

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМЫ ОКСИДАТИВНОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АЗО- И ПЕРОКСИДНОГО ИНИЦИАТОРА

© 2023 г. Е.М. Соколова*, Н.А. Дубенская**, Б.Л. Психа*, Н.И. Нешев*,#

*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, просп. Академика Семенова, 1, Черноголовка Московской области, 142432, Россия

**Факультет фундаментальной физико-химической инженерии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991

#E-mail: neshev@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 06.02.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

В широком диапазоне концентраций изучена кинетика оксидативного гемолиза 0.2%-й суспензии эритроцитов мыши под действием радикалообразующих инициаторов 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида и *трет*-бутилгидропероксида. Гемолиз эритроцитов протекал при активации пероксидного окисления липидов в мембранах эритроцитов. При этом в случае *трет*-бутилгидропероксида оксидативные процессы развивались также и в растворимой части клетки, приводя к образованию нерастворимых агрегатов гемоглобина. Период индукции гемолиза (время достижения 10%-го гемолиза) под действием 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида убывает обратно пропорционально квадратному корню от концентрации инициатора, что согласуется с классической теорией радикально-цепного окисления углеводов. В случае *трет*-бутилгидропероксида данная закономерность не соблюдается. В качестве инициатора пероксидного окисления липидов в эритроцитарной модели тестирования природных и синтетических соединений на антиоксидантную активность предпочтительнее использовать 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, оксидативный гемолиз, пероксидное окисление липидов.

DOI: 10.31857/S0006302923040099, EDN: KLALFM

В рамках широкого исследовательского направления, берущего свое начало с пионерских работ Б.Н. Тарусова и Н.М. Эмануэля в 50-х годах прошлого века и получивших впоследствии широкое развитие в исследованиях Е.Б. Бурлаковой, были заложены представления о фармакологических перспективах природных и синтетических ингибиторов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) – биоантиоксидантов [1]. Поиск и исследование веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, и последующая разработка на их основе фармакологических препаратов до настоящего времени продолжает оставаться одним из базовых направлений химической биологии и медицинской химии. Это обуславливает актуальность и практическую значимость разработки биологических моделей, на которых осуществляется тестирование новых соединений на антиок-

сидантную активность. Широкое распространение получило использование для этой цели модели индуцированного оксидативного гемолиза эритроцитов [2]. В качестве индукторов гемолиза используют известные в химии полимеров азо- и пероксидные инициаторы радикальной полимеризации [3]. При этом механизмы взаимодействия указанных инициаторов с эритроцитом как сложной биологической системой клеточного уровня остаются до конца не изученными, что затрудняет анализ результатов экспериментальных исследований в данной области.

Целью работы было изучение кинетических закономерностей и физико-химических механизмов оксидативного гемолиза эритроцитов под действием инициаторов пероксидного окисления липидов, 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида (AAPH), относящегося к классу азосоединений, и *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BuOOH) из класса органических пероксидов.

Сокращения: ПОЛ – пероксидное окисление липидов, AAPH – 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, *t*-BuOOH – *трет*-бутилгидропероксид.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение эритроцитарной массы. В качестве источника крови были использованы мыши линии С 57 В1/6f (возраст 3 месяца, масса 18–20 г), полученные из питомника ФИЦ ПХФ и МХ РАН (Черноголовка Московской обл., Россия). Забор крови проводили от предварительно наркотизированной эфиром мыши посредством ее декапитации. В качестве антикоагулянта использовали 0.11 М раствор цитрата натрия. Кровь собирали в склянку, куда предварительно добавляли раствор цитрата натрия, соблюдая соотношение цитрат/кровь – 1 : 5.

Кровь центрифугировали в течение 7 мин при 1500 g. Плазму декантировали. Осадок эритроцитов осторожно ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl (0.85% NaCl, содержащий 5 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7.4). Центрифугирование повторяли троекратно. После каждого центрифугирования супернатант декантировали, осадок эритроцитов ресуспендировали в новой порции изотонического раствора NaCl. Эритроцитарную массу, полученную после последнего центрифугирования, хранили в холодильнике при 4°C не более суток.

Гемолиз эритроцитов. В гемолитических экспериментах использовали 0.2% (по объему) суспензию эритроцитов в изотоническом растворе NaCl, которую получали путем разбавления эритроцитарной массы непосредственно перед экспериментом. Эксперимент проводили при 37°C в пластиковой кювете объемом 3 мл при непрерывном слабом помешивании. За ходом гемолиза эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензии при длине волны 700 нм. Указанная длина волны была выбрана за пределами основной области электронного поглощения гемоглобина, в связи с чем ослабление светового потока практически полностью связано с рассеянием света на эритроцитах. Высокий уровень разбавления суспензии позволяет радикально уменьшить влияние эффекта многократного внутреннего отражения света на эритроцитах, это позволяет получить взаимосвязь между степенью гемолиза и оптической плотностью суспензии в удовлетворительном линейном приближении, что было продемонстрировано в работе [4]. Степень гемолиза суспензии (γ) определяли из соотношения:

$$\gamma = \frac{D_0 - D}{D_0 - D_{H_2O}},$$

где D_0 и D – оптические плотности контрольного и опытного образца, соответственно. D_{H_2O} – оптическая плотность образца в условиях полного лизиса всех эритроцитов дистиллированной водой. Во всех экспериментах оптическая плот-

ность контрольного образца (D_0) составляла ~0.8, что соответствовало содержанию клеток 0.2% по объему. Экспериментальные значения, характеризующие изменение степени гемолиза во времени, аппроксимировали в программе Origin сигмоидальной функцией Больцмана. В качестве количественной характеристики гемолитической активности инициаторов ПОЛ использовали величину периода индукции гемолиза, которую определяли графически по времени достижения 10% гемолиза.

Определение малонового диальдегида. Пероксидное окисление липидов мембран эритроцитов характеризовали по уровню образования малонового диальдегида по методу, описанному в работе [5], с модификациями. К 2 мл суспензии эритроцитов 1.4%-го гематокрита добавляли 1 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем центрифугировали при 6000 g в течение 30 мин. К 2 мл супернатанта добавляли 0.5 мл раствора 0.8% тиобарбитуровой кислоты в 0.05 М NaOH и инкубировали в течение 20 мин на кипящей водяной бане. После инкубации образцы охлаждали проточной водопроводной водой и определяли оптическую плотность при 532 нм.

Определение нерастворимого гемоглобина. Кинетику образования внутри эритроцитов нерастворимого гемоглобина определяли в предварительно гемолизированных дистиллированной водой аликвотах суспензии эритроцитов по образованию рассеивающей мути при 525 нм – изобестической точке спектров основных молекулярных форм гемоглобина (Hb, HbO₂, MetHb). Содержание нерастворимого гемоглобина (НГ) оценивали по относительному увеличению оптической плотности гемолизата при 525 нм по формуле:

$$НГ = \frac{D - D_0}{D_0} = \frac{\Delta D}{D_0},$$

где D и D_0 – оптические плотности гемолизата опытного и контрольного образца суспензии эритроцитов. Экспериментальные значения $\Delta D/D_0$ аппроксимировали сигмоидной функцией Больцмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ААРН в водной среде (рис. 1) подвергается мономолекулярному разложению с образованием двух алкильных радикалов и выделением молекулярного азота. В кислородной среде алкильные радикалы вступают в быструю реакцию с кислородом с образованием пероксидных радикалов [6, 7]. Последние способны атаковать двойные связи мембранных липидов в биологических субстратах, что приводит к иницированию ПОЛ в мембране. Процесс разложения ААРН протекает с достаточной эффективностью уже при 35–40°C.

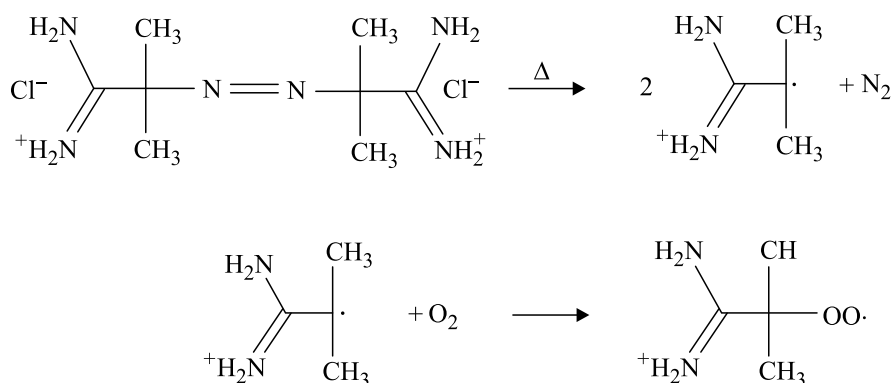


Рис. 1. Схема разложения ААРН в водной среде.

Пероксидный инициатор, *t*-BuOOH, в отличие от ААРН, не способен самопроизвольно распадаться на радикалы при физиологических температурах. Однако благодаря высоколипофильному третбутильному фрагменту *t*-BuOOH легко проникает через плазматическую мембрану внутрь клетки, запуская в ней каскад сложных реакций с каталитическим участием гемоглобина. В ходе этих процессов образуются радикальные продукты, инициирующие оксидативное повреждение клеточных структур [8].

На рис. 2а показаны кинетические кривые гемолиза 0.2%-й суспензии эритроцитов мыши при различных концентрациях ААРН в пределах концентрационного диапазона 10^{-3} – 10^{-2} М. Нижней границей исследованного диапазона концентраций ААРН была концентрация $2 \cdot 10^{-3}$ М. Более низкие концентрации ААРН не исследовались, так как им соответствовали слишком большие периоды индукции гемолиза, пре-

вышающие время стабильности контрольной суспензии эритроцитов. На рис. 2б показана взаимосвязь периода индукции гемолиза с концентрацией ААРН. Если полагать, что гемолиз эритроцита наступает при достижении некоторой пороговой концентрации продуктов ПОЛ в мембране ($[P]_0$) и считать скорость окисления (W_0) постоянной, то значение пороговой концентрации продуктов окисления будет $[P]_0 = W_0 \cdot I_{10}$, откуда $I_{10} = [P]_0 / W_0$. Согласно теории радикально-цепного окисления углеводов в отсутствие антиоксидантов скорость окисления W_0 должна быть пропорциональной корню квадратному из скорости инициирования. С учетом того, что распад ААРН происходит мономолекулярно, скорость окисления можно считать примерно равной концентрации инициатора, то есть $W_0 \sim C^{0.5}$ и, соответственно, $I_{10} \sim C \cdot I_{10} \approx C^{-0.5}$. Таким образом, взаимосвязь между периодом ин-

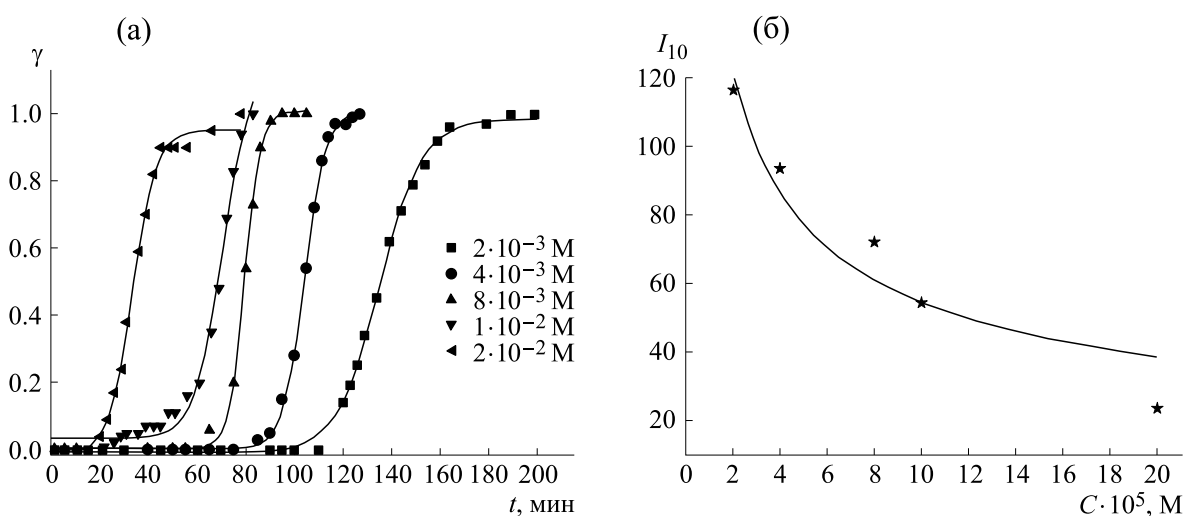


Рис. 2. (а) — Кинетика гемолиза эритроцитов под действием различных концентраций ААРН; (б) — взаимосвязь периода индукции гемолиза с концентрацией ААРН.

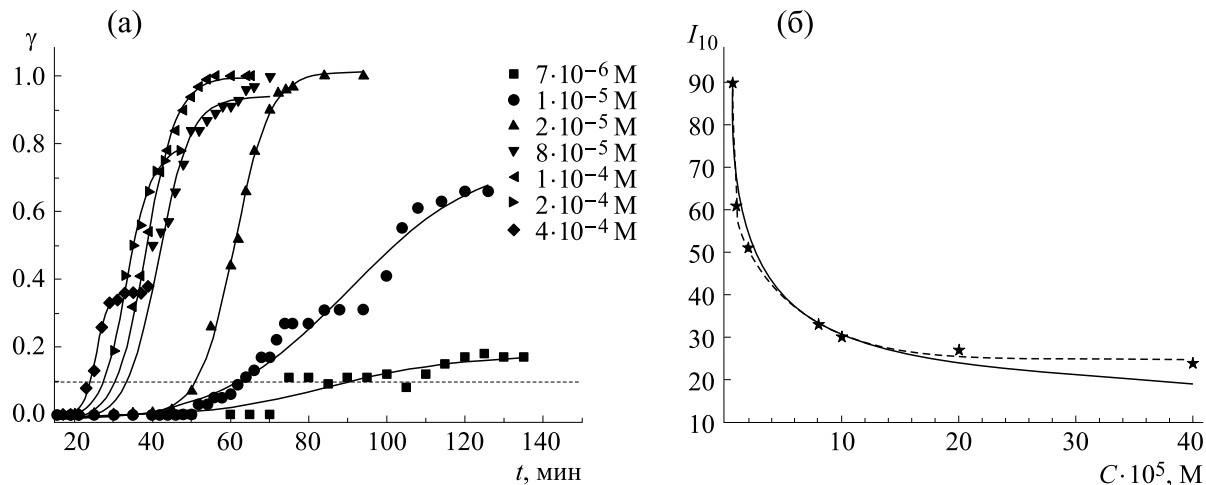


Рис. 3. (а) — Кинетика гемолиза эритроцитов под действием различных концентраций t -BuOOH; (б) — взаимосвязь периода индукции гемолиза с концентрацией t -BuOOH.

дукции гемолиза и концентрацией инициатора должна описываться убывающей степенной функции вида $I_{10} = AC^{-b}$, где $b = -0,5$. Программа Origin дает нам для экспериментальных значений периодов индукции гемолиза на рис. 2, аппроксимирующую кривую, описываемую уравнением $I_{10} = 173 \cdot C^{-0,5}$. Как мы видим, значение показателя степени идеально совпадает с теоретически ожидаемым значением. Таким образом, период индукции гемолиза убывает обратно пропорционально корню квадратному от концентрации ААРН.

На рис. 3а показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов под действием различных концентраций t -BuOOH. Как и в случае с ААРН, гемолитическое действие t -BuOOH является концентрационнозависимым. Аппроксимация экспериментальных значений I_{10} степенной функцией вида $I_{10} = AC^{-b}$ (рис. 3б, сплошная линия) дает значение $b = -0,36$, отклоняющееся от теоретически ожидаемого. Как мы видим, в этом случае убывание периода индукции гемолиза происходит медленнее, приближаясь к обратно пропорциональной зависимости от корня кубического из концентрации инициатора.

В целом сравнение графиков на рис. 2б и 3б выявляет во втором случае характерный тренд к выходу зависимости на плато, что видно по отклонению двух последних точек от аппроксимирующего графика. При этом как раз данным точкам соответствуют кинетические кривые, для которых наблюдалась более ранняя остановка гемолиза, когда часть клеток в системе оставались не разрушенными (рис 3а). Это может прямо указывать на возможное присутствие в системе с t -BuOOH дополнительного фактора, который

тормозит гемолиз. Об этом свидетельствуют также результаты дополнительного анализа экспериментальных результатов на рис. 3б, который формально не связан с теорией радикально-цепного окисления. Значения периодов индукции гемолиза на рис. 3б с высоким приближением (средняя ошибка аппроксимации — 1,44%) удается аппроксимировать биэкспоненциальной функцией

вида $y = A_1 e^{-k_1 C} + A_2 e^{-k_2 C} + y_0$. Результат аппроксимации показан штрихпунктирной линией. Такой характер зависимости может указывать на возможное присутствие в системе двух различных факторов, влияющих на гемолиз.

Хотя в целом окислительные процессы в клетке могут затрагивать различные субстраты и протекать по различным механизмам, их неизменной составляющей является пероксидное окисление липидов мембран. В первую очередь это связано с высокой чувствительностью липидного субстрата к радикальной атаке, а также с цепным самоподдерживающимся характером процесса ПОЛ. Общеизвестным химическим маркером, с помощью которого принято количественно характеризовать уровень ПОЛ в биосубстратах, является образующийся в ходе ПОЛ малоновый диальдегид. Уровень малонового диальдегида оценивали по увеличению оптической плотности при 532 нм. На рис. 4 показан прирост оптического поглощения ΔA_{532} в зависимости от концентрации ААРН (рис. 4а) и t -BuOOH (рис. 4б). Обращает на себя внимание, что ААРН и t -BuOOH действуют в разных концентрационных диапазонах, различающихся примерно на два порядка. При этом в случае с ААРН нарастание уровня малонового диальдегида с ростом концентрации идет практически линейно, тогда как в случае t -BuOOH зависимость быстро выходит на стац-

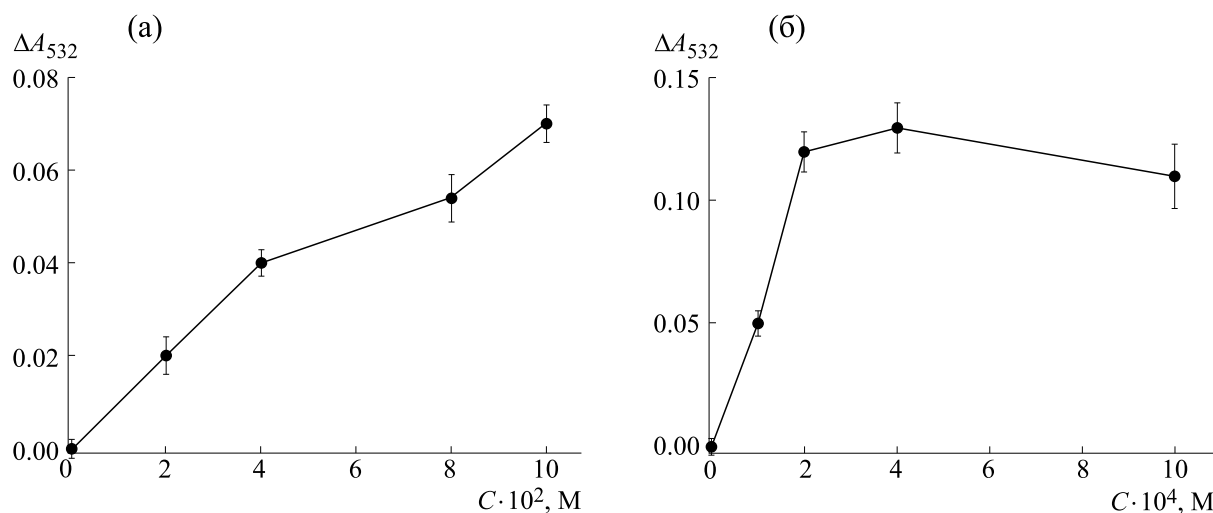


Рис. 4. Образование малонового диальдегида в суспензии эритроцитов под действием ААРН (а) и t -BuOOH (б). Содержание эритроцитов – 1.4 об. %; время инкубации – 30 мин; $t = 37^\circ C$.

онарный уровень. Последнее согласуется с имеющимися литературными данными [8].

В то же время анализ содержимого растворимой части клетки позволил обнаружить существенное различие в действии ААРН и t -BuOOH. На рис. 5 показано относительное увеличение оптической плотности гемолизата эритроцитов при 525 нм с ростом концентрации исследуемых инициаторов. Длина волны в 525 нм является изобеситической точкой для спектров электронного поглощения присутствующих в системе молекулярных форм гемоглобина. По этой причине увеличение оптической плотности в данной области связано с появлением в системе рассеивающих свет агрегатов гемоглобина, о возможности

образования которых свидетельствуют литературные данные [8, 9]. Как видно из рисунка, под действием t -BuOOH в системе наблюдается резкое увеличение рассеивающих свет агрегатов гемоглобина.

Полученные нами результаты показывают, что, хотя оба изученных инициатора способны активировать ПОЛ в мембранах эритроцитов, их гемолитическое действие имеет существенные различия. Как показал проведенный выше анализ, в случае гемолиза эритроцитов под действием ААРН период индукции гемолиза был обратно пропорционален квадратному корню из концентрации ААРН. Это согласуется с положением классической теории радикально-цепного окис-

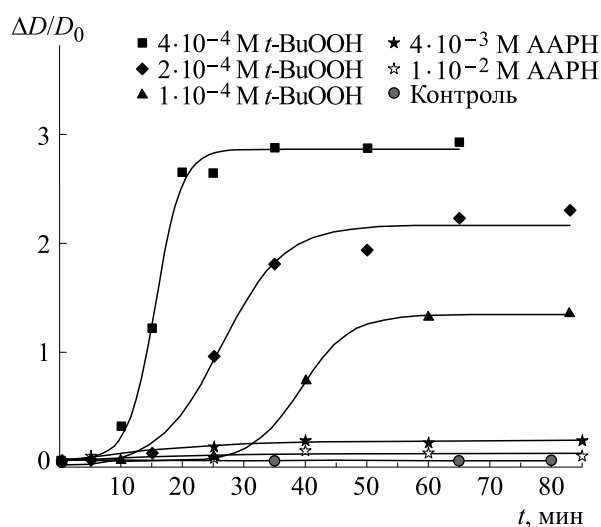
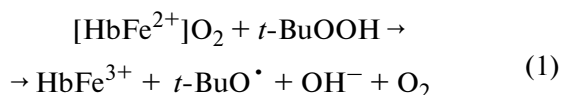


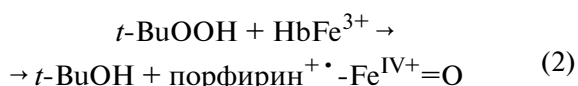
Рис. 5. Образование нерастворимых агрегатов гемоглобина под действием t -BuOOH и ААРН.

ления органических субстратов. Молекулярной основой гемолиза в данном случае является развивающийся в мембране процесс ПОЛ.

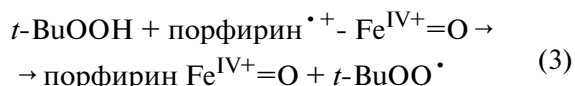
Иначе обстоит дело в случае *t*-BuOOH. Его действие на эритроцит, как свидетельствуют литературные данные, включает ряд различных механизмов [10,11]. Центральной реакцией является взаимодействие *трет*-бутилгидропероксида с двухвалентным железом оксигемоглобина, с образованием алкоксильного радикала и метгемоглобина. Эта реакция аналогична реакции Фентона:



По мере накопления трехвалентного железа на гемоглобине оно может вступать во взаимодействие с новой молекулой *t*-BuOOH:



В этой реакции происходит двухэлектронное восстановление гидропероксида в спирт с образованием высокореакционной формы гемоглобина — оксоферрила (со степенью окисления железа +4). Эта реакция является проявлением пероксидазной активности гемоглобина [12]. Образующаяся в ней структура, катион-радикал оксоферрил-порфирина, аналогична соединению I в классическом цикле пероксидазы. Помимо сверхокисленного гемового железа она имеет неспаренный электрон на периферии порфиринового цикла. Помимо запуска цепного процесса ПОЛ липидов, эта реакционноспособная молекула может отрывать водород от второй молекулы *t*-BuOOH с образованием пероксидного радикала:



Таким образом, в системе образуются по крайней мере два типа радикалов, происходящих из *трет*-бутилгидропероксида: алкоксильный радикал — *t*-BuO• (1) и пероксидный радикал — *t*-BuOO• (3), которые способны индуцировать ПОЛ в мембране. Плюс к этому образуется катион-радикал оксоферрил-порфирина (2), который способен сам по себе индуцировать ПОЛ [13]. Последний способен также к окислительному взаимодействию с полипептидными цепями соседних молекул гемоглобина, в результате которого неспаренный электрон переходит с порфиринового цикла на боковые фрагменты аминокислот, приводя к образованию долгоживущих радикалов на полипептидных цепях гемоглобина, регистрируемых методом ЭПР [14]. Можно ожидать, что результатом рекомбинации этих радикалов может быть возникновение сшивок между со-

седними молекулами гемоглобина с образованием нерастворимых агрегатов, которые мы наблюдаем в эксперименте. Снижающаяся при этом концентрация растворимого гемоглобина может приводить к уменьшению осмотического давления внутри клетки, что будет снижать скорость поступления воды в клетку. Последнее может быть причиной наблюдаемого в наших экспериментах торможения процесса гемолиза.

Полученные в данной работе результаты согласуются с представлением, что в случае с ААРН основной радикальной формой является образующийся при разложении ААРН в водной среде пероксидный радикал, который атакует клетку снаружи. При этом развивающийся процесс ПОЛ ограничивается областью эритроцитарной мембраны. В то же время под действием *t*-BuOOH, помимо процесса ПОЛ в мембране, окислительные процессы развиваются также в растворимой части клетки. Это не кажется удивительным, так как сам процесс образования радикальных форм связан с гемоглобином, т. е. происходит внутри клетки. В соответствии с этим чисто физическая очередность взаимодействия радикалов с субстратами в эритроците оказывается обратной: вначале модификации подвергается внутриклеточное содержимое и только вслед за этим наступает очередь мембраны. Это делает систему более сложной. Так, в случае с *t*-BuOOH снижение концентрации растворимого гемоглобина приводит к появлению дополнительного фактора, влияющего на осмотическое равновесие клетки, что приводит к торможению процесса гемолиза. В связи с этим ААРН выглядит более предпочтительно в качестве инициатора ПОЛ в эритроцитарной модели тестирования природных и синтетических соединений на антиоксидантную активность.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (Регистрационный № АААА-А19-119071890015-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. Б. Бурлакова, Успехи химии, **44** (10), 1871 (1975).

2. О. Г. Шевченко и Л. Н. Шишкина, Успехи соврем. биологии, **134** (2), 133 (2014).
3. Ю. Д. Семчиков, *Высокомолекулярные соединения* (Издательский центр «Академия», М., 2010).
4. J. D. Young, L. G. Leong, M. A. DiNome, and Z. A. Cohn, *Anal. Biochem.*, **154** (2), 649 (1986).
5. J. Stocks and T. L. Dormandy, *Br. J. Haematol.*, **20**, 95 (1971).
6. R. U. R. Wahl, L. Zeng, S. A. Madison, et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2009 (1998).
7. C. López-Alarcón, E. Fuentes-Lemus, J. D. Figueroa, et al., *Free Rad. Biol. Med.*, **160**, 78 (2020).
8. B. Deuticke, K. B. Heller, and C. W. Haest, *Biochim. Biophys Acta*, **854**, 169 (1986).
9. R. J. Trotta, S. G. Sullivan, and A. Stern, *Biochem. J.*, **204**, 405 (1982).
10. А. В. Доманский, Е. А. Лапшина, И. Б. Заводник, *Биохимия*, **70** (7), 922 (2005).
11. J. Van der Zee, D. P. Barr, and R. P. Mason, *Free Radic. Biol. Med.*, **20** (2), 199 (1996).
12. A. I. Alayash and M. T. Wilson, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 910795 (2022).
13. О. В. Космачевская и А. Ф. Топунов, *Прикл. биох. микробиол.*, **45** (6), 627 (2009).
14. D. A. Svistunenko, R. P. Patel, S. V. Voloshchenko, and M. T. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **272** (11), 7114 (1997).

Kinetics and Mechanisms of Oxidative Hemolysis of Erythrocytes in the Presence of Azo- and Peroxide Initiator

E.M. Sokolova*, N.A. Dubenskaia**, B.L. Psikha*, and N.I. Neshev*

*Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

**Faculty of Fundamental Physical and Chemical Engineering, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119991 Russia

The kinetics of oxidative hemolysis of a 0.2% suspension of mouse erythrocytes in the presence of radical-forming initiators, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride and *tert*-butyl hydroperoxide, was studied over a wide range of concentrations. Hemolysis of erythrocytes proceeded with the activation of lipid peroxidation in erythrocyte membranes. In the case of *tert*-butyl hydroperoxide, oxidative processes also developed in the soluble part of the cell, leading to the formation of insoluble hemoglobin aggregates. An induction period of hemolysis (the time period required to reach 10% hemolysis) in the presence of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride decreases inversely proportional to the square root of the initiator concentration, that is in accord with the classical theory of radical chain oxidation of hydrocarbons. In the case of *tert*-butyl hydroperoxide, this association was not found. The use of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride as a lipid peroxidation initiator is preferred in the erythrocyte model for testing natural and synthetic compounds for antioxidant activity.

Keywords: erythrocytes, hemoglobin, oxidative hemolysis, lipid peroxidation