

УДК 577.352

Г. П. ЗУБРИЦКАЯ, Л. М. ЛУКЪЯНЕНКО, Е. И. ВЕНСКАЯ,
член-корреспондент Е. И. СЛОБОЖАНИНА

ИНДУЦИРОВАННАЯ АМИЛОИДАМИ МОДИФИКАЦИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА. ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

Поступило 04.08.2014

Введение. Последнее десятилетие наблюдается повышение интереса к изучению структурных и токсических свойств амилоидных фибрилл, участвующих в патогенезе и развитии нейродегенеративных заболеваний. Это обусловлено тем, что число случаев таких заболеваний в возрастной группе 55–75 лет удваивается каждые 5 лет [1].

Известно, что при заболеваниях Паркинсона, Альцгеймера и Гентингтона, сосудистых деменциях, множественной системной атрофии и других заболеваниях амилоидные пептиды в значительных количествах накапливаются в сосудах мозга, вызывая окислительный стресс, повреждение эндотелия капилляров, снижение скорости кровотока и снабжения мозга глюкозой и кислородом [2]. Амилоидные отложения тормозят передачу импульсов между нейронами, что в итоге приводит к поражению нервной системы и развитию деменции. Предполагается, что взаимодействие амилоидных фибрилл с липидным бислоем мембран и запускает окислительный стресс, который приводит к разрушению клеточной мембраны [3]. Попадая в кровь, амилоиды могут влиять на клетки, в том числе и на эритроциты. Считается, что в разрушение амилоидами эритроцитарных мембран может быть вовлечено экспонирование внутренних гидрофобных участков и повышенный уровень дисульфидов, доступных для них. Однако вопросы о механизмах действия амилоидов на эритроциты недостаточно изучены.

Нами ранее в экспериментах *in vitro* обнаружено снижение уровня ТБК-активных продуктов в эритроцитах человека, преинкубированных с амилоидами [4].

Цель исследования – выяснение вопроса о состоянии антиоксидантной системы в модифицированных амилоидами эритроцитах и о влиянии антиоксидантов на степень модификации мембран эритроцитов при воздействии на них амилоидных олигомеров.

Материалы и методы исследования. Амилоидные структуры были получены из лизоцима куриного яйца путем выдерживания его в 10 мМ HCl при 65 °С в течение 7 сут. при постоянном перемешивании [5]. Контроль за процессом образования амилоидов из лизоцима осуществляли ежедневно флуоресцентным методом с использованием тиофлавина Т [6]. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования образцов крови (1500 g, 5 мин) и последующего отмывания в изотоническом растворе NaCl. Отмытые эритроциты помещали в среды, содержащие амилоидные структуры в присутствии и без антиоксидантов, и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С. Затем из них выделяли мембраны (тени эритроцитов) по методу Доджа и сотр. Концентрацию белка в тенях эритроцитов измеряли по методу [7]. Оценку состояния липидного бислоя мембран эритроцитов осуществляли по параметрам флуоресценции липофильных зондов – 1-(4-триметиламмоний-фенил)-6-фенил-1,3,5-гексатриена (ТМА-ДФГ) и 6-додеканол-2-диметиламинонафтадена (лаурдана), встроенных в изолированные мембраны эритроцитов, как в работе [4]. Активность глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах определяли спектрофотометрически по методам, описанным ранее [8]. Уровень образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах определяли по ТБК-тесту.

Флуориметрические измерения проведены на люминесцентном спектрофотометре CM2203 (Солар, Беларусь), спектрофотометрические – на спектрофотометре Specord M-40 (Германия).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием параметрического критерия Стьюдента [9].

Результаты и их обсуждение. Ранее нами показано, что амилоидные структуры, полученные из лизоцима куриного яйца, взаимодействуя с эритроцитами человека *in vitro*, модифицируют физическое состояние липидного бислоя мембран, не индуцируя в клетках генерацию активных форм кислорода [4].

Наиболее важным фактором в оксигенации является способность эритроцитов к переносу кислорода, которая, в свою очередь, зависит от энергетического и антиоксидантного статуса эритроцитов. Поскольку эритроциты находятся в постоянном контакте с амилоидными пептидами, локализованными в сосудах мозга, мы предположили, что такое взаимодействие может приводить к изменению метаболизма и антиоксидантного статуса клеток. В литературе описаны изменения в антиоксидантной системе эритроцита, в ее ферментативной части и системе глутатиона, изменения в метаболизме клеток и структуре мембраны при действии коммерческого амилоидного A β 25-35 пептида [10; 11]. Авторами показано, что активность глутатион пероксидазы в эритроцитах при их инкубации с A β 25-35 пептидом в среде, содержащей глюкозу, не меняется в течение всего периода инкубации, но достоверно снижается к концу инкубационного периода в среде, не содержащей глюкозу. Накопление перекиси водорода в эритроцитах особенно опасно, поскольку под ее воздействием образуется метгемоглобин, неспособный переносить кислород к тканям. Было обнаружено, что концентрация GSH в эритроцитах при их контакте с A β -пептидами быстро уменьшается, и через час в клетках остается около 40 % от необходимого физиологического уровня, что приводит к резкому снижению отношения GSH/GSSG, развитию окислительного стресса, повреждению и преждевременному старению клеток [10; 11].

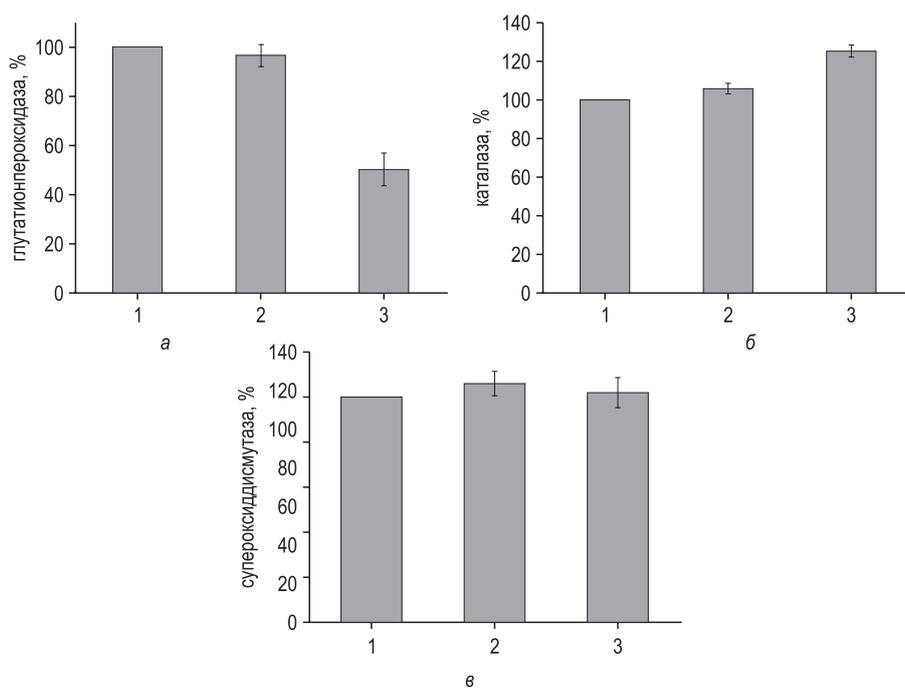
В настоящей работе выявлено, что в эритроцитах, обработанных амилоидными олигомерами в течение 3 ч при 37 °С, происходит снижение активности глутатионпероксидазы (рисунок, а), повышение активности каталазы (рисунок, б), по сравнению с клетками, предварительно проинкубированными то же время с раствором лизоцима. Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах, обработанных олигомерами, практически не изменялась по сравнению с клетками, предварительно проинкубированными с лизоцимом (рисунок, в). Уровень ТБК-продуктов в эритроцитах, проинкубированных 3 ч при 37 °С, снижался, как и в работе [4] (данные не приведены).

При анализе связи между активностью ферментов антиоксидантной защиты (глутатионпероксидазы и каталазы) и уровнем ТБК-продуктов в эритроцитах, нагруженных амилоидами, показано, что она незначительна. Установлено, что существует обратная связь между активностью супероксиддисмутазы и содержанием ТБК-продуктов в эритроцитах, обработанных амилоидными структурами ($r = -0,82$, $P < 0,05$) по сравнению с эритроцитами, обработанными только лизоцимом ($r = 0,45$).

Для оценки влияния антиоксидантов на степень модификации липидов в мембранах эритроцитов при воздействии на них амилоидных олигомеров в данной работе использованы кверцетин, α -токоферол и липофильные флуоресцентные зонды.

Известно, что кверцетин относится к группе растительных флавоноидов, обладает высокой антирадикальной и антиокислительной активностью [12; 13] и может эффективно поступать в эритроциты путем пассивной диффузии [14]. Так как он является хорошим субстратом трансмембранной оксидоредуктазы эритроцитов [15], осуществляющей перенос электронов от внутриклеточных доноров на внешние акцепторы, то способствует увеличению восстановительного потенциала эритроцитов, а эритроциты могут служить важным компонентом, обеспечивающим транспорт кверцетина в кровотоке. Иначе говоря, эритроциты могут выступать естественным резервуаром флавоноидов [15].

Обнаружено, что предварительная инкубация эритроцитов человека в среде, содержащей 10^{-5} М кверцетина, а затем последующее выдерживание клеток с амилоидными структурами в течение 3 ч при 37 °С увеличивали изменения параметров флуоресценции липофильных зон-



Средние значения активности глютационпероксидазы (а), каталазы (б) и супероксиддисмутазы (в) в эритроцитах человека до и после инкубации их с лизоцимом и амилоидными олигомерами: 1 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl (контроль); 2 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl, содержащем 10 мг/мл лизоцима; 3 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl, содержащем амилоидные структуры из лизоцима (10 мг/мл). За 100 % принято среднее значение активности фермента, характерное для нативных эритроцитов

дов, включенных в мембраны эритроцитов, вызванных только влиянием амилоидов – генерализованной поляризации флуоресценции лаурдана и поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ (таблица). Результаты экспериментов с другим антиоксидантом – α -токоферолом показали, что в эритроцитах, предварительно проинкубированных с 500 мкМ α -токоферола, а затем подвергшихся влиянию амилоидных структур в течение 3 ч при 37 °С, происходит также увеличение поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ (но не лаурдана) по сравнению с клетками, предварительно проинкубированными то же время только с амилоидными структурами (таблица). Полученные данные свидетельствуют об увеличении изменения микровязкости липидов в мембранах эритроцитов после совместного воздействия на клетки амилоидов и антиоксидантов.

Флуоресцентные параметры ТМА-ДФГ и лаурдана, включенных в мембраны, изолированные из эритроцитов после инкубации их в течение 3 ч при 37 °С в различных средах

Серия экспериментов (среда инкубации эритроцитов)	α -токоферол, 500 мкМ		Кверцетин, 10^{-5} М	
	ТМА-ДФГ, P, отн. ед.	Лаурдан, GP, отн. ед.	ТМА-ДФГ, P, отн. ед.	Лаурдан, GP, отн. ед.
Забуференный раствор NaCl, pH 7,4 (контроль)	$0,375 \pm 0,009$	$0,2 \pm 0,0035$	$0,39 \pm 0,009$	$0,17 \pm 0,003$
Забуференный раствор NaCl, pH 7,4 + амилоидные структуры лизоцима (1,4 мМ)	$0,4 \pm 0,007$ $P < 0,05$	$0,18 \pm 0,004$ $P > 0,05$	$0,45 \pm 0,008$ $P < 0,05$	$0,15 \pm 0,005$ $P > 0,05$
Забуференный раствор NaCl pH 7,4 + антиоксиданты и лизоцим (1,4 мМ)	$0,38 \pm 0,0095$ $P > 0,05$	$0,18 \pm 0,0045$ $P > 0,05$	$0,37 \pm 0,008$ $P > 0,05$	$0,19 \pm 0,004$ $P > 0,05$
Забуференный раствор NaCl pH 7,4 + антиоксиданты и амилоидные структуры лизоцима (1,4 мМ)	$0,55 \pm 0,0085$ $P < 0,01$	$0,185 \pm 0,004$ $P > 0,05$	$0,51 \pm 0,009$ $P < 0,01$	$0,22 \pm 0,006$ $P < 0,05$

П р и м е ч а н и е. Данные представлены в виде $X_{cp} \pm S_d$; P – поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ; GP – генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана; P – достоверность различий по сравнению с контролем. В каждой серии использованы эритроциты 6–8 доноров.

Нарушение структурно-функционального состояния мембран эритроцитов, обработанных амилоидами, может быть связано с окислительной деструкцией белков и липидов. Учитывая большую нагрузку белков в мембранах, их окислительная модификация может носить в отличие от перекисидации липидов более избирательный и специфический характер.

Заключение. Таким образом, полученные результаты подтверждают ранее высказанное нами предположение, что амилоидные структуры, взаимодействуя с эритроцитами человека *in vitro*, модифицируют мембрану эритроцитов человека, не вызывая генерацию активных форм кислорода. По-видимому, это происходит за счет того, что общая активность всех ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах человека под воздействием амилоидных олигомеров *in vitro* не претерпевает значительных изменений – незначительно снижается активность глутатионпероксидазы, но повышается активность каталазы, а активность супероксиддисмутазы остается на уровне контрольных эритроцитов.

Судя по поляризации флуоресценции липофильных зондов, степень модификации амилоидами мембран эритроцитов в присутствии антиоксидантов более выражена.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (гранты № Б11К-152 и Б13К-115).

Литература

1. Мальцев А. В., Галзитская О. В. // Биомед. химия. 2010. Т. 56, вып. 6. Р. 624–638.
2. Aliev G. et al. // Neurotox Res. 2003. Vol. 5, N. 7. P. 491–504.
3. Huang B. et al. // Biochemistry. 2009. Vol. 48. P. 5794–5800.
4. Лукьяненко Л. М., Зубрицкая Г. П., Венская Е. И. и др. // Новости мед.-биол. наук. 2013. Т. 7, № 1.
5. Malisauskas M. et al. // The J. of Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 6269–6275.
6. Слуцкая А. И. // Цитология. 2010. Т. 52. С. 955–958.
7. Markwell M. A., Haas S. M., Tolbert N. E. // Analyt. Biochem. 1978. Vol. 8. P. 206–210.
8. Козарезов С. Н., Войтович Т. Н., Зубрицкая Г. П. и др. // Мед. журн. 2009. № 1, вып. 27. С. 61–64.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1999.
10. Косенко Е. А., Соломадин И. Н., Каминский Ю. Г. // Биоорган. химия. 2009. Т. 35, № 2. С. 172–177.
11. Косенко Е. А., Соломадин И. Н., Маров Н. В. и др. // Биоорган. химия. 2008. Т. 34, № 5. С. 654–660.
12. Kandaswami C., Middleton Jr. E. // Adv. Exp. Med. Biol. 1994. Vol. 366. P. 351–376.
13. Костюк В. А., Потапович А. И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск, 2004. – 179 с.
14. Fiorani M. et al. // Free Radic. Res. 2003. Vol. 37, N 12. P. 1331–1338.
15. Fiorani M. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2002. Vol. 32. P. 64–69.

G. P. ZUBRITSKAYA, L. M. LUKYANENKO, E. I. VENSKAYA, E. I. SLOBOZHANINA

petro371@mail.ru

AMYLOID-INDUCED MODIFICATION OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES. INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS

Summary

We studied the antioxidant defense enzyme activity in amyloid- modified human erythrocytes *in vitro*, and the influence of antioxidants on the amyloid-induced modification of erythrocyte membranes. It was shown that a combined action of amyloid structures of lysozyme and tocopherol or quercetin on human erythrocytes *in vitro* enhances membrane lipids microviscosity changes, but the activation of peroxidation process wasn't detected. Most likely it happens because a total antioxidant activity of all antioxidant defense enzymes in human erythrocytes *in vitro* does not change under the influence of amyloid oligomers. The activity of glutathione peroxidase decreases while the catalase activity increases and the superoxide dismutase activity doesn't change as compared to control.