверждение «стериновой гипотезы» взаимодействия филипина и его компонентов с клеточными (эритроциты) и модельными (БЛМ) мембранами и показано, что компоненты филипина можно расположить в ряд в порядке уменьшения их эффективности: филипин II > филипин III ≥ филипин I > филипин IV, что соответствует ряду характеризующему их биологическую активность. В то же время, среди ПА самыми активными в отношении клеточных и липидных мембран являются леворин и филипин.

К наиболее тяжелым и трудно излечимым заболеваниям можно причислить онкозаболевания. При этом течение любого заболевания сопровождается изменениями структурно функциональных свойств тех или иных форменных элементов крови, таких как подвижность, деформируемость, агрегационная

⁸Cybulska B., Gadomska I., Mazerski J. et al. N-Methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MF-AME), a novel antifungal agent of low toxicity: monomer/micelle control over selective toxicity. *Acta Bioch. Pol.* 2000; 47(1):121-31.

⁹Knophik – Skricka A., Klafaczycka A., Bielawski J. The effect of polyene antibiotic filipin on pig red blood cells. *Cell Mol Biol Lett* 2002; 7: Suppl: 200

¹⁰Султанова Г.Г., Самедова А.А., Касумов Х.М. Гемолиз эритроцитов при комбинированном действии ультразвуковых волн и полиеновых антибиотиков. *Ж. Антибиотики и химиотерапия*, 2008, 9 – 10, с.9-13.

¹¹Lopes Silvia C. et al. Filipin orientation revealed by linear dichroism. Implication for a model of action *Journal of the American Chemical Society*, 2004, V.: 126 Issue: 17 P.: 5396-5402.

активность, вязкость (концентрация белков и липидов), осмолярность крови (концентрация глюкозы). У онкологических и кардиологических больных наблюдается снижение деформируемости и увеличение вязкости эритроцитов, что, по-видимому, является следствием увеличения количества гликированного гемоглобина (Hb_{A1c}), и приводит к затруднению кровообращения в капиллярах и снижению коэффициента диффузионной доставки кислорода к тканям¹².

Одним из показательных методов, характеризующих состояние мембран клеток красной крови является гемолиз. Виды гемолиза различают по характеру течения, локализации и механизму возникновения.

Используемые в работе ПА (Амфотерицин В и леворин) плохо растворимы в воде, что снижает их терапевтический эффект.

Наиболее высокая биологическая эффективность ПА наблюдается в растворе диметилсульфоксида (ДМСО)¹³. ДМСО широко используется для защиты клеток от разрушительного действия детергентов^{14,15}. По-видимому, ДМСО способно через гидрофильные белковые аквапориновые каналы встраиваться в липидный монослой плазматических мембран, взаимодействуя с их липидными и белковыми компонентами и изменяя их

¹²Wilson P.W.F., Grandy S.M. The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: part I. *Circulation*. 2003, 108: 1422-1425. DOI: [10.1161/01.CIR.0000089505.34741.E5](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000089505.34741.E5)

¹³Yu Z., Quinn P. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide (Review) *Mol. Membrane Biology*, 1998, v.15,p.59-68. DOI: [10.3109/09687689809027519](https://doi.org/10.3109/09687689809027519) To link to this article: <https://doi.org/10.3109/09687689809027519>

¹⁴Линник Т.П., Мартынюк Н.И. Подходы к созданию криозащитных сред при криоконсервировании спермы птиц // Проблемы криобиологии. - 2010. Т.20, №2. - С.109-122. :http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2010_20_2_3,

¹⁵Dyubko T.S., Onishchenko E.V., Pivovarenko V.G. Influence of freezing and low molecular weight cryoprotectants on microsomal membrane structure: a study by multiparametric fluorescent probe // *J. Fluoresc.* – 2006. Vol.16. – P. 817–823. DOI: [10.1007/s10895-006-0089-5](https://doi.org/10.1007/s10895-006-0089-5)

структурные свойства¹⁶.

В последние годы метод искусственного кровообращения (ИК) относится к наиболее часто применяемому в кардиохирургии методик. Длительная циркуляция крови в аппарате ИК сопровождается травмой ее форменных элементов и развитием внутрисосудистого гемолиза¹⁷. Подобно поведению клеток в режиме кавитации в УЗ поле, в аорте и артериях течение крови происходит с высокой скоростью, в дальнейшем, уменьшаясь в венах доходит до минимума в капиллярах, приближаясь к докавитационному режиму¹⁸. В этой последовательности уменьшается давление, скорость кровотока и диаметр сосудов. При этом поведение эритроцитов в потоке крови определяется их механической резистентностью и деформируемостью. Очевидно, недостаточная способность эритроцитов изменять свою форму при умеренных скоростях потока крови, близких к физиологическим, которая *in vivo* реализуется преимущественно в сосудах микроциркуляторного русла, а *in vitro* – в оксигенаторе и фильтрах, обуславливает деструкцию клеток красной крови во время ИК. Предложена модель механического разрушения клеток в УЗ поле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе в качестве объекта исследования использовались: эритроциты, выделенные из цельной крови доноров и животных в контроле, а также при развитии лимфолейкозов; тени

¹⁶ Корниенко Е.М. Исследование кинетики детергентного гемолиза эритроцитов, модифицированных ДМСО, 2012, Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. Кріобіологія, Вып.15. с.171-176. http://nbuv.gov.ua/UJRN/VKhb_2012_1008_15_25

¹⁷ Давыдова Е.В., Гордиенко О.И. Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов для криопротекторов с различной степенью гидрофобности // Проблемы криобиологии. 2009. Т.19, №3. С. 261–272 http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2009_19_3_5.

¹⁸ Santa Lucia J. Hicks D., Hicks Jr The thermodynamics of DNA structural motifs. - Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2004, 34, 415-440. DOI: [10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800](https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800)

эритроцитов; клоногенные клетки асцитных опухолей *NKLy*, *S-37*, *HeLa* и солидной опухоли *S6*. В качестве факторов воздействия были использованы препараты, применяемые в хозяйственной деятельности и медицине: макролактонные соединения - полиеновые антибиотики, применяемые в химиотерапии антиканцерогенные препараты, антиоксиданты, а также факторы физического воздействия, такие как УЗ и ионизирующая радиация.

2.1. Методика выделения эритроцитов и получение их теней с последующим выделением фракции фосфолипидов. Гравитационные методы разделения клеток крови, основанные на различии их удельной плотности, получили наибольшее распространение. Из массы донорской крови возможно получить различающиеся по объему фракции клеток крови (эритроциты > нейтрофилы и эозинофилы > лимфоциты и моноциты > тромбоциты). Красные кровяные клетки выделяли за несколько этапов путем последовательного центрифугирования в градиенте плотности.

Эритроциты осаждали из 3 мл крови с добавлением цитрата или гепарина (0,5 мл цитрата + 2,5 мл цельной крови) и двукратно отмывали от плазмы изотоническим 0,9% NaCl. Центрифугирование проводили при 6000 об/мин в течение 10 минут (3 раза). Отмытые клетки суспендировали в 8 мл физиологического раствора. При исследовании УЗ гемолиза суспензию эритроцитов разбавляли физиологическим раствором в соотношении 0,5 мл + 23,5 мл физ-ра (в 50 раз). Концентрация клеток в исследуемой суспензии составила 30×10^6 кл/мл.

2.2. Разделение эритроцитов в градиенте плотности методами последовательного центрифугирования. Для разделения эритроцитарной массы на возрастные фракции молодых и старых эритроцитов была использована методика получения различных фракций эритроцитов в градиенте плотности.

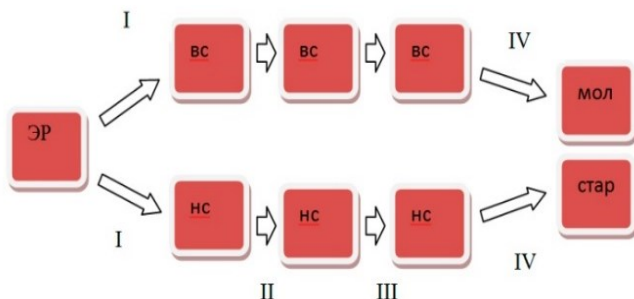


Рис. 1. Схема разделения эритроцитов на возрастные фракции в градиенте плотности

В итоге от первоначальной общей массы эритроцитов получается фракции содержащие 10-12% высоко стойких эритроцитов - ретикулоцитов, то есть молодых, наиболее стойких эритроцитов

2.3. Определение стойкости эритроцитов путем осмотического и кислотного гемолиза. *Проведение осмотического гемолиза эритроцитов.* Для определения процента гемолиза 0,4 мл 5 % эритроцитарной взвеси добавляли к 2 мл гипоосмотического раствора хлорида натрия. Для каждого образца оценивали гемолиз эритроцитов в 0,3 %, 0,4 % и 0,5 % растворах NaCl. Затем взвесь центрифугировали в течение 5 минут при 3000 об/мин и измеряли оптическую плотность супернатанта при длине волны поглощения гемоглобина 535 нм на спектрофотометре Т92+. Из полученных кривых гемолиза рассчитывали процент гемолизированных эритроцитов. Изменение оптической плотности суспензии клеток (объема клеток) также регистрировали с помощью фотоэлектрокалориметра ФЭК на красном светофильтре. Результаты фиксировались путем регистрации выходного сигнала. Оптическую плотность суспензии рассчитывали по величине светопропускания (%) по формуле $D = \lg(100/T)$.

2.4. Кинетический метод УЗ гемолиза, предложенный для характеристики механических свойств

мембранэритроцитов. Предлагаемый метод основан на принципе спектрофотометрической оценки нарушения мембран эритроцитов при действии механических и физических факторов УЗ. Стойкость эритроцитов изучали на основе разработанного нами метода фотоэлектрической автоматической регистрации процесса гемолиза красных кровяных клеток под действием непрерывного ультразвука при частоте 0,88 МГц в пределах интенсивности 0,1 - 1,0 Вт/см² при постоянной температуре.

Получено, что в изученном режиме УЗ обработки на эритроциты в основном действуют механические факторы, то есть полученные показатели стойкости эритроцитов к УЗ характеризуют их механическую стойкость. При воздействии непрерывного УЗ поля на биологические мембраны определены наиболее оптимальные концентрации ряда препаратов и режимы терапевтических воздействий (интенсивность, частота и время) выявляющие скрытые структурные дефекты мембраны. Изучение поведения клеток в УЗ поле позволило провести анализ возможных механизмов воздействия составляющих УЗ волны на исследуемые объекты и представить в физикотерапевтическом режиме озвучивания физическую модель поведения клеток в поле действия УЗ.

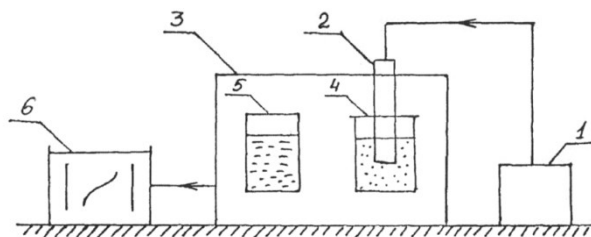


Рис. 2. Установка для проведения кинетического ультразвукового гемолиза эритроцитов крови состоит из: 1-терапевтического генератора УЗ волн Т-5, 2- излучателя 3- фотоколориметра, 4 и 5 – кварцевые кюветы с образцами, 6-потенциометра

2.5. Метод определения биологической активности макролактонных соединений и антиоксидантов. Основным

растворителем ПА является диметилсульфоксид (ДМСО). Биологическая активность и механизмы функционирования ПА определяется методом исследования проводимости бислойных липидных мембран (БЛМ).

Биологическую активность используемых соединений исследовали путем определения их гемолитической активности в следующей последовательности:

1. Получение эритроцитов проводили по методике 2.1. Для подготовки к исследованиям полученную эритроцитарную массу разбавляли 0,9 % раствором NaCl, содержащим 0,15 М натрия хлорида и 0,01 М натрий- фосфатного буферного раствора при рН 7,4. до получения 5 % взвеси по объему.

2. *Инкубация эритроцитов с препаратами.* К 5 мл 5 % взвеси эритроцитов добавляли препараты и инкубировали в закрытых пробирках при температуре 37 °С. В качестве контрольного раствора использовали равный объем физиологического раствора.

3. *Гемолитическую активность ПА* определяли двумя способами

I – способ: в качестве основной среды был использован 5мМ трис HCL буфер, рН 7.5, содержащий 150мМ NaCl. Выделенные эритроциты трижды отмывали и определяли гематокрит при центрифугировании при 8000об/мин ,6 мин. После инкубирования 2% суспензии эритроцитов с ПА в течении определенного времени центрифугировали 5 мин. при 5000 об/мин. Оптическое поглощение определяли на спектрофотометре при $\lambda = 540$ нм.

II – способ Озвучивание суспензии эритроцитов в том же разбавлении, как и в кинетическом методе, проводили через промежуточную среду (дистиллированная вода) с использованием в качестве излучателя пьезокварцевой головки площадью 4 см². На головку пьезоизлучателя был насажен пластмассовый цилиндр, на котором фиксировался сосуд с исследуемой суспензией эритроцитов.

Пробы после озвучивания центрифугировали в течении 10 минут при 6000 об.мин., а концентрация гемоглобина в

надосадочной жидкости определялась измерением оптической плотности на длине волны 540 нм.

2.6. Определение АХЭ активности мембран эритроцитов. Мембрано-связанную АХЭ активность определяли потенциометрическим методом: субстратом служил ацетилхолинхлорид (АХСІ) с начальной концентрацией в измерительной кювете 2,5 мм. Для изучения кинетики ферментативного гидролиза применяли инкубационную смесь, состоящую из 0,9% раствора NaCl, содержащего 2,5 мм, трис-НСІ, суспензии эритроцитов ($5-8 \times 10^4$ кл/мл), этанола (или спиртовой раствор МАС не более 2 % по объему). Реакцию начинали введением АХСІ после 30-минутной инкубации данной смеси. Измерения проводили при 37°C.

Из кинетических кривых полученных в результате изменения рН инкубируемой смеси в процессе ферментативного гидролиза АХ рассчитывали изменения относительной активности (А) (по тангенсу угла наклона кинетической кривой) при действии препарата вызывающая инактивацию фермента на 50% (СА₅₀).

2.7. Метод оценки пролиферации и метаболизма (МТТ) опухолевых клеток *in vitro*. Для оценки действия ПА на рост и метаболизм опухолевых клеток HeLa и S6 были использованы леворин и его производные, а именно, метилированный леворин, бутилированный леворин, интегральный леворин, а также амфотерицин В.

Все антибиотики, включая производные леворина А₂, растворяются до 10 мг на 1 мл ДМСО, но наиболее эффективные концентрации 0,1-1%.

1) Конечная концентрация представленных антибиотиков составила 2 мг/мл. Концентрация в лунках 96 луночного планшета составило дозы 20 и 40 мкг на лунку соответственно

2) *Подготовка культуры клеток.* Клетки клеточных линий HeLa (рак шейки матки человека) и С6 (глиома крысы) культивировали на ростовой среде ДМЕМ (Sigma, США) с 10 % ЭСТ Sigma, США).

Определение цитотоксичности методом МТТ-теста. В

экспериментальных исследованиях использовали МТТ-тест. Перевод формазана в раствор проводили с помощью ДМСО. Последующую фотометрию образцов проводили на иммуноферментном анализаторе 96-луночных планшетах, что позволяет точно сопоставить изменение оптической плотности раствора по отношению к контролю с изменением количества жизнеспособных клеток, а в цитотоксических исследованиях оценить специфическую гибель клеток, индуцированную полиеновыми антибиотиками. Оптическую плотность полученного раствора формазана измеряли на инфракрасном анализаторе (ИФА) при $\lambda = 505$ нм (Chem-Well, США). За 100%-ю жизнеспособность клеток принимали интенсивность окраски в лунках с клетками, не обработанными ПА.

2.8. Статистическая обработка результатов выполнялась в программе Statistica 6.0 с расчетом значения среднего арифметического и стандартной ошибки. Достоверность различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

АНАЛИЗ МЕМБРАННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ В ПОЛЕ ДЕЙСТВИЯ УЗ

3.1. Сравнение механизмов действия различных гемолитических факторов для анализа состояния клеточных мембран с использованием кинетического метода ультразвукового гемолиза.

Одним из причин появления повреждающих факторов клеток красной крови при патологии является изменение осмомолярности плазмы крови. Эндогенная (внутренняя) интоксикация характеризуется изменением проницаемости и сорбционной способности мембран эритроцитов. При этом выявлены отличия резистентности клеток различной

реологии¹⁹.

Осмотическая и химическая резистентности эритроцитов определяются по общепринятой методике кислотного гемолиза. Анализ некоторых типов лизиса эритроцитов выявил различие их механизмов. Кислотный гемолиз представим как многостадийный процесс, где при контакте с кислой средой наблюдаются конформационные изменения интегральных мембранных и примембранных белков. Далее происходит денатурация гемоглобина, приводящая к нарушению белково-липидных, и липид-липидных взаимодействий мембраны. Механизм осмотического гемолиза предполагается какодноэтапный процесс, приводящий к изменению формы и деформируемости клеток с выходом гемоглобина в окружающую клетку среду. В противном случае транспорт окружающего клетку раствора внутрь ее осуществляется в соответствии с градиентом концентраций и предшествует процессу разрушения клетки.

Различия сданными УЗ гемолиза, по-видимому, связаны с тем, что осмотическаяикислотная устойчивость, с одной стороны, и устойчивость к УЗ, с другой, возможно обусловлены различной природойвоздействующих факторов. Действие механических сил на эритроциты происходят при достаточно высоких значениях напряжения сдвига (10^4 дин/см²), при которых, по-видимому, нивелируются различия свойств мембран эритроцитов в разных возрастных группах. Анализируя общность механизмов всех трех видов гемолиза, рассматриваемых в диссертации, можно сказать, что наиболее значима связь химического гемолиза с механической резистентностью, что закономерно указывает на общность механизмов сохранения устойчивости клеток в экстремальных условиях. Сравнение действия всех трех исследуемых гемолитических факторов говорит о том, что

¹⁹Черницкий Е. А., Сенькович О. А., Розин В. В. Зависимость параметров гемолиза и везикуляции эритроцитов от концентрации Na-додецилсульфата: везикулярно-конкурентный гемолиз // Биологические мембраны. – 2000. – Т.17, №5. – С. 503–508.

дестабилизация мембраны не так велика при осмотическом шоке, как при химическом, так и при механическом воздействии, вызывающих изменения поверхностного заряда, деформируемости и вязкости соответственно. Приведенные результаты подтверждают значимость показателей резистентности клеток к воздействию различных стрессов в отношении организма. При этом, показатели разных типов гемолиза наряду с клиническими и биохимическими показателями несут в себе достаточно высокую информацию об эритроцитах в процессе патологии.

3.2. Выявление оптимального режима озвучивания суспензии эритроцитов для последующего анализа механизмов воздействия УЗ на клеточные мембраны

Рядом авторов²⁰ показано, что при определенных условиях УЗ воздействие может привести к видоизменению тех клеток и тканей и органов, через которые распространяются УЗ волны.

По данным^{20,21} существует четко выраженная пороговая интенсивность ультразвукового воздействия превышение которого приводит к лизису клеток.

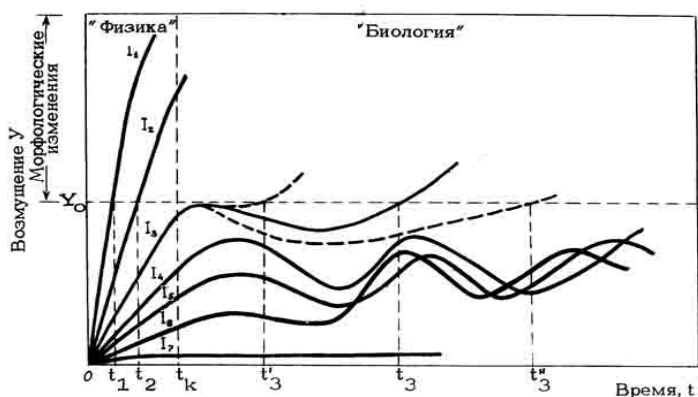


Рис. 3. Взаимозависимость протекания процессов в биологических объектах находящихся в поле действия УЗ

²⁰ Margulis M. A., Margulis I.M. Regarding of mechanism of biological action of ionizing radiation (in comparison with ultrasonic caitation). J. of Physical Chemistry, 2005, v. 79, №6, pp. 1142-1151.

отинтенсивности и времени воздействия УЗ.

Получено что при действии внешних факторах на эритроциты меняются механические свойства их стромы. Получена зависимость этих параметров от свойств самих эритроцитов (возраст, форма, реология), от условий озвучивания, фактора воздействия и наличия патологии в организме²¹.

Таким образом, можно предположить, что в основе механизмов морфологических и функциональных повреждений биологических клеток ультразвуком лежат механические факторы – ударные волны, микропотоки и акустические течения, что существенно знать для эффективного использования его в медицинских целях и микробиологической промышленности²².

²¹ TerHaar G. Ultrasound bioeffects and safety ProcInst Mechanical EngH 2010;224,363–373 /DOI: [10.1243/09544119JEIM613](https://doi.org/10.1243/09544119JEIM613)

²² Г.Г. Султанова, Х.М. Касумов. Физико-хиические свойства мембран эритроцитов при взаимодействии с полиеновыми антибиотиками в поле действия ультразвуковых волн. Ж.Биофизика, т. 66, №2, с.302-311 DOI: [10.31857/S0006302921020113](https://doi.org/10.31857/S0006302921020113)

ВЛИЯНИЕ МАКРОЛАКТОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ИЗВЕСТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ НА НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОЧНЫХ И ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

4.1. Модификация гемолитического процесса под действием амфотерицина В и его производных.

Данный раздел посвящен исследованию гемолитических характеристик ряда изученных ПА. Эритроциты млекопитающих и их мембраны представляют собой классическую модель клеток при изучении биологического действия мембрано-активных соединений (МАС), поскольку метаболические процессы, протекающие в них, очень слабы, а свойства мембран достаточно хорошо изучены. ПА относятся к классу мембрано-активных соединений, избирательно увеличивающих проницаемость клеточных и липидных мембран для ионов и органических соединений. Получено что при действии внешних факторах на эритроциты меняются механические свойства их стромы. Получена зависимость этих параметров от свойств самих эритроцитов (возраст, форма, реология), от условий озвучивания, фактора воздействия и наличия патологии в организме ^{21,22}.

В результате исследования гемолитических характеристик ряда полиеновых антибиотиков-амфотерицина В, нистатина, микогептина и леворина показано, что они избирательно увеличивают проницаемость клеточных и бислойных липидных мембран (БЛМ) для ионов и органических соединений путем образования стерин содержащих каналов молекулярных размеров ^{23, 24}. На рис.4 представлены результаты изучения литического действия амфотерицина В.

²³Kasumov Kh., Bolard J. Transient permeability induced by cationic derivatives of amphotericin B in lipid membranes. *Pol. J. Chem.* 2004, 78, 1057-1065.

²⁴Garcia-Chaumont C., Seksek O., Jolles B., Bolard J.A cationic derivative of amphotericin B as a novel delivery system for antisense oligonucleotides. - *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000 b. 10,3, 177-184. doi: 10.1089/oli.1.2000.10.177.

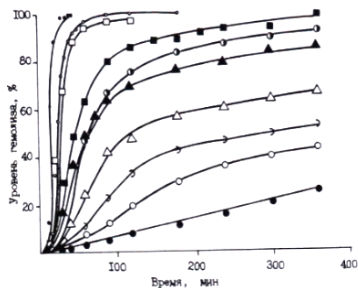


Рис. 4. Кинетика лизиса эритроцитов под действием различных концентраций амфотерицина В (мкМ), где: ● — 1.5мкМ; ○ — 2.0мкМ; ○ — 2.5мкМ; Δ — 3.0; ▲ — 4.0мкМ; — 6.0мкМ; ■ — 8.0мкМ; □ — 10.0мкМ; 14.0; ● — 20.0мкМ;;

Кинетические кривые выхода Нв имеют S-образную форму. Аналогичную форму имеют процентно-гемолитические кривые для осмотического, термического и кислотного гемолитического, а также кривые фотогемолитического. Некоторыми авторами показана линейная зависимость между количеством распавшихся эритроцитов и временем гемолитического интервала 10-90 %.

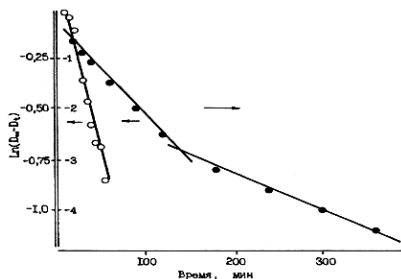


Рис. 5. Кинетика индуцированного амфотерицином В гемолитического в полулогарифмических координатах, где по оси абсцисс время гемолитического в мин; по оси ординат — значение L_n оптической плотности при различных концентрациях антибиотика

(○—1–3 мкМ; ● —2–14 мкМ).

Из рис. 5. видно, что фаза роста уровня гемолитического описывается суммой двух процессов в полулогарифмических координатах и образована двумя отрезками при малых и больших

концентрациях АмВ. Проведенные нами эксперименты при $J=0,2-1/0$ Вт/см² также подтвердили наличие прямолинейного участка кривой в интервале 10-70%, что, по видимому связано со спецификой действия ультразвука различных интенсивностей.

Контрольные эксперименты показали, что при увеличении интенсивности ультразвука до 1 Вт/см², прямолинейный участок кривой гемолиза существенно увеличивается (5-95%).

По своей химической природе ПА относятся к группе макролидных антибиотиков^{25,26}. На рис. 6. показаны спектры поглощения амфотерицина В и леворина, характеризующихся тремя основными максимумами в УФ-области, связанными с наличием сопряженных двойных связей в хромофорной части молекулы. Анализ проведенных исследований показал, что биологическая активность антибиотиков находится в прямой зависимости от химической структуры молекул. Доступность молекул антибиотиков к химической модификации по функциональным аминной и карбоксильной группам создает условие для получения новых препаратов с улучшенными физико-химическими свойствами для целенаправленного использования в клинике. Анализ литературных данных позволяет предположить, что биологическая активность ПА зависит от межмолекулярных взаимодействий антибиотика и фосфолипидов с образованием водородной связи между ними. В некоторых случаях такие связи образуются на внешней стороне мембраны, даже в отсутствии стероидов. Отмечено, что, несмотря на высокую активность ПА по отношению к патогенным грибковым клеткам, они характеризуются определенной токсичностью к человеческому организму, определяемому изменением гемолитической активности в присутствии антибиотиков. Основную роль в этих процессах играет взаимодействие

²⁵Cotero, B. V., S. Rebolledo-Antu'nez, and I. Ortega-Blake. On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel. *Biochim.Biophys. Acta.*1998, 1375:43-51. DOI: [10.1016/s0005-2736\(98\)00134-5](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(98)00134-5)

²⁶Cybulska B., Gadomska I., Mazerski J.et.al. N-Methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MF-AME), a novel antifungal agent of low toxicity: monomer/micelle control over selective toxicity. *Acta Bioch.Pol.*2000;47(1):121-31.

полиенов с липидным компонентом мембран. Высокие концентрации ПА приводят к разрушению мембран, а низкие концентрации приводят к структурным изменениям мембран. Низкая растворимость АмФ в воде снижает его терапевтический эффект. Некоторыми авторами для лечения гнойных инфекций ввиду меньшей токсичности рекомендовано производное амфотерицина В – MS-8209. В то же время, несмотря на создание новых форм амфотерицина В, по эффективности действия на системные грибковые инфекции, они не сравнимы с АВ. Было показано, что полиены могут тормозить рост злокачественных новообразований. Эффективность лизиса клеток карциномы, по-видимому, связана с взаимодействием амфотерицина В с мембранами, содержащие определенные стеринны. ПА на сегодняшний день остаются самыми эффективными соединениями в борьбе с грибковыми инфекциями.

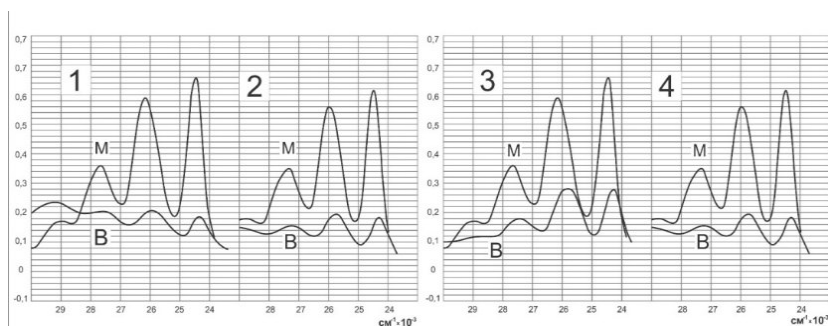


Рис. 6. УФ спектры исходного амфотерицина В (1) и его алкильных производных: метил – (2), этил – (3), пропил – (4) при концентрациях $3 \cdot 10^{-5}$ М в метаноле (М) и в воде (В).

Многие органические соединения хорошо растворяются в ДМСО, что позволяет использовать его в фармакологии, молекулярной биологии и медицине^{27,28}. Известно также, что

²⁷Yu Z., Quinn P. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide (Review) Mol. Membrane Biology, 1998, v. 15, p.59-68.DOI: 10.3109/09687689809027519 To link to this article: <https://doi.org/10.3109/09687689809027519>

амфотерициновый канал (АмФ) формируется молекулами стерина и антибиотика в соотношении 1:1(в случае амфотерицинаВ- в соотношении 8:8). Для различных ПА стехиометрические коэффициенты варьируют в пределах 3-17.

Высокие концентрации ПА приводят к разрушению, а низкие концентрации к структурным изменениям мембран²⁹. Некоторыми авторами для лечения гнойных инфекций рекомендовано производное амфотерицина В –MS-8209 ввиду меньшей токсичности³⁰. В то же время, несмотря на создание новых форм препаратов нового поколения, амфотерицин В, по эффективности действия на системные грибковые инфекции превосходит их. ПА на сегодняшний день остаются самыми эффективными соединениями в борьбе с грибковыми инфекциями

4.2. Определение гемолитической активности ПА близких по структуре амфотерицину В- филипина, леворина и его производных.

Несмотря на положительные эффекты своего действия, многие из изученных антибиотиков в разной степени обладают гемолитическими свойствами. В основе различий гемолитической активности ПА могут лежать свойства формируемых ими каналов, способность к растворимости, возможность связывания с поверхностью мембран и т.д.

²⁸Verheyden P., Franco W., Pepermans H., Vanbinst G. Conformational study of a somatostatin analog in DMSO/water by 2D NMR. *Biopolym*, 1990, v.30, p.855-860. DOI: [10.1002/bip.360300720](https://doi.org/10.1002/bip.360300720)

²⁹Konopka K., Guo L.S., Dugunes N. Anti-HIV activity of amphotericin B – cholesteryl sulfate colloidal dispersion in vitro. *Antiviral Res.* 1999, 42:197-209.

³⁰Beringue V., Adjou K., T., Lamoury F. et al. 2000 Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red accumulation of the protease – resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with scrapie agent. *J. Virol.*, 74: 5432-5440. [m.org/ D DOI: 10.1128/jvi.74.12.5432-5440.2000](https://doi.org/10.1128/jvi.74.12.5432-5440.2000)

Таблица 1

**Катион-анионная селективность каналов, индуцированных
в липидных мембранах некоторыми ПА**

№	Вещество	V_m , mV	T, мин
1	Амфотерицин В	$-20,4 \pm 1.8$	0.10 ± 0.04
2	Метамфоцин	-20.6 ± 0.8	0.09 ± 0.02
3	Этамфоцин	-22.3 ± 2.0	0.06 ± 0.04
4	Пропамфоцин	-21.4 ± 1.4	0.08 ± 0.03
5	Бутамфоцин	-23.2 ± 0.3	0.04 ± 0.01
6	Карбоамфоцин	-21.2 ± 0.6	0.08 ± 0.01
7	Нистатин	-18.2 ± 1.3	0.14 ± 0.02
8	Микогептин	-12.6 ± 0.8	0.25 ± 0.02
9	Розеофунгин	-16.2 ± 0.5	0.18 ± 0.01
10	Леворин	23.7 ± 0.6	0.97 ± 0.01
11	Метлеворин	23.3 ± 1.2	0.96 ± 0.02
12	Буглеворин	20 ± 1.0	0.9 ± 0.01
13	Карблеворин	23.8 ± 0.4	0.97 ± 0.01
14	Леворидон	24.7 ± 0.6	0.99 ± 0.01
15	Изолеворидон	25.5 ± 0.5	1.02 ± 0.01

Одними из важных характеристик взаимодействия ПА с мембраной является размер образуемой ими поры, то есть радиус канала, катионно-анионная избирательность. Было показано, что амфотерицин и его алкильные производные формируют в липидных мембранах анион-селективные ионные каналы. Результаты сравнения эффектов ПА на липидных мембранах путем изучения катион-анионной селективности каналов и сравнения параметров этих каналов по проводимости, напряжения (V_m) и времени фиксации (T) представлены в таблице 1. Из таблицы 1 видно, что с ростом алкильной цепи заместителя наблюдается увеличение анионной избирательности полиен-индуцированных каналов и кроме леворина и производных формирующих катионселективные каналы, все изученные препараты формируют в БЛМ анион-селективные ионные каналы.

Вызывает интерес изучение гемолитической активности некоторых ПА, таких как нистатин, микогептин, леворин и филиппин близких по химическому строению к АмФ. Филиппин, как нейтральный полиен, отличается от других ПА.

Исследована способность некоторых антибиотиков вызывать лизис эритроцитов человека. При сравнении литического действия ПА была выявлена различная степень их мембранотропной активности.

Характеризуя эффективность действия Па в зависимости от структуры их молекул, можно отметить, что микогептин, как и АмФ, является гептаеном, леворин также относится к гептаеновой группе, но отличается тем, что в свою очередь относится к группе ароматических макролидов и содержит л-аминофенильный радикал. Нистатин в отличие от АмФ является тетраеном, так как имеет разрыв в цепи сопряженных двойных связей. Розеофунгин является пентаеном, то есть в структуре молекулы содержится пять сопряженных двойных связей. Для сравнения относительной эффективности изученных соединений были исследованы равноэффективные концентрации гемолитиков, вызывающих 50% лизис эритроцитов.

Была изучена способность ПА гемолизировать эритроциты в изотонической среде. Показано, что амфотерицин В и леворин, а также их производные – метамфоцин, этамфоцин, карбоамфоцин, леворидон, изолеворидон карболеворин при инкубации с эритроцитами в суспензии проявляют гемолитическую активность в изотонической среде в концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} М. Однако обработка эритроцитов чистым раствором ДМСО $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ в изотонической среде в концентрации 0.1%-10%, а также, пропамфоцином, и бутамфоцином не приводит к гемолизу. В основе различий гемолитической активности ПА могут лежать свойства формируемых ими каналов, способность к растворимости, возможность связывания с поверхностью мембран и т.д.

Одними из важных характеристик взаимодействия ПА с

мембраной является размер образуемой ими поры, то есть радиус канала, катион анионная избирательность. Было показано, что амфотерицин и его алкильные производные формируют в липидных мембранах анион -селективные ионные каналы ³¹. В процессе сравнения эффективности изученных соединений были исследованы равноэффективные концентрации гемолитиков, вызывающих 50% лизис эритроцитов.

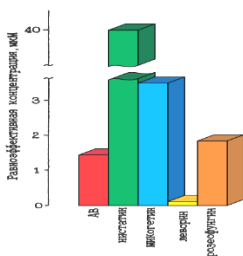


Рис. 7. Сравнение гемолитической активности равно эффективных концентраций некоторых ПА.

Как видно из рис.6. наиболее эффективным гемолитиком является левоорин, так как при инкубации с эритроцитами лизис наблюдается при наименьшей концентрации препарата.

По мнению некоторых авторов наиболее вероятным механизмом, лежащим в основе литических эффектов ПА, является коллоидно-осмотический механизм, который предполагает, что лизис является следствием дисбаланса ионных потоков через клеточную мембрану. Оба предполагаемых механизма ПА-индуцированного гемолиза (коллоидно-осмотический и химической деградаци) не исключают друг друга, поскольку развитие перекисных процессов в мембранах делает мембраны более чувствительными к осмотическому шоку. Характерной чертой коллоидно-осмотического процесса является S-образность кривой лизиса эритроцитов, индуцированного ПА.

³¹Касумов Х.М. Открытие одиночных полиеновых каналов и изучение их свойств в мембранах// LambertAcademicPublishing, 2020

4.3. Определение резистентности мембран эритроцитов при комбинированном действии УЗ и ПАс известной структурой молекул.

Исследовано комбинированное действие алкильных производных амфотерицина В и ряда производных леворина, модифицированных по аминной и карбоксильной группам и УЗ на гемолиз эритроцитов.

Из табл.2. видно, что ПА по-разному влияют на гемолитическую стойкость эритроцитов в поле действия УЗ: одни активируют, другие замедляют, а третьи -стабилизируют механическое разрушение эритроцитов. Такого рода изменения механической прочности эритроцитов под влиянием полиенов, по-видимому, могут быть связаны с нарушением микровязкости белково-липидной системы³².

Из экспериментальных данных следует, что некоторые препараты в малых концентрациях стабилизируют структуру мембран, а при высоких концентрациях способствует ее разрушению, по-видимому, адсорбируясь на мембране, препараты предохраняют ее от разрушения, т.е. препятствуют окислительным свободно-радикальным превращениям липидных и белковых компонентов мембраны^{33,34}.

Таблица 2

Влияние ряда ПА с известной структурой молекул на гемолитическую устойчивость эритроцитов

³² Kasumov Kh., Bolard J. Transient permeability induced by cationic derivatives of amphotericin B in lipid membranes. *Pol. J. Chem.* 2004, 78, 1057-1065.

³³ Eneida A. Romero, Elizabeth Valdivieso, B. Eleazar Cohen Formation of Two Different Types of Ion Channels by Amphotericin B in Human Erythrocyte Membranes. *Jour. of Membr. Biology*, 2009, 230, 2: 6922(1):64-73. doi: 10.1096/fj.07-9097com

³⁴ Doménech-Carbó A¹, Martini M, de Carvalho LM, Viana C, Doménech-Carbó MT, Silva M. Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. *JPharmBiomedAnal.* 2013 Feb 23;74: 194-204. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.10.031

Название	Хим.состав	Конц.преп.	t-гем. (УЗ),сек	Стаб%	уск. %	Спонтг ем. t -лат	гем
Амфотер.цинВ	C ₄₇ H ₇₃ N O ₁₇	10 ⁻⁶ ·5·10 ⁻⁶	500±22	-	30	-	-
		10 ⁻⁵ ·5·10 ⁻⁵	350±15	-	50	10	20
		10 ⁻⁴	250±18	-	-	5	10
Метамфоцин	C ₄₉ H ₇₉ N O ₁₇	10 ⁻⁶	575±24	15-	-	-	-
		5·10 ⁻⁶	450±12		10	-	-
		10 ⁻⁵ ·5·10 ⁻⁵	400±15	-	20	-	-
		10 ⁻⁴	300±9	-	40	5	20
Этамфоцин	C ₅₁ H ₈₃ N O ₁₇	10 ⁻⁶	850±25	70	-	-	-
		5·10 ⁻⁶ ·10 ⁻⁵	750±60	50	-	-	-
		5·10 ⁻⁵ ·10 ⁻⁴	400±12	-	20	70	100
Пропамфоцин	C ₅₃ H ₈₇ N O ₁₇	10 ⁻⁶	350±20	-	30	не вызы- вает	не выз- ы- вает
		5·10 ⁻⁶	470±68	-	-		
		10 ⁻⁵	625±25	25	-		
		5·10 ⁻⁵ ·10 ⁻⁴	250±12	-	50		
Бутамфоцин	C ₅₅ H ₉₁ N O ₁₇	10 ⁻⁶ ·5·10 ⁻⁶	600±23	20	-	-	-
		10 ⁻⁵ ·5·10 ⁻⁵	350±11	-	30	-	-
		10 ⁻⁴	275±16	-	45	-	-
Леворидон	C ₆₅ H ₁₀₄ N 3O ₂₄	10 ⁻⁶ ·5·10 ⁻⁶	475±19	-	5	-	-
		10 ⁻⁵	75±20	-	25	5	10
Изолеворидон	C ₆₅ H ₁₀₄ N 3O ₂₄ транс- изомер леворид она	10 ⁻⁶ ·5·10 ⁻⁶	500±25	-	-	-	-
		10 ⁻⁵	600±45	-	-	-	-
		5·10 ⁻⁵	525±27	20	-	-	-
		10 ⁻⁴	425±19	5	-	-	-
Карболеворин	C ₆₁ H ₉₄ N ₂ O ₂₄	10 ⁻⁶ ·10 ⁻⁵	550±27	10	-	-	-
		5·10 ⁻⁵	450±30	-	10	-	-
		10 ⁻⁴	90±17	-	4	30	80
Контроль- (ДМСО)	CH ₃ SOS =O	0,1 %	500±15	-	-	-	-
		0,25%	500±17	-	-	-	-
		0,5 %	500±14	-	-	-	-
		1%	500±12	-	-	-	-
		10%	650±25	30	-	-	-

По видимому ПА, внедряясь в липопротеидную область мембраны, способны взаимодействовать с гидрофобными

участками мембран эритроцитов или могут сами формировать в них структурные каналы, изменяя при этом ионную проницаемость мембран.

Биологическая активность ПА зависит от содержания в мембранах стерина определенной структуры, взаимодействуя с которыми антибиотики формируют в мембранах ионные каналы, избирательно проницаемые для ионов и органических соединений³⁵. Показано, что производные амфотерицина В – метамфоцин, этамфоцин, карбоамфоцин и производные леворина – леворидон, изолеворидон, карболеворин в суспензии эритроцитов обладают гемолитической активностью в изотонической среде в концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} М. Однако, обработка эритроцитов чистым раствором ДМСО в концентрации 0.1 - 1%, а также пропамфоцином и бутамфоцином не приводит к гемолизу

Как видно из табл.2. гемолитический эффект ПА имеет концентрационный характер. Показано, что по степени изменения проницаемости липидных мембран ПА повозрастающей эффективности можно расположить в следующий ряд: филиппин > амфотерицин > леворин > нистатин³⁶. Это свидетельствует о корреляции между действием ПА на клеточные и липидные мембраны, что дает возможность использовать количественные параметры УЗ гемолиза эритроцитов для оценки биологической эффективности ПА. Полученные результаты имеют большое практическое значение в связи с использованием ПА в медицине в качестве основных противогрибковых и противовирусных препаратов, что актуально в связи с распространением инфекционных заболеваний

4.4. Оценка влияния мембраноактивных каналообразующих антибиотиков леворина и амфотерицина В и их производных на пролиферацию и метаболизм

³⁵Miller M.W., Sherman T.A. Brayman A.A. Comparative sensitivity of human and bovine erythrocytes to sonolysis by 1-MHz ultrasound, *Ultrasound Med Biol* 2000, 26(8), 1317–1326. DOI: 10.1016/s0301-5629(00)00254-4

³⁶Sultanova G. G., Kasumov Kh. M. Physical and chemical properties of erythrocyte membranes in interaction with polyene antibiotics in the field of ultrasonic waves 2021 *J Biofizika* V. 66. 2. P.

клоногенных опухолевых клеток HeLa и С6

В данной главе представлены результаты исследования цитотоксического действия ПА - леворина и его производных, а также амфотерицина В на эритроциты и опухолевые клетки *HeLa* и *С6 in vitro* и их выживаемость

Важным параметром, определяющим токсичность антибиотика, является время нахождения антибиотика в мембране и степень его связывания с компонентами мембраны. Использование алкильных производных леворина позволяет уменьшить время пребывания антибиотика в мембране и тем самым уменьшить степень его токсичности.

Таблица 3

Результаты исследования цитотоксического эффекта леворина и его производных, а также амфотерицина В на пролиферацию и метаболизм опухолевых клеток.

№	Соединение	Доза, мкг	Выживаемость опухолевых клеток по отношению к контролю, %	
			С6 (глиома крысы)	<i>HeLa</i> (карцинома шейки матки)
1	Леворин А ₂	20	124,16±1,14p<0,01	101,22±2,42p>0,05
		40	118,0±1,56p<0,01	106,69±2,41 p<0,01
		200	94,76±1,62p<0,01	64,12±1,57p<0,01
2	Леворин А ₂ (метилированный)	20	87,30±2,01p<0,01	91,44±2,51 p<0,01
		40	38,35±2,85p<0,01	31,40±1,23p<0,01
3	Леворин А ₂ (интегральный)	20	97,91±0,99p<0,01	105,68±1,39p<0,01
		40	123,34±1,66p<0,01	117,44±3,76p<0,01
4	Амфотерицин В	20	158,33±3,56p<0,01	137,4±3,94p<0,01
		40	106,04±4,33p>0,05	76,11±0,7p<0,01

В отличие от неароматических антибиотиков, ПА с ароматической группировкой, в частности, леворин А и его производные, резко увеличивают проницаемость липидных и клеточных мембран для катионов щелочных металлов, то есть леворин является антибиотиком широкого противогрибкового спектра.

При действии леворина и алкильных производных амфотерицина В – метамфоцина и бутамфоцина на экспериментальные опухоли наблюдается усиление торможения роста асцитных солидных опухолевых клеток на 46,3 - 79,0 % по сравнению с контрольными животными. ПА в сочетании с ДМСО обладают также антиканцерогенными свойствами, что было выявлено при обработке животных канцерогеном диэтилнитрозоамином (ДЭНА).

Показано, что в дозах 20 и 40 мкг исходная молекула леворина А₂ не оказывает ингибирующего действия на выживаемость опухолевых клеток линий С6 и *HeLa*. Сильно выраженный противоопухолевый эффект леворина А₂ наблюдается в дозе 200 мкг в отношении опухолевых клеток линии *HeLa*. Установлено, что метилированный леворин А₂ в дозах 20 и 40 мкг при воздействии на опухолевые клетки линий С6 и *HeLa* оказывает достоверный противоопухолевый эффект, который проявляется в подавлении выживаемости клеток и составляет IC70.

Анализ проведенных исследований показал, что биологическая активность антибиотиков находится в прямой зависимости от химической структуры молекул. Доступность молекул антибиотиков к химической модификации по функциональным аминной и карбоксильной группам создает условие для получения новых препаратов с улучшенными физико-химическими свойствами для целенаправленного использования в клинике. С помощью химической модификации и методов геной инженерии можно создать менее токсичные и более эффективные ПА нового поколения^{37,38}.

³⁷Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Современная антимикробная химиотерапия Медицинское информационное агентство. 2009

³⁸Preobrazhenskaya M.N., Olsufyeva E.N., Solovyeva S.E. Chemical modification and biological evaluation of new semisynthetic derivatives of 28-29 Didehydronystatin A1 (S44HP), a genetically engineered antifungal polyene macrolide antibiotic. // J. MedChem., 2009; 52(1), 189- 196. DOI: [10.1021/jm800695k](https://doi.org/10.1021/jm800695k)

ИЗУЧЕНИЕ МЕМБРАНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТОСТАТИКОВ И АНТИОКСИДАНТОВ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ

5.1. Возможные механизмы действия антиоксидантов из группы оксипиридинов на физико-химические свойства мембран эритроцитов

Поиск эффективных фармакологических препаратов, защищающих клеточные структуры от окислительного повреждения, является актуальной проблемой биофизики на протяжении многих лет. Показано, что увеличение концентрации активных форм кислорода в организме приводит к преждевременному старению организма и развитию различных заболеваний, включая онкологические.

В настоящее время поиск и разработка средств антиоксидантной фармакотерапии ведется в двух направлениях: во-первых, изыскание эффективных препаратов среди природных антиоксидантов и, во-вторых, получении более совершенных аналогов их производных. Комбинированное применение физических факторов и препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами является основой одного из современных подходов в научных исследованиях.

Показано, что под действием антиоксидантов на *in vivo* стабилизируются мембраны эритроцитов и повышается их резистентность к различным гемолитическим факторам³⁹. Механическое воздействие УЗ на мембраны в физиотерапевтическом режиме моделировалось добавлением препаратов мексидола и эмоксипина к суспензии эритроцитов. Анализ содержания низкостойких форм эритроцитов в суспензиях показал, что при инкубации эритроцитов в оксипиридинсодержащих растворах,

³⁹Клебанов Г.И., Любицкий О.Б., Васильева О. В и др. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина. // Вопросы медицинской химии, 2001, 47,3, с. 288-300.

содержание низкостойких эритроцитов было ниже, чем количество высокостойких эритроцитов по сравнению контролем, что свидетельствует о повышении общей резистентности эритроцитов.

Цитопротекторный эффект мексидола и эмоксипина может свидетельствовать о защитном действии препаратов в отношении мембран эритроцитов в условиях экспериментальной патологии как *in vitro* так и *in vivo*. При моделировании *in vitro* патологических процессов, происходящих *in vivo*, следует учитывать реакции систем кроветворения и кроверазрушения. Из литературных данных известно, что в процессе циркуляции крови в аппаратах ИК происходит травматизация ее форменных элементов^{40,41}. В то же время поведение эритроцитов в потоке крови определяется их механической резистентностью и деформируемостью.

Показано, что используемые препараты – мексидол и эмоксипин при определенных концентрациях значительно повышают резистентность форменных элементов крови *in vitro* так и *in vivo* при гипотоническом гемолизе и механической травме в аппаратах искусственного кровообращения. Таким образом, соединения из класса оксипиридинов - мексидол и эмоксипин обладают защитным действием в отношении литического действия УЗ. Увеличение интенсивности УЗ приводит к усилению действия его механических факторов и соответственно к снижению защитного эффекта этих соединений.

При этом наибольшим защитным эффектом обладает мексидол. Получено, что в присутствии антиоксидантов сохраняется способность крови связывать достаточные

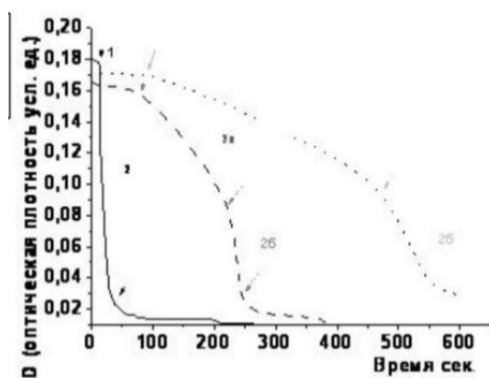
⁴⁰Vercaemst L. Hemolysis in cardiac surgery patients under-going cardiopulmonary bypass: A review in search of a treatment algorithm // The J. of Extra Corporeal Technology. 2008. V. 40, № 4. P. 257—267. PMID: [PMC4680715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/164680715/)

⁴¹ Атауллаханов Ф.И., Корунова Н.О., Спиридонов И.С. Как регулируется объем эритроцита, или что могут или не могут математические модели в биологии // Биологические мембраны, - 2009. Т. 26, № 3. - с. 163–179.

количества кислорода. Анализируя вышесказанное и учитывая то, что все исследованные в данной работе соединения являются антиоксидантами, а некоторые из них также радиопротекторами, то можно предположить, что их стабилизирующее действие связано со способностью противостоять окислительным свободнорадикальным превращениям липидных и белковых компонентов мембраны⁴².

5.2. Оценка действия растворителей ПА ДМСО и этанола на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов

Изучена кинетика гемолиза эритроцитов под действием различных концентраций ДМСО и этанола. Обнаружено, что гемолитический ответ в присутствии ДМСО имеет стадийный характер. Контролем были клетки, не подвергавшиеся действию ДМСО. Кривые гемолиза эритроцитов регистрировали по изменению оптической плотности образцов, при длине волны $\lambda=670$ нм и при непрерывном перемешивании⁴³. Константы скорости гемолиза определяли по тангенсу угла наклона соответствующих участков кинетических кривых на их



полувысотах.

⁴²Бурлакова Е. Б. Биоантиоксиданты. // Российский химический журнал. 2007. Вып. 51, №1. с.3-12.

⁴³Хакл Е. В., БерестВ. П. Изменение подвижности липидов мембраны при в взаимодействии грамицидина S с эритроцитами человека// Биофизический вестник 2008,2, 21. 56-63

Рис. 8. Кривые гемолиза эритроцитов под действием леворина при разных концентрациях ДМСО — 1-контроль, 2- 15% ДМСО, 3-20% ДМСО соответственно.

Как видно, процесс гемолиза образцов эритроцитов – как контрольных, так и модифицированных ДМСО, представляет собой 2-х стадийный характер. Наибольший защитный эффект наблюдается при обработке эритроцитов 20% раствором ДМСО.

Таким образом, использование ДМСО в качестве растворителя ПА повышает устойчивость эритроцитов к гемолизу под действием макролактонных соединений. По-видимому, ПА и ДМСО являются конкурентами во взаимодействии с одними и теми же структурными компонентами клеточной мембраны, в первую очередь, липидами. Поэтому предварительная обработка эритроцитов ДМСО должна снизить степень связывания ПА с липидами мембраны. Возможен и прямой механизм повышения структурной устойчивости мембран обработкой ДМСО за счёт образования водородных связей с молекулами структурной воды, взаимодействующими с макромолекулами мембран, что приводит к их стабилизации.

Таким образом, можно констатировать то, что предварительная обработка эритроцитов ДМСО повышает их устойчивость к гемолизу под действием мембраноактивных макролактонных соединений из группы полиенов. При приготовлении растворов некоторых лекарственных препаратов в качестве растворителя используется этанол. В связи с этим изучено действие этанола на клеточные мембраны. По статистике многолетних исследований самый высокий показатель летальных исходов от острых отравлений приходится на токсическое действие некачественного алкоголя^{44,45}

⁴⁴ Василевич Н.В. Платошкин Э. Н., Запольский Д.В. Острые отравления алкоголем и суррогатами алкоголя в клинической практике врача на стационарном этапе лечения. Проблемы здоровья и экологии, Клиническая медицина, 2012, с.38-44

⁴⁵ Василевич Н.В. Платошкин Э. Н., Запольский Д. В. Острые отравления алкоголем и суррогатами алкоголя в клинической практике врача на стационарном этапе лечения. Проблемы здоровья и экологии, Клиническая

Было изучено влияние этанола в поле действия УЗ на плазматические мембраны эритроцитов в процессе гемолиза. Результаты исследований показали, что концентрация этанола в исследуемой пробе $\leq 0,1\%$ не влияет на прочность эритроцитов к УЗ воздействию. Концентрация спирта $\geq 0,1\%$ по объему оказывают стабилизирующее действие на эритроцитарные клетки. Анализ состояния клеточных мембран при действии различных концентраций этанола в крови показал, что небольшие дозы алкоголя у 50% обследуемых могут привести к активации защитных механизмов по сохранению целостности мембран и время полураспада эритроцитов у них увеличивается. С увеличением концентрации алкоголя стабилизация мембраны эритроцитов уменьшается. По-видимому, при действии небольших концентраций этанола срабатывают защитные механизмы мембран клеток, а при возрастании уровня алкоголя – период полураспада мембран уменьшается, что подтверждается данными на клеточных мембранах при действии высоких доз алкоголя.

5.3. Модель воздействия УЗ волн на эритроциты в суспензии *in vitro*, как аналог их поведения *in vivo* в организме.

При сравнении результатов по изучению резистентности эритроцитов в кровяном русле *in vivo* и в поле действия УЗ волн *in vitro* нами была сделана попытка провести аналогию между этими процессами. Известно, что сердечно - сосудистая система образована сосудами различных размеров и физико-химических характеристик, влияющих на кровоток и состав красной крови.

При этом течение крови в различных участках кровеносной системы проходит с переменными скоростями и давлением, так как эритроциты при течении в кровяном русле подвергаются различным воздействиям - механическим, гидродинамическим, биохимическим.

Нами был разработан спектрофотометрический метод изучения проницаемости биологических мембран при физиотерапевтическом режиме озвучивания и предложен для

решения поставленных задач^{46,47}.

Таблица 4.

Соответствие параметров УЗ поля механическим показателям сердечно-сосудистой системы

УЛЬТРАЗВУК		Серд - сосуд. Система
Режимы		Сердце
Докавитац. реж.	Реж.кавитации	аорта, артерии
0,01-0,2ВТ/см ²	≥0,3	вены, капилляры
0.88МГц	> 1 МГц	

На рисунке 8. представлена схема турбулентного течения крови в аорте и артериях.

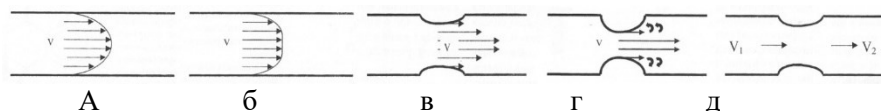


Рис. 9. Схема турбулентного течения крови в аорте и артериях

Как видно из рис.8. в аорте и артериях (а также при стенозах) в сосудах наблюдается турбулентное течение крови с высокой скоростью, соответствующее кавитационному режиму, в дальнейшем скорость кровотока уменьшается (а, в, д) в венах и доходит до минимума в капиллярах-докавитационный режим. В этой последовательности изменяется давление, скорость кровотока и диаметр сосудов. В то же время, при сравнении размера аорты и суммарной длины всех капилляров в организме вполне логично то, что именно в капиллярах эритроциты выполняя свои основные функции подвергаются наибольшему риску разрушения, нежели чем в аорте и артериях. Действие вихревых потоков, сдвиговых напряжений, микропотоков, возникающих в УЗ поле можно

⁴⁶ Нагорнов Ю.С., Пахомова Р.А., Жилиев И.В. и др. Моделирование морфологии эритроцита и расчет внутриклеточного давления по данным атомно-силовой микроскопии // Российский журнал биомеханики. 2015. Т. 19, № 4: 398-408

⁴⁷ Султанова Г.Г., Багирова А.А., Рагимов Н.Р., Николаевич Л.Н. Действие некоторых макролидных антибиотиков *in vitro* на стойкость эритроцитов и пролиферацию и метаболизм злокачественных клеток // Ж. Гематология и трансфузиология (Мат. IV Конгресса Гематологов России), 2018, 63.1, 184-185

экстраполировать и сопоставить с трениями, соударениями, вихревыми движениями, пульсацией при движении клеток в кровяных сосудах, то есть в сосудистом русле также имеет место действие механических факторов на клетки. При этом, реологические параметры клеток в различных частях кровяного русла коррелируют с данными поведения эритроцитов при различных условиях озвучивания. Проведенный выше анализ позволяет предположить, что между резистентностью клеток при различных режимах ультразвукового воздействия и их поведением в кровяном русле существует корреляция, которую можно представить как модель поведения эритроцитов в различных участках кровяного русла.

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УЛЬТРАЗВУКА И МАКРОЛАКТОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

6.1. Изучение реологических свойств эритроцитов оптическим методом и определение количественных характеристик механических свойств их стромы с предварительным разделением на возрастные фракции. Гемолитическая стойкость является функцией мембраны и ее свойств, связанных с физико-химическими характеристиками липидов мембраны. Стойкость мембраны зависит также от соотношения холестерина/фосфолипид. Фосфолипиды повышают осмотическую стойкость эритроцитов, а холестерин препятствует переходу эритроцитов в сферическую форму, являющуюся первым признаком гемолиза. Эритроциты разных возрастов можно разделить по плотности и соответственно по возрасту, причем ретикулоциты самые легкие, содержащие в 4-5 раз больше общих липидов и фосфолипидов, чем зрелые и старые клетки. В то же время при старении эритроцитов существенно изменяются функциональные свойства клеток. Показано, что молодые эритроциты характеризуются более высокой стойкостью, чем старые, что определенным образом связано со свойствами и ферментным составом их стромы, приводящих в свою очередь, к изменению стойкости красных кровяных клеток. Рядом авторов

показано, что развитие экспериментальных лейкозов и опухолей сопровождается нарушением молекулярной организации мембран, изменением физико-химических свойств липидов, усилением перекисного окисления липидов в мембранах, как самих клеток, так и клеточных органелл⁴⁸.

В связи с этим актуально провести оценку морфофункционального состояния эритроцитов и особенностей его изменения у клинически здоровых доноров и людей с различными заболеваниями, определить зависимость этих параметров при росте экспериментальных опухолей и провести корреляционный анализ этих результатов с изменением физико-химических характеристик эритроцитов в контроле и при ряде заболеваний.

6.2. Изменение структурно-функционального состояния мембран эритроцитов при онко- и гематологических заболеваниях. В силу того, что онкологические заболевания практически не выявляются на начальных стадиях развития процесса, актуально использование биологических «моделей» для изучения структурно-функциональных свойств клеток крови у онкологических больных на различных стадиях заболевания. Предположительно экспериментальная «модель» лейкоза может отразить сходные изменения некоторых параметров крови в условиях развития онкопроцесса у людей⁴⁹. Работа проводилась в два этапа: исследование общих закономерностей изменения параметров клеток крови мышей при экспериментальном лейкозе и экстраполяция полученных результатов при анализе исследования клеток крови при патологиях различной локализации и стадий заболевания. Работа с животными проводилась в соответствии с принципами Хельсинкской декларации о гуманном

⁴⁸ Корман Д. Б. Альтернативная терапия рака М.: Изд. Практическая медицина, 2016, 216 С

⁴⁹ Н. Забияков. Атомно-силовая микроскопия. Оценка морфометрических параметров клеток крови позвоночных животных (Russian) Paperback – 24 Nov. 2010 Publisher: LAP LAMBERT Academic Publishing (24 Nov. 2010)

отношении к животным⁵⁰. На модельной системе было обнаружено, что молодые эритроциты обладают повышенной резистентностью к воздействию механических факторов УЗ. Наиболее выраженные изменения параметров красной крови при росте опухоли как солидной, так и асцитной наблюдается на средней стадии процесса, а ближе к летальному исходу наблюдается мнимое увеличение показателей крови. Это, по-видимому, есть реакция организма на развитие онкопроцесса, приводящая к интенсивному выводу из кровяного русла старых по возрасту эритроцитов и к относительному увеличению суммарной стойкости эритроцитов. Нужно отметить, что именно увеличение количества стареющих эритроцитов может быть показателем при диагностике и прогнозировании организма опухоленосителя и дать ряд важных рекомендаций при комплексном лечении в химиотерапии.

Разработанным методом можно проводить наблюдение за изменением количественных характеристик состояния эритроцитов при развитии патологических процессов в организме. При дифференциальном исследовании суспензий клеток в УЗ поле появилась возможность наблюдения за развитием состояния кроветворной системы при патологических состояниях организма. Была изучена устойчивость эритроцитов мышей в поле действия УЗ после перевивки лимфолейкоза и при введении пнтиканцерогенного препарата циклофосфамида (ЦФ). Из результатов представленных на рис.9. и рис.10. видно, что в период развития опухоли наблюдается динамика изменения резистентности эритроцитов.

Представленные в табл. 4 данные свидетельствуют о том, что у большинства онкологических больных с опухолями различной локализации имеет место увеличение микровязкости мембран клеток крови, зависящей от локализации опухоли, стадии заболевания, гистологии, градации и т.д. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что количественный

⁵⁰ Горняк С.А. Физические механизмы взаимодействия ультразвука с биологическими структурами и их моделями. 2003, Автор. дис. канд. Физ.-ат. наук Харьков, 26 с.

состав крови не всегда отражает изменения происходящие в организме, в особенности в присутствии такого мощного фактора как онкопроцесс. Кинетический метод УЗ гемолиза позволяет диагностировать патологический процесс до и без проявления клинических признаков болезни. Результаты процентного распределения различных групп эритроцитов по стойкости представлены на рис.9.

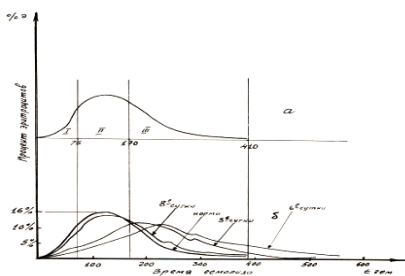


Рис. 10. Кривые нормального распределения клеток (эритрограммы) в контроле (1) и у инфицированных животных на 2,3,6 и 8 сутки (соответственно кривые 2,3,4,5) после действия УЗ на организм (онкопроцессы, естественное старение клеток крови в кровяном русле).

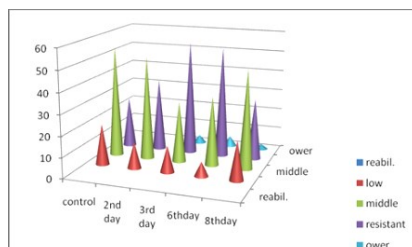


Рис. 11. Диаграмма распределения эритроцитов по группам стойкости в разные сроки после перевивки на модельных системах, нашли свое состояние мембран эритроцитов при этом образом, в поле действия УЗ физико-химических характеристик мембран при различных воздействиях на мембраноактивные соединения, естественное старение клеток крови в кровяном русле).

Получено, что при патологических процессах наблюдается накопление в периферической крови повышенного количества молодых по возрасту эритроцитов и максимальная гибель старых изношенных эритроцитов. Обнаружено, что молодые эритроциты обладают повышенной резистентностью к воздействию механических факторов УЗ.

Таблица 5

Физико-химические характеристики эритроцитов при некоторых патологиях(клиника)

Болезнь	Ср. объем эритроц. Мкм	Отн.показ. прел. при $\lambda = 805$ нм	Ср. конц. сух. вещ в эритроц.	Ср. содер. веществ. эритроц.	Колич. эритроц. млн/1 мл %на100мл
РМЖ	83,6±5,0*	1,060±0,002*	34,4±1,0*	29,3±0,9*	2,8±0,4*
РЖ	77,2±4,0*	1,062±0,002*	35,2±0,7*	27,6±0,4*	2,8±0,1*
РЛ	82,6±5,4*	1,058±0,002*	33,9±0,88*	27,9±0,8* *	2,8±0,3*
Пневм.	65,4±3,0	1,066±0,002*	38,2±0,5	25,2±0,6	3,8±0,2*
Контр.	63,5±0,2	1,071±0,001	41,6±0,2	26,4±0,2	4,8±0,2

Из представленных выше результатов, представленных на рис.8 и 9 и в таблице 4, видно что предложенный метод выявления изменения оптической плотности под воздействием физико-химических факторов дает возможность оценить количество эритроцитов в любой момент времени в суспензии; константу скорости уменьшения числа эритроцитов для любого заданного промежутка времени; среднюю константу скорости гемолиза; долю негемолизированных эритроцитов в результате заданного воздействия, характеристики механических свойств мембран эритроцитов.

Влияние ионизирующего излучения на функциональное состояние мембран эритроцитов при раке молочной железы

В связи с использованием ионизирующего излучения в радиологии онкологии является актуальным изучение его действия на состояние клеточных мембран.

Результаты исследования состояния мембран эритроцитов женщин – доноров, а также пациенток с диагнозом – рак молочной железы в возрасте 20-70 лет до и после лучевой терапии приведены в таблице 5.

Таблица 6

Период полураспада мембран эритроцитов $T_{50\%}$ разных возрастных группах здоровых женщин и пациенток с РМЖ до и после лучевой терапии

Возраст	Здоровые	Онкологические	<i>p</i>	Онкологические	<i>P</i>
---------	----------	----------------	----------	----------------	----------

	T ₅₀ , мин мин	больные до облучения		больные после облучения	
20-30 лет	23,4±1,8	–		–	
31-50 Лет	26,7±2,3	19,9±2,0	<0,05	30,2±2,7	<0,001
51-70 лет	27,5±2,4	23,7±2,1	<0,05	26,8±2,3	<0,05
> 70 лет	29,9±3,3	27,2±2,3		20,2±1,9	<0,01

Увеличение показателя T₅₀ в контрольной группесвидетельствует о наличии большего количества не разрушенных эритроцитов после воздействия ИЭП.

Это свидетельствует о том, чтоподаваемая доза облучения способствует «укреплению» мембран эритроцитов за счет включения организмом резервных возможностейдля сохранения мембран эритроцитов от воздействия негативных факторов, что мешает развитию гемолиза.

Видно, что у лиц старше 60 лет исчерпываются резервы для сохранения мембран эритроцитов от действия внешних неблагоприятных факторов, что свидетельствует о том,что у лиц зрелого возраста при лучевой нагрузке включаются внутренние компенсаторные реакции организма, а у лиц старше 70 лет - нет.Следовательно на фоне облучения наблюдается ложное улучшение состояния(ремиссия),не приводящая к окончательному выздоровлению.

Исследование различных воздействий на эритроцитарную мембрану в цельной крови пациента и на выделенную суспензию эритроцитов с использованием метода ультразвукового воздействия дает возможность, во-первых, оценить непосредственное действие препаратов на структуру клеточной мембраны т.е. оценить защитные свойства мембранных структур (белков) и других химических соединений крови при действии изучаемых препаратов, а во-вторых, выявить наиболее оптимальные дозы изучаемых препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для разрешения поставленных в диссертации задач были определены основные этапы работы. В результате была изучена гемолитическая активность антиоксидантов и макролактонных соединений полиеновой структуры и выявлены оптимальные дозы их действующих концентраций; проведен сравнительный анализ эффективности действия структурно-модифицирующего действия производных ПА с различными по структуре и гидрофобным свойствам боковыми заместителями на клеточные мембраны; обоснована возможность использования ультразвуковых волн в физиотерапевтическом режиме для анализа состояния клетки диагностики повреждений клеточных мембран; определены в УЗ поле повреждения биологических мембран, вызываемые действием ряда биологически-активных препаратов; изучены и проанализированы закономерности изменения физико-химических свойств эритроцитов при различных режимах озвучивания, а также при действии некоторых физических факторов внешней среды; выявлены приоритетные составляющие ультразвуковых волн в механизме воздействия на клетки крови и разработана физическая модель поведения клеток в ультра звуковом поле; проанализированы механизмы действия различных концентраций ряда макролактонных соединений и их растворителей (ПА, этанол, ДМСО, антиканцерогены, антиоксиданты) на структурно-функциональные свойства эритроцитов и установлена корреляция действия на биологические и бислойные липидные мембраны (БЛМ); идентифицирован вклад эритроцитов различного возраста на гемолитическую картину красной крови (эритрона) при патологиях и установлена взаимосвязь между ними; выявлены общие закономерности влияния физико-химических характеристик на мембраны клеток крови; исследовать действие физических факторов на функциональное состояние мембран эритроцитов при экспериментальных лейкозах и выявлена корреляция поведения эритроцитов в поле действия ультразвуковых волн на клеточные и липидные мембраны, а также разработана модель поведения клеток в физиотерапевтическом режиме озвучивания.

Анализ действия мембраноактивных соединений на

биологические клетки позволяет приблизиться к пониманию механизмов их связывания с исследуемыми объектами (эритроцитами и БЛМ) путем образования в них новых транспортных систем ионных каналов без нарушения структуры мембраны, а также для защиты ее от механической травмы путем создания невидимой оболочки вокруг мембраны клетки. Выявлены зависимость степени модифицирующего действия изученных антибиотиков от их структуры. Показана общность воздействия на эритроциты механических факторов сердечно-сосудистой системы и ультразвуковых волн физико-терапевтического режима озвучивания.

Разделение клеток красной крови на возрастные фракции, имеющие место в кровяном русле человека и животных *in vivo*, позволяет выявить роль каждой из этих групп на гемолитическую картину крови онкологических больных.

Выявлена связь динамики развития онкологического процесса у экспериментальных животных с физико-химическими и реологическими характеристиками форменных элементов крови.

Изучение механических свойств эритроцитов методом ультразвукового гемолиза дает возможность выяснить степень воздействия некоторых физиологически активных соединений (антиоксидантов, макроциклических соединений и некоторых антиканцерогенных препаратов) на структурно-функциональные характеристики клеток организма и предложить оптимальные концентрации их использования в биомедицинской практике.

Полученные результаты изучения различных режимов ультразвукового озвучивания клеток крови позволили предложить аналог модели поведения клеток в кровяном русле человека.

Таким образом, представленная методика позволяет оценивать изменения функционального состояния клеточных мембран в зависимости от возрастного состава эритроцитов, локализации опухоли, концентрации препарата, химической структуры, а также действия факторов окружающей среды на биологические объекты. Это дает широкие возможности для использования кинетического метода УЗ исследования в качестве скрининг метода в различных областях биомедицинских

исследований.

ВЫВОДЫ

1. Впервые определены количественные характеристики изменения механической стойкости эритроцитов в зависимости от ряда физико-химических параметров среды: частоты и интенсивности ультразвука, количества эритроцитов, содержания гемоглобина, общего содержания белка в клетках и показателя скорости оседания эритроцитов. Определен наиболее оптимальный режим УЗ воздействия на клеточные мембраны (при частоте $f=0.88$ МГц и интенсивности $J=0.2-0.4$ Вт/см²).

2. Определена степень защитного действия ряда мембраноактивных соединений с помощью кинетического метода УЗ гемолиза эритроцитов. Проведен анализ изменения структурных характеристик эритроцитов, модифицированных различными полиенами: амфотерицин В, леворин и их производные, нистатин, этрускомицин, микогептин, филиппин.

3. Показано, что антиоксиданты - эмоксипин и мексидол производные оксипиридинов в концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ М в исследуемых суспензиях на 35-45% повышают устойчивость эритроцитарных мембран к механическому действию ультразвука.

4. Выявлено, что полиены при взаимодействии с эритроцитами вызывают структурно-функциональные изменения физико-химических характеристик их мембран. При низких концентрациях антибиотика 10^{-6} М наблюдается эффект стабилизации мембран амфотерицином В и леворином, а при высоких изученные антибиотики, за исключением леворина, являются слабыми гемолитическими агентами. Показано, что антибиотики, проникая в эритроцитарные клетки, химически модифицируют молекулы гемоглобина, приводя к ее денатурации. Характер изменения резистентности эритроцитов определяется химической природой действующего модификатора, его концентрацией и временем взаимодействия с клеткой. Показано, что пропамфоцин и леворидон в концентрациях $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л приводят к необратимым изменениям мембран эритроцитов.

5. Показано, что комбинированное действие ряда соединений в поле УЗ волн обладает защитными свойствами. Показано, что антиоксиданты эмоксипин и мексидол в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ М в исследуемых суспензиях на 35-45% повышают устойчивость эритроцитарных мембран к механическому действию ультразвука.

6. Разработан метод контроля функционального состояния эритроцитарных мембран в присутствии диметилсульфоксида и этанола. При низких концентрациях этанола отмечается укрепление мембран, а с повышением концентрации этанола наблюдается ухудшение состояния эритроцитарных мембран.

7. Впервые рассчитано процентное распределение эритроцитов крови по их устойчивости к УЗ гемолизу в норме и при патологии. Установлено, что молодые по их возрасту в кровяном русле эритроциты обладают наибольшей резистентностью к УЗ и кислотному гемолизу. Выявлена взаимосвязь повышения механической стойкости эритроцитов к УЗ с накоплением в периферической крови повышенного количества молодых эритроцитов и усилением их резистентности при развитии лимфолейкоза в асцитной форме. Обнаружен двухфазный характер изменения механической стойкости эритроцитов, соответствующий определенным этапам кинетики опухолевого процесса. Показано, что циклофосфамид тормозит развитие опухоли, не оказывая влияния на параметры стойкости – время и скорость гемолиза. Кинетические характеристики гемолиза красной крови могут быть представлены как дополнительные критерии, определяющие развитие экспериментальной опухоли и позволяют диагностировать изменения мембран эритроцитов.

8. Впервые обнаружено, что амфотерицинВ, леворин и их алкильные производные значительно тормозят развитие опухолевого процесса. При этом показано изменение распределения эритроцитов по группам стойкости в сторону увеличения низкостойких эритроцитов. Кинетические характеристики гемолиза красной крови могут быть представлены как дополнительные критерии определяющие развитие

экспериментальной опухоли. Установлено, что метилированный леворин в дозах 20 – 40 мкг/мл при воздействии на опухолевые клетки линий *C6* и *HeLa* оказывает противоопухолевый эффект, который проявляется в подавлении выживаемости клеток. Амфотерицин В в концентрации 40 мкг/мл незначительно снижает выживаемость опухолевых клеток линии *HeLa* по сравнению с дозой 20 мкг/мл, а в дозах 20 и 40 мкг/мл не влияет на выживаемость опухолевых клеток *C6*.

9. Предложена модель механического разрушения клеток в ультразвуковом поле *in vitro*, как аналог их разрушения в кровяном русле *in vivo*. Показано, что как в ультразвуковом поле (вихревые потоки, сдвиговые напряжения, микропотоки), так и при движении в кровяных сосудах (трения, соударения, вихревые движения, пульсация) имеет место действие механических факторов на клетки. Видимо между резистентностью клеток при различных режимах ультразвукового воздействия и их поведением в кровяном русле существует корреляция, которую можно представить как модель поведения эритроцитов в различных участках кровяного русла.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложенный кинетический метод изучения состояния красных кровяных клеток может быть применен в клинических условиях для определения функциональной способности клеточных и липидных мембран.

2. Этот метод позволяет прогнозировать эффект влияния ряда макролактонных соединений на мембраны эритроцитов, т.е. дает выход на поиск наиболее эффективных лекарственных препаратов необходимых в различных областях медицины и народного хозяйства.

3. Предложенный метод может быть использован в качестве скрининг метода для выявления наиболее распространенных патологических процессов в организме (онкологических, сердечно-сосудистых).

4. При воздействии УЗ волн смоделировано поведение эритроцитов в звуковом поле физиотерапевтического режима как аналог их поведения в различных участках кровяного русла.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ НАУЧНЫХ РАБОТ

1. Султанова Г.Г., Касумов Х.М. 1995. Ультразвуковой гемолиз эритроцитов в присутствии ПА. Научно-практическая конференция “Физика-95”, АГУ, Баку.с. 56.
2. Kasumov Kh. W., Samedova A.A. Sultanova G.G. The investigation on structure of organization and funktion of polyene antibiotics in bilayer lipid membrans Cell Biiologu Processing The 2-nd International Confrance, Baku 1996, p.41-43.
3. Sultanova G.G KasumovKh. W. et al. Ultrasound haemol. of red blod cells in thepresenre of physiologically active substayenТрудынаучнойконференциипосвященнойпамятипро ф.ТМамедова 1999, Бакус.115-116.
4. Kasumov Kh.M., Sultanova G.G., Samedova A.A The effect of polyene antibiotics on the cell and lipid membranes. Сб. раб. Аз-го Биофиз общ-ва, Баку, 2002,166-169.
5. Касумов Х.М.,Султанова Г.Г., Самедова А.А., Гусейнова К.Ф Растительные токсины-основа для создания новой группы лекарственных препаратов В мат. конф. БГУ, посвящ. 100-летию Мирали Ахундова «Перспективы развития экспериментальной биологии» Баку, 2002, р. 119-120.
6. Султанова Г.Г., Самедова А.А., Гусейнова К.Ф., Касумов Х.М. 2002. Возможные механизмы действия полиеновых антибиотиков на эритроциты. Сб.тр. Биофизического общества, БГУ, Баку, с. 187-193.
7. Султанова Г.Г., СамедоваА.А.. ГусейноваК.Ф.. Касумова Х.М. Взаимодействие ПА с эритроцитарными мембранами Труды Института Физиологии НАНА, Матер. конфер. посвященной 80 летию Ш. Тагиева, 2002 с. 370-375
8. Kasumov Kh.M., Sultanova G.G., Samedova A.A. Plant toxines the sourse of raw materials for drug’s preparation Сб. раб. Аз-го Биофиз. общ-ва, Баку, 2003
9. Султанова Г.Г., Касумов Х.М. Использование метода ультразвукового гемолиза для изучения действия полиеновых антибиотиков на мембраны эритроцитов Матер. конференции Азербайджанский Независимый Университет

2004 с.28-30.

10. Самедова А.А., Султанова Г.Г., Касумов Х.М. Механизм действия полиеновых антибиотиков на бислойные фосфолипидные мембраны Матер. конференции Азербайджанский Независимый Университет, 2003, с116-117.
11. Касумов Х.М., Султанова Г.Г., Самедова А.А. Исследование взаимодействие растит. токсинов с липидными мембранами, Цитология Россия, 2004 т.47, №10, 968-969.
12. Sultanova G. G., Kasumov Kh. M., Samedova A.A., Zeynalova N.M., Abdullayev X.D. The effect of some physiologically active substances on erythrocyte membranes in normal state and tumour pathology” XVII Ulusal Bioloji Kongresi 4 Sektionsuzlu, Poster ve Serbest Bildiri Ozetleri, 21-24, Haziran 2004. Cukurova Universiteti. Adana 7-8.
13. Samedova A.A., Sultanova G.H., Kasumov Kh.M. 2006. Membrane-active polyene macrolide filipin, its properties, mechanism of its activity on cell membranes. Конференция «Генетические ресурсы лекарственных и ароматических растений», посвященная 75-летию ВИЛАР (Всесоюзный НИИ Лекарственных и Ароматических растений) и 55-летию Ботанического сада Института. Сборник трудов, т. 17, с. 530-534.
14. Султанова Г.Г., Самедова А.А., Касумов Х.М. 2006. Ингибирующее действие полиеновых антибиотиков и пестицидов на стойкость плазматических мембран. Межд. Научная Конференция «Генетические ресурсы лекарственных и ароматических растений», посвященная 75-летию ВИЛАР (Всесоюзный НИИ Лекарственных и Ароматических растений) и 55-летию Ботанического сада Института. Сборник трудов. т. 17. с. 509-514.
15. Султанова Г.Г., Самедова А.А., Касумов Х.М., Гусейнова К.Ф. Индуцированный гемолиз эритроцитов в присутствии полиеновых антибиотиков Межд. научн. конф. «Молекулярные. мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». VII Съезд ВООФиБ Минск,

2006, Т2, с.252-256.

16. Султанова Г.Г., Гусейнова К.Ф. Влияние ряда ФАВ (физиологически активных веществ) на структуру и функции мембран эритроцитов В сб «Труды института ботаники НАНА» 2006, том XXVI, стр.403-408.
17. Курбанов О.Г., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Гусейнова К.Ф., Ибрагимова В.Х., Мамедов Г., Касумов Х.М. 2007. «Механизм действия полиеновыхмакролидных антибиотиков природного происхождения. Практические аспекты их использования». Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы фитодизайна». Россия. Белгород, с. 167-170
18. Самедова А.А., Султанова Г.Г., Гусейнова К.Ф.Салимова А.М. Мембраноактивный полиеновый антибиотик филиппин и механизм его действия на биологических объектах. Межд. научно-практ. Конфер. «Актуальные проблемы экологии ив Казахстане и сопредельных территориях». Павлодар, Казахс., октябрь, 2007 с.70-73.
19. Samedova A.A., Sultanova G.G., KasumovKh.M., Kurbanov O.H., Huseynova K.F. 2007. "Mechanizm of transport system of ions and organic substances in to muscle cell by polyene antibiotic levorin and its derivatives" Международный симпозиум «Природные катаклизмы и глобальные проблемы современной цивилизации» Баку, р. 514-517.
20. Kh. Gasimov, A. Mamedov, S G.ultanova , A. Samedova, R. Babaev, V. Ibragimova, N. Zeynalova. "A study of molecular-genetic and pharmacological characteristics of Saffron species. Пушино, 2007. Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», с.146-148.
21. Султанова Г.Г. Концентрационная зависимость действия сверхмалых доз ряда полиеновых антибиотиков ПА на мембраны эритроцитов IV Международный симпозиум «Механизмы действия сверхмалых доз», Москва, 2008 с.103-104.
22. Самедова А.А.,Касумов Х.М., Султанова Г.Г. 2008. Ме-

- ханизм действия полиенового мембраноактивного антибиотика филипина. Биохимические аспекты его изучения на клеточных мембранах. Межд. Конф. «Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии», Ж. Успехи современного естествознания, № 9, с. 99-101.
23. Султанова Г.Г., Самедова А.А., Касумов Х.М. 2007. Гемолиз эритроцитов при комбинированном действии ультразвуковых волн и полиеновых антибиотиков. - Журнал «Антибиотики и химиотерапия» (Россия), № 9-10, с. 9 -13.
 24. Самедова А.А., Султанова Г.Г., Гусейнова К.Ф. Салимова А.М. Мембраноактивный полиеновый антибиотик филипин: Биохимические и биофизические аспекты его изучения и применения в медицине. В сб.: «Теоретические аспекты биохимии и биотехнологии растений» III Межд.Конф. Минск, 2008 с.496-499.
 25. Самедова А.А., Султанова Г.Г. Гусейнова К.Ф., Салимова А.М. Механизм действия полиенового антибиотика филипина на клеточные и липидные мембраны. Мат. Межд. Конф. «Ботанические сады в 21 веке», Белгород, 2009, с.379-381.
 26. Султанова Г.Г. Влияние ряда мембрано активных препаратов на структуру и функции мембран эритроцитов. Материалы IV Международной научно - практической конференции «Наука и современность – 2010» Новосибирск 2010
 27. Султанова Г.Г. Влияние антиоксидантов и полиеновых антибиотиков на механические свойства мембран эритроцитов, Материалы VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» Москва 2010 с. 450-452.
 28. Султанова Г.Г. Современные представления о механизме действия ультразвука на клетки и клеточные структуры, Известия АН Азербайджана серия биолог., 2010, №1-2, с.129-136.
 29. Sultanova G.G., Hüseynova K.F. Ultra şəş hemoliz usulunun biofiziki tədqiqatlarda istifadə olunmasının aktuallığı, AMEA Botanika İnstitutu toplusu XXXI cild 2011 s.364-368.

30. Султанова Г.Г., Гусейнова К.Ф. Защитный эффект ряда антиоксидантов в условиях гемолиза и механического стресса, *Материалы Международной конференции «Актуальные проблемы использования полезных растений» Баку, 2011, с. 222-225.*
31. Ибрагимова В.Х., Алиев Н.Н., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Касумов Х.М. 2012. Низкомолекулярный пептид-антибиотик, обладающий высокой эффективностью действия на вирусные, грибковые и стафилококковые инфекции. В материалах Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологической и химической экологии. Москва, с. 198-201.
32. Ибрагимова В.Х., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Касумов Х.М. 2012. Антивирусное и антигрибковое действие антибиотика инфанвир при заболевании овощных культур. *Известия НАНА, Серия биологических наук, т. 67, №2, с. 34-37.*
33. Султанова Г.Г., Самедова А.А., Касумов Х.М., Гусейнова К.Ф., Анализ механизмов биологического действия ультразвука. *Материалы Международной конференции «Сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» Санкт-Петербург 2-5 июля 2012г., т 2.с.196.*
34. Gasimov Kh.M., Sultanova G.G, Samedova A., Ibragimova V. 2013. The Development of Molecular Trans-Membrane Channel Systems for Delivery Ions and Carbohydrates to Heart Muscle Cells at Pathology. *EUFEPS European Federation for Pharmaceutical Sciences, 5th World Conference on Drug Absorption, Transport and Deliver (WCDATD): Responding to Challenging Situations, Uppsala, Sweden, p. 59.*
35. Султанова Г.Г.Самедова А.А., Гусейнова К.Ф. Анализ механизмов биологического действия ультразвука (на примере ультразвукового гемолиза) *Мат. III Росс. Онколог. Конгресса, Ж.Злокачественные опухоли (The Journal of Malignant Tumour) Москва 2013, №2 (6), с.180-181*
36. Самедова А.А., Касумов Х.М., Султанова Г.Г., Гусейнова К.Ф., Курбанов О.А. Изменение функциональной

- деятельности клеточных мембран под действием полиеновых антибиотиков. В Мат. I Межд. Научн. Конф. «Лекарственные растения. Фундаментальные и прикладные проблемы. Новосибирск 2013, с.402-405.
37. Султанова Г.Г. Модель гемолитической стойкости эритроцитов к воздействию ультразвука в эксперименте и клинике Ж. Злокачественные опухоли (The Journal of Malignant Tumour) Материалы XVIII Российского Онкологического Конгресса Москва 2014, №3 (10), с.284-285.
 38. Султанова Г.Г. Изменение качественного состава эритроцитов при различных стрессах Мат. Научн. Конфер. Посвящ.80-летию Биол. Фак. БГУ, 2014, с.260-264.
 39. Ibragimova V. Kh., Samedova A.A., Sultanova G.G., Gasimov Kh.M. The antiviral and antifungal action INFANVIR antibiotic at the vegetable crops. The First European Conference on Biology and Medical Sciences "East-West" Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH, Vienna, Austria, 2014, p. 45-50.
 40. Султанова Г.Г. Стабилизирующее действие ряда ФАВ (антиоксиданты и антибиотики) на эритроциты в условиях гемолиза и механического стресса, Современная микология в России В Материалах III Международного микологического форума Москва 2015 14-15 апреля с.390-391.
 41. Султанова Г.Г. О механизмах действия ультразвука в условиях кавитации International Journal of Gafqaz University 2015 v 3, № 1, p 109-116.
 42. Султанова Г.Г. Изменение качественного состава эритроцитов при различных стрессах в Мат. конференции «Перспективы развития экспериментальной биологии, посв. 80-летию факультета биологии БГУ, 2014, с.261-264.
 43. Sultanova G.H. Combined Action of Ultrasonic Waves and Polyene Antibiotics on Cell Membranes. Conference AMEA-nın Botanika İstitutunun 80 illik yubileyinə həsr edilmiş

- Beynəlxalq Konfrans “Innoative Approaches to Conceration of biodiersity, 2016, October 2-4, p.118.
44. Султанова Г.Г. Использование ультразвука в физиотерапевтическом режиме для исследования состояния тканевых структур, Сборник трудов института ботаники посвященный 80-летию Института Ботаники НАНА,2016, т.2, с.95-99.
 45. Sultanova G.G., Baghirova A.A., Gasimova K., Pasazae T.J., Tagizade T.P. Effekt of some polyene antibiotics on cancer cell АМЕА Хəbərлər (biologiya və tibb elmləri) 2016, cild 71, №3, səh.113-117.
 46. Samedova A.A., Sultanova G.H. Modern Conceptions About Levorin A and its Derivatives Action in Cell and Bilayer Lipid Membranes International Journal of Science and Research, 2016.V.5, Issue 4, p. 2276-2279, IFCop.6,4.
 47. Sultanova G.G., Samedova A.A., Gasimova V.Kh., Nikolayevic G.N The action of some antineoplastic medicines on growth and metabolism of tumor cells *in vitro* 2017 SYLWAN Journal, 161(1), P161-169, IF TR 0,243.
 48. Султанова Г.Г. Влияние злокачественных новообразований на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов. Новости медико-биологических наук, Международная научная конференция «Фундаментальные и прикладные науки медицине» 6 окт. 2017 г. Минск Беларусь, с.104-105.
 49. Султанова Г.Г. Биофизические механизмы действия ПАполиеновые антибиотики на мембраны эритроцитов Современная Микология в России Мат. IV Съезда Микологов России, Москва, 2017 Т.7, с 278-280.
 50. Султанова, Г.Г. Касумов Х.М. Действие некоторых полиеновых антибиотиков на мембраны эритроцитов Новости медико-биологических наук В б.тр. Межд. конф. Фундаментальные науки – медицине, Минск, 2017с.105-106.
 51. Султанова Г.Г., Гасымова В.Х. Гемолитический эффект эритроцитов, индуцированный ультразвуком и полиеновыми антибиотиками с установленной химической

- структурой В Мат. Конференции посв. 90-летию акад. В. Дж. Гаджиева, Баку, 2018, с.283-286.
52. Султанова Г.Г. Сравнение механизмов трех видов гемолиза: ультразвукового, химического и осмотического Сб. Тр.Международной конференции посв.95-летию акад. В.Ю. Ахундова Баку 2017с.316-321.
 53. Багирова А.А., Султанова Г.Г.Создание противогрибковых антибиотиков нового поколения. Современный подход к решению проблемы антибиотикорезистентности при кандидозных инфекциях. Симпозиум по микологии посвященный 120–летию академика В.И.Ульянищева, Баку 2018, с.86.
 54. Султанова Г.Г., Касимова В.Х. Динамика изменения физико-химических свойств эритроцитов при онкопроцессах и действии полиеновых антибиотиков. The Scientific Heritage Budapest, Hungary No 19 (2018) P.15-19.
 55. G.H. Sultanova, V. Kh. Qasimova, T.C.Pashazde, Corresponding membeof ANAS Kh. M.Kasumov The action of ultrasoundwaves and polyene antibiotics on red blood cells. The reports of National of Sciences of Azerbaijan 2018, V.LXXIV, 2, p.58-64.
 56. В.А.Вайнштейн, Л.Н.Николаевич, Г.Г.Султанова, А.А.Багирова, Т.Дж. Пашазаде, В.Х. Гасимова, Т.П. Тагизаде, Х.М.Касумов. Действие химически трансформированных макроциклических полиеновых антибиотиков на опухолевые клетки Ж. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2018, т. 166, №12, с.695-700 IFTR 0.634.
 57. Султанова Г.Г., Багирова А.А., Рагимов Н.Р., Николаевич Л.Н. Действие некоторых макролидных антибиотиков *in vitro* на стойкость эритроцитов, пролиферацию и метаболизм злокачественных клеток. Ж.Гематология и трансфузиология,2018, Мат. IV Конгресса гематологов России, Москва, V63, т.1, 1, с.184-185.
 58. V.A. Vainshtein, L.N. Nikolayevic, G.H. Sultanova, A.A. Baghirova, T.J. Pasha-zade, V.Kh. Gasimova, T.P. Tagi-zade,

- Kh.M.Kasumov. The action of chemically transfor medmacrocyclicpolyene antibiotics on tumor cells Bulletin of Eksperimental biology and medicine 2019 V 166, №2, с.735-739 IFTR0.576 (2018).
59. Султанова Г.Г., Рагимов Н.Р. Влияние ионизирующего излучения на функциональное состояние мембран эритроцитов при онкозаболеваниях. Мат. Межд. научн. конференции «Фундаментальные и прикладные науки медицине» Минск,2018, с.98-99.
 60. Султанова Г.Г., Багирова А.А., Рагимов Н. Р., Николаевич Л.Н. Действие некоторых макролидных антибиотиков *in vitro* на стойкость и пролиферацию и метаболизм злокачественных клеток Ж. Геатология и трансфузиология. Мат.IV Конгресса Геатологов России, Москва 2018,63,1, с.184-185.
 61. Султанова Г.Г. Модель поведения эритроцитов в кровяном русле. 2019. Материалы VI Съезда Биофизиков России, Сочи,2019, т.2,с.77-78.
 62. Султанова Г.Г. О механизмах изменения активности АХЭ-азы эритроцитов некоторыми пестицидами. В мат. Конф «Физико-химическая биология как основа современной медицины». Минск, 2019, т.2, с.102-104.
 63. Sultanova G.G. Analysis of the mechanisms of action of ultrasound on biology cells Ж.Евразийского Союза Ученых, Польша 2019, 7, (64), p.18-23ISSN 2411-6467.
 64. Султанова Г.Г. К вопросу о механизмах лечебного действия ультразвука при механических нарушениях органов и тканей организма. Ж. Биомедицина, 2020, №4, с.96.
 65. Sultanova G.G. About of Mechanisms of Change in the Activity Acetylcholinesterase of Erythrocyte by Some Pesticides and Antioxidants, 2020, Journal of Integrated OMIKS, Speashial V. 9, Issue 4p. 14-19 DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2019.6.66.
 66. Султанова Г.Г. Анализ действия сил в ультразвуковом поле на эритроциты как модель их поведения в сосудистом русле Journal Human Biology University

Press, 2021 ISSN 0018-7143E-ISSN 1534-66172018 I Fr: 1.061H-Index: 46.

67. Султанова Г.Г., Касумов Х.М. Анализ состояния эритроцитов в диагностике COVID-19, Конференция отделения Биол.наук Баку 2020
68. Султанова Г.Г. Анализ механизмов гемолитического действия полиеновых антибиотиков на мембраны эритроцитов, Севастополь, БФФХ, Ж. Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2020
69. Султанова Г.Г., Рагимов Н.Р., Касумов Х.М. Анализ действия макролактонных соединений с известной структурой молекулы на мембраны плазматических и опухолевых клеток *in vitro* Международный научный конгресс на тему «Современные проблемы фармации», посвященный 90-летию Азербайджанского медицинского университета (АМУ) и 80-летию Фармацевтического образования в Азербайджане, 2021, с.351-356.
70. Султанова Г.Г., Касумов Х.М. Физико-химические свойства мембран эритроцитов при взаимодействии с полиеновыми антибиотиками в поле действия ультразвуковых волн. Ж. Биофизика, 2021, т. 66, №2, с.302-311 (Scopus): 0.516 (2017).
71. Sultanova G.G. Kasumov H.M. Physico-chemical properties of erythrocyte membranes in interaction with polyene antibiotics in the field of action of ultrasonic waves. J. Biophysics, 2021, T. 66., 2, p 255-263. WoS: 0.516. IF DOI: 10.1134/S0006350921020238.
72. Kh. Kasumov, V.Qasimova, G.Sultanova et al To the way to increasing the biological activity of polyene antibiotics on the sterol containing lipid membranes European Biophysics Journal, BIOPHYSICS LETTERS, IN PRESS, 2021 Impact factor (RSCI): 2,236.
73. Султанова Г.Г. Анализ возможных последствий лизиса эритроцитов под влиянием каналообразующих гемолитиков *in vivo*. Qarabaqın biomüxtəliflyi torpaq və su ehtiyatları: keçmiş, bu günü və gələcəyi AMEA onlayn Kon-

frans 20-21 may 2021-ci il,səh 88.

74. Bağirova A.Ə., Sultanova G.H., Qasımoğlu V.K. Makrolakton polien birləşmələrinin patogenlərə və klonogen hüceyrələrinə təsiri “Muasir aqrar və biologiya elmlərinin aktual problemləri: global çəğirişlər və innovativalar”. Vittual Beynaxalq elmi-praktiki konfrans toplusu. Bakı, 2022 (в печати)
75. Sultanova G.H., Mammadova Kh.R. Analysis of the action of ultrasound field on erythrocytes – as a model of their behavior in the vessel 11th Intern. Conferen.arhiefement and challenges in biology devoted to 120th anniver. of professor Mirali Akhundov october 13-14, 2022 Baku State University.p. 88-89.
76. Sultanova G.H., Mammadova Kh.R., Combined use of polyene antibiotics and ultrasound in fundamental and practical medicineInter. J. of Natural Medicine and health Science. Conf. on Biomedical and Pharmaceutica August 27-28, 2022 p.31-32.

Защита диссертации состоится "23" декабря 2022 года в 14⁰⁰ на заседании Диссертационного совета ВЕД 2.31, действующего на базе Бакинского Государственного Университета.

Адрес: AZ 1073/1, г. Баку, ул. Академика Захида Халилова, 33, БГУ, главный корпус, IV этаж, Научная библиотека.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бакинского Государственного Университета.

Электронная версия диссертации и автореферата размещена на официальном сайте Бакинского Государственного Университета (<http://elibrary.bsu.edu.az>).

Автореферат разослан по соответствующим адресам "23" ноября 2022 года.

Подписано в печать: 17.11.2022

Формат бумаги: А5

Объем: 72090

Тираж: 70