

# Влияние цефтриаксона на морфофункциональное состояние эритроцитов доноров

А. К. Кондакова, Г. А. Семко, Е. В. Левицкая, В. Н. Цымбал  
ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»

## Резюме

**Цель** – изучить морфофункциональное состояние эритроцитов крови доноров, модифицированных цефтриаксоном в терапевтической концентрации.

**Материалы и методы.** Исследование *in vitro* влияния цефтриаксона на осмотический, перекисный гемолиз и сорбционную способность эритроцитов проводили на образцах крови 10 практически здоровых доноров. Пробы крови, стабилизированные 0,109 М раствором трехзамещенного лимоннокислого натрия, инкубировали в присутствии цефтриаксона в концентрации 250 мкг/мл в течение 2 ч при температуре 37 °С (опытные пробы). Интактные пробы (контрольные) готовились аналогично, но без добавления цефтриаксона.

**Результаты и выводы.** При инкубации *in vitro* эритроцитов с цефтриаксоном в концентрации 250 мкг/мл в течение 2 ч происходит усиление гемолиза эритроцитов: в условиях гипосмотической среды (0,45%) наблюдается усиление гемолиза в 1,7 раза, а в присутствии экзогенной  $H_2O_2$  – в 1,96 раза, что может характеризовать данный препарат как вещество с выраженными гемолитическими свойствами. Показано, что цефтриаксон в концентрации 250 мкг/мл существенно (на 18,5%) увеличивает способность эритроцитов к сорбированию витального красителя альцианового синего.

**Ключевые слова:** эритроциты, гемолиз, сорбционная емкость, цефтриаксон.

**DOI:** 10.33743/2308-1066-2020-2-35-37

В настоящее время исследователями активно обсуждаются возможные механизмы взаимодействия клеток макроорганизма с антибиотиками различных классов. Это обусловлено тем, что многолетние исследования в области антибиотикотерапии указывают на проявление антибиотиками как лечебного, так и побочного действия. Отечественными и зарубежными учеными показано, что физико-химические взаимодействия антибиотиков с клетками микро- и макроорганизмов сложны и не ограничиваются прямым антимикробным действием препаратов. Имеются данные о влиянии антибиотиков на фагоцитарную активность макрофагов, агрегационные свойства тромбоцитов, структурно-функциональные свойства эритроцитов [2–4, 10, 12, 13].

Цефтриаксон (ЦТ) является антибиотиком группы цефалоспоринов III поколения, при внутримышечном или внутривенном введении длительно сохраняется в организме и хорошо проникает в органы. Однако применение ЦТ имеет побочные действия и может вызывать аллергические реакции, изменение формулы крови, нарушение функции печени и почек, что может привести к нежелательным последствиям.

Изменение проницаемости мембран эритроцитов человека для молекул антибиотиков может служить критерием функционирования мембран в организме. Учитывая важность структурной целостности клеток, исследование механизмов взаимодействия

ЦТ с эритроцитами позволит более точно оценить степень его влияния на организм человека для прогнозирования и минимизации нежелательных реакций.

**Цель работы** – изучить морфофункциональное состояние эритроцитов доноров, модифицированных ЦТ в терапевтической концентрации.

## Материалы и методы исследования

Исследование влияния ЦТ на гемолиз и сорбционную способность эритроцитов *in vitro* проводили на образцах крови 10 практически здоровых доноров.

**Ход эксперимента.** Пробы крови, стабилизированные 0,109 М раствором трехзамещенного лимоннокислого натрия, инкубировали в присутствии ЦТ в концентрации 250 мкг/мл в течение 2 ч при температуре 37 °С (опытные пробы). Расчет дозы препарата проводили эмпирически с учетом разовой дозы при лечении пациента. Интактные пробы (контрольные) готовились аналогично, но без добавления ЦТ. Затем эритроциты отделяли от плазмы и других форменных элементов путем центрифугирования в течение 10 мин (1 000 г) и дважды отмывали охлажденным 0,89% раствором NaCl.

Резистентность эритроцитов к действию перекиси водорода определяли по методу С.С. Михайлова и соавт. [8]. Метод определения перекисного гемолиза эритроцитов проводили следующим образом: в суспензию эритроцитов добавляли 0,1 мл 2,2% раствора перекиси водорода, пробы

инкубировали в течение 10 мин при температуре 37 °С при постоянном встряхивании. О степени гемолиза судили по оптической плотности  $E_{536}$ , которая непосредственно отображает концентрацию гемоглобина. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-46.

Для определения степени осмотического гемолиза предварительно готовили гипоосмотический раствор хлорида натрия 0,45%. К 1 мл рабочего раствора добавляли 100 мкл суспензии эритроцитов (гематокрит 20%). Пробы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем центрифугировали при 3 000 об./мин в течение 3 мин. Степень гемолиза оценивали по оптической плотности жидкости, полученной после осаждения негемолизированных эритроцитов, и выражали в процентах относительно оптической плотности образцов, в которых гемолиз эритроцитов был вызван дистиллированной водой (100% гемолиз) [7]. Осмотический гемолиз эритроцитов регистрировали на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 536 нм.

Сорбционную емкость гликокаликса эритроцитов к витальному красителю альциановому синему (СЕГАС) определяли с помощью метода прижизненного количественного окрашивания эритроцитов [1]. Суспензию эритроцитов  $4 \times 10^7$  кл./мл дважды отмытых от плазмы в 40 объемах 0,89% раствора NaCl (1 000 об./мин, 10 мин) смешивали с равным объемом физиологического раствора, содержащего 0,005% альцианового синего, 10 мин инкубировали при температуре 21 °С и снова центрифугировали при тех же условиях. Количество АС в растворе до и после окрашивания клеток (соответственно,  $C_0$  и  $C$ ) определяли по оптической плотности, измеренной на спектрофотометре СФ-46; при длине волны 617 нм. Расчет количества АС, сорбированного суспензией эритроцитов ( $Q_1$ ), проводили по формуле:

$$Q = 100 - (C \times 100) / V,$$

где  $Q$  – количество красителя, сорбированного эритроцитами (%);

$V$  – оптическая плотность раствора красителя (у. е.);

$C$  – оптическая плотность надосадочной жидкости (у. е.).

В контроле к АС добавляли физиологический раствор, не содержащий клеток. Использовали АС фирмы Loba chemie (Австрия).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием стандартных пакетов программ Microsoft Excel. Вычисляли средние арифметические ( $M$ ) и их стандартные ошибки ( $m$ ). Существенность различий средних величин оценивали с использованием непараметрических критериев [5].

## Результаты и их обсуждение

Изучение изменения осмотической стойкости эритроцитов под действием ЦТ показало, что в результате

инкубации крови с препаратом наблюдается усиление гемолиза эритроцитов (интактные пробы –  $(6,24 \pm 0,25)\%$ ; опытные –  $(10,39 \pm 0,84)\%$ ;  $p < 0,05$ ; см. таблицу).

Согласно литературным данным, инкубирование эритроцитов в гипоосмотической среде делает их чувствительными к действию эндогенных факторов и способствует связыванию ЦТ с мембранами эритроцитов. В работах Юсифова З.А. и соавт. было доказано, что при инкубации ЦТ с теньями эритроцитов связывается до 70% препарата [9, 11], поэтому можно предположить, что усиление осмотического гемолиза эритроцитов в 0,45% растворе NaCl вызвано связыванием ЦТ с эритроцитарной мембраной.

В ходе эксперимента также было установлено, что под действием данного антибиотика значительно увеличивается уровень перекисного гемолиза эритроцитов (интактные пробы –  $(6,13 \pm 0,26)\%$ ; опытные –  $(12,07 \pm 0,61)\%$ ;  $p < 0,05$ ). Возможно, что дестабилизация мембран эритроцитов под действием ЦТ связана не только с встраиванием препарата в мембрану, но и, как следствие, с активацией окислительных процессов в клетке.

Известно, что гликокаликс принимает участие в процессах обмена клетки с внешней средой и в сохранении структурно-функциональных свойств мембраны. Поэтому следующим этапом эксперимента было изучение *in vitro* влияния ЦТ на СЕГАС.

АС – это витальный краситель, который способен связываться с гликолипидами, гликопротеидами и кислыми мукополисахаридами. В малой концентрации (в данном случае 0,005% раствор красителя) он не повреждает клетки, не проникает в цитоплазму и сорбируется гликокаликсом клетки в количестве, пропорциональном содержанию в нем белков и углеводов.

Установлено, что среднее значение СЕГАС эритроцитов в интактных пробах составляет  $(45,3 \pm 1,7)\%$ . После инкубации эритроцитов с ЦТ в опытных пробах отмечается достоверное увеличение данного показателя относительно интактных проб  $(53,7 \pm 2,1)\%$  ( $p < 0,05$ ). Полученные данные подтверждают предположение о том, что в условиях *in vitro* инкубация эритроцитов с ЦТ вызывает повреждение клеток препаратом, изменяются их сорбционные свойства – повышается СЕГАС гликокаликсом.

## Выводы

1. При инкубации *in vitro* эритроцитов с ЦТ в концентрации 250 мкг/мл в течение 2 ч происходит усиление гемолиза эритроцитов: в условиях гипоосмотической среды (0,45%) наблюдается усиление гемолиза в 1,7 раза, а в присутствии экзогенной  $H_2O_2$  – в 1,96 раза, что может характеризовать данный препарат как вещество с выраженными гемолитическими свойствами.

2. В эксперименте *in vitro* показано, что ЦТ в концентрации 250 мкг/мл существенно (на 18,5%) увеличивает СЕГАС.

Таблица. Показатели осмотического, перекисного гемолиза и сорбционной емкости эритроцитов до и после инкубации *in vitro* эритроцитов с ЦТ в концентрации 250 мкг/мл ( $M \pm m$ )

Осмотический гемолиз, %		Перекисный гемолиз, %		СЕГАС, %	
Интактные пробы	Опытные пробы	Интактные пробы	Опытные пробы	Интактные пробы	Опытные пробы
$6,24 \pm 0,25$	$10,39 \pm 0,84^*$	$6,13 \pm 0,26$	$12,07 \pm 0,61^*$	$45,3 \pm 1,7$	$53,7 \pm 2,1^*$

Примечание: \*  $p < 0,05$  дано относительно интактных проб.

Список литературы

1. Арцишевская Р.А., Самоилова К.А. Функциональные и структурные изменения поверхности эритроцитов человека после облучения УФ лучами разной длины волны. Цитология. 1983. Т. 25. № 12. С. 1387–1392.
2. Баева Е.С., Резван С.Г., Артюхов В.Г. Влияние антибактериальных препаратов на осмотическую резистентность эритроцитов человека. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. Т. 76. № 12. С. 20–23.
3. Баева Е.С., Артюхов В.Г. Пути реализации неантибактериальных эффектов антибиотиков, широко применяемых в клинической практике. Антибиотики и химиотерапия. 2019. Т. 64. С. 72–80.
4. Калашникова И.В. Механизмы взаимодействия антибиотиков пенициллинового ряда с эритроцитами человека. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 10. С. 419–423.
5. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. К.: Морин, 2000. 320 с.
6. Медицинские лабораторные технологии. Справочник в 2-х томах / Под редакцией профессора А.И. Карпищенко. С-Пб.: Интермедика, 2002. Т. 1. 408 с.
7. Оценка мембраностабилизирующего действия липосом с различными антиоксидантными препаратами на модели осмотического гемолиза / Р.А. Мухамадияров, Е.В. Кривая, М.А. Круч, М.Б. Плотноков. Современные проблемы науки и образования. 2012. № 4. Пат. 2134420, RU, МПК G01N33/50. Способ определения перекисной резистентности эритроцитов / С.С. Михайлов, Л.А. Романчук, Э.А. Фактор; заявитель и патентообладатель Санкт-Петербургская государственная академия физической культуры им. П.Ф. Лесгафта. № 97105596/14; заявл. 09.04.97; опубл. 10.08.99.
8. Фармакокинетика цефтриаксона, депонированного в аутоклетки крови, при внутривенном введении кроликам с моделью очаговой хирургической инфекции / З.А. Юсифов, С.В. Лохвицкий, А.Е. Гуляев, С.К. Жаугашева, М.А. Сорокина, Д.Н. Матюшко. Медицина и экология. 2017. № 1. С. 123–131.
9. Экстракорпоральное насыщение форменных элементов крови антибиотиками для направленного транспорта / О.В. Золотухин, В.В. Кузьменко, В.Н. Золотухина, Ю.А. Аносова, Ю.Ю. Пивоварова. Вестник Воронеж. ун-та. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2009. № 1. С. 62–66.
10. Юсифов З.А., Лохвицкий С.В., Гуляев А.Е. Особенности фармакокинетики антибиотика цефтриаксон при внутривенном введении препарата, депонированного в аутологичных эритроцитах и лейкоцитах кролика. Georgian Medical News. 2016. № 11(260). С. 74–79.
11. Ceftriaxone induced hemolysis complicated by acute renal failure / G. Kapur, R.P. Valentini, T.K. Mattoo [et al.]. Pediatric blood and cancer. 2008. Vol. 50. P. 139–142.
12. Hackl E.V., Berest V.P., Gatash S.V. Interaction of polypeptide antibiotic gramicidin S with platelets. Journal of Peptide Science. 2012. Vol. 18. Issue 12. P. 748–754.

References

1. Artsyshevskaia RA, SamoiloVA KA. Funktsionalnye y strukturnye yzmeneniya poverkhnosti erytrocytov cheloveka posle oblučenja UF luchamy raznoy dlyny volny (Functional and Structural Changes in the Surface of Human Erythrocytes After UV Irradiation With Rays of Various Wavelengths). Tsytolohiya. 1983;25;12:1387–1392.
2. Baeva ES, Rezzan SG, Artyuhov VG. Vliyeniye antibakterial'nykh preparatov na osmoticheskuyu rezistentnost' erytrocytov cheloveka (The effect of antibacterial drugs on the osmotic resistance of human erythrocytes). Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2013;76;12: 20–23.
3. Baeva ES, Artyuhov VG. Puti realizacii neantibakterial'nykh effektivov antibiotikov, shiroko primenyayemykh v klinicheskoy praktike (Ways of realizing the non-antibacterial effects of antibiotics that are widely used in clinical practice). Antibiotiki i himioterapiya. 2019;64:72–80.
4. Kalashnikova IV. Mekhanizmy vzaimodejstviya antibiotikov penicillinovogo ryada s erytrocitami cheloveka (Mechanisms of interaction of penicillin antibiotics with human erythrocytes). Byul. eksperim. biologii i medicyny. 2008;146;10:419–423.
5. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniem EXCEL (Statistical methods in biomedical research using EXCEL). K.: Morion, 2000. 320 p.
6. Medicinskie laboratornye tekhnologii. Spravochnik v 2-h tomah (Medical laboratory technology. Reference in 2 volumes). Pod redakciej professora A.I. Karpishchenko. Sankt-Peterburg: Intermedika, 2002;1. 408 p.
7. Muhamadiyarov RA, Krivaya EV, Kruch MA, Plotnikov MB. Ocenka membranstabiliziruyushchego dejstviya liposom s razlichnyimi antioksidantnymi preparatami na modeli osmoticheskogo gemoliza (The evaluation of membrane-stabilizing effect of liposomes with different antioxidant drugs in osmotic hemolysis model). Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2012;4.
8. Yusifov ZA, Lohvickij SV, Gulyaev AE. Osobennosti farmakokinetiki antibiotika ceftriakson pri vnutrivennom vedenii preparata, depoinirovannogo v autologichnykh erytrocytah i lejkcocytah krolika (The features of pharmacokinetics antibiotic ceftriaxone with intravenous way that are deposited in autologous erythrocytes and leukocytes of rabbit). Georgian Medical News. 2016;11(260):74–79.
9. Pat. 2134420, RU, МПК G01N33/50. Sposob opredeleniya perekisnoj rezistentnosti erytrocytov (The method for determining the peroxide resistance of red blood cells). SS Mihajlov, LA Romanchuk, EA Faktor; zayavitel' i patentoobladatel' Sankt-Peterburgskaya gosudarstvennaya akademiya fizicheskoy kul'tury im. P.F. Lesgafa. № 97105596/14; zayavl. 09.04.97; opubl. 10.08.99.
10. Farmakokinetika ceftriaksona, depoinirovannogo v autokletki krovi, pri vnutrivennom vedenii krolikam s model'yu ochagovoy hirurgicheskoy infekcii (Pharmacokinetics of ceftriaxone deposited into blood outcells at intravenous introduction to rabbits with model of focal surgical infection). ZA Yusifov, SV Lohvickij, AE Gulyaev, SK Zhaugasheva, MA Sorokina, DN Matyushko. Med i ekol. 2017;1:123–131
11. Ekstrakorporal'noe насыщение formennykh elementov krovi antibiotikami dlya napravlennoho transporta (Extracorporeal saturation of blood cells with antibiotics for targeted transport). OV Zolotuhin, VV Kuz'menko, VN Zolotuhina, YuA Anosova, YuYu Pivovarova. Vestnik Voronezh, un-ta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2009;1:62–66.
12. Kapur G, Valentini RP, Mattoo TK, et al. Ceftriaxone induced hemolysis complicated by acute renal failure. Pediatric blood and cancer. 2008;50:139–142.
13. Hackl EV, Berest VP, Gatash SV. Interaction of polypeptide antibiotic gramicidin S with platelets. Journal of Peptide Science. 2012;18;12:748–754.

ВПЛИВ ЦЕФТРИАКСОНУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕРИТРОЦИТІВ ДОНОРІВ

Г.К. Кондакова, Г.О. Семко, О.В. Левицька, В.М. Цимбал  
ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

Резюме

**Мета** – вивчити морфологічний стан еритроцитів донорів, що були модифіковані цефтриаксоном у терапевтичній концентрації.  
**Матеріали та методи.** Дослідження *in vitro* впливу цефтриаксону на осмотичний, перекисний гемоліз та сорбційну ємність еритроцитів проводили на пробах крові 10 практично здорових донорів. Проби крові, стабілізовані 0, 109 М розчином трьохзамісного лимоннокислого натрію, інкубували в присутності цефтриаксону в концентрації 250 мкг/мл упродовж 2 год за температури 37 °С (дослідні проби). Інтактні проби (контрольні) готували аналогічно, але без додавання цефтриаксону.  
**Результати та висновки.** При інкубації *in vitro* еритроцитів з цефтриаксоном у концентрації 250 мкг/мл упродовж 2 год відбувається посилення гемолізу еритроцитів: в умовах гіпоосмотичного середовища (0,45%) спостерігається посилення гемолізу в 1,7 раза, а в присутності екзогенного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – в 1,96 раза, що може характеризувати препарат як речовину з вираженими гемолітичними властивостями. Показано, що цефтриаксон у концентрації 250 мкг/мл суттєво (на 18,5%) збільшує здатність еритроцитів до сорбування вітального барвника альціанового синього.  
**Ключові слова:** еритроцити, гемоліз, сорбційна ємність, цефтриаксон.

CEFTRIAXONE EFFECT ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF DONOR ERYTHROCYTES

A.K. Kondakova, G.A. Semko, E.V. Levytskaya, V.N. Tsybal  
SE «Institute of Dermatology and Venereology of NAMS of Ukraine»

Abstract

**The objective:** to study the morphological and functional state of donor red blood cells modified with ceftriaxone in therapeutic concentration  
**Materials and methods.** The *in vitro* study of the ceftriaxone effect of on osmotic, peroxide hemolysis, and erythrocyte sorption capacity was conducted on blood samples of 10 practically healthy donors.  
**Blood samples stabilized with a 0.109 M trisodium citrate solution were incubated in the presence of ceftriaxone at a concentration of 250 µg/ml for 2 hours at the temperature of 37 °C (experimental samples). Intact samples (control) were prepared similarly, but without adding ceftriaxone.**  
**Results and conclusions.** During *in vitro* incubation of erythrocytes with ceftriaxone at a concentration of 250 µg/ml for 2 hours, erythrocyte hemolysis was increased: in a hypoosmotic environment (0.45%) hemolysis was increased by 1,7 times, and in the presence of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – by 1,96 times, which can characterize this drug as a substance with hemolytic properties. It was shown that ceftriaxone at a concentration of 250 µg/ml significantly (by 18.5%) increases the ability of red blood cells to sorb the vital dye Alcian Blue.  
**Key words:** red blood cells, hemolysis, sorption capacity, ceftriaxone.

Сведения об авторах:

Кондакова Анна Константиновна – канд. биол. наук, зав. лабораторией биохимии ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7739-1922>

Семко Галина Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9465-224X>

Левицька Елена Вячеславовна – мл. науч. сотр. лаборатории биохимии ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9774-2179>

Цимбал Виктория Николаевна – мл. науч. сотр. лаборатории биохимии ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6673-3835>