

ГИПООСМОТИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КАРБОНИЛОВ

© 2017 г. В.З. Ланкин, Е.М. Белова, А.К. Тихазе

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15а

E-mail: lankin@cardio.ru

Поступила в редакцию 14.03.16 г.

Низкомолекулярные дикарбонилы, образующиеся при свободнорадикальном окислении полиеновых липидов (малоновый диальдегид) и автоокислении (глиоксаль) или других окислительных превращениях глюкозы (метилглиоксаль), способны модифицировать структуру липид-белковых надмолекулярных комплексов клетки. В работе предпринято исследование изменений структуры эритроцитарных мембран после восемнадцатичасовой экспозиции красных кровяных клеток человека в присутствии различных дикарбониллов. Об изменениях механических свойств мембраны после карбонильной модификации судили по чувствительности эритроцитов к гипоосмотическому гемолизу. Показано, что обработка эритроцитов малоновым диальдегидом увеличивает устойчивость этих клеток к гипоосмотическому гемолизу, в то время как изомер малонового диальдегида – метилглиоксаль, напротив, делает эритроциты более чувствительными к действию гипоосмотической среды. Парадоксально, что гомолог малонового диальдегида глиоксаль вообще не оказывал влияния на гемолиз эритроцитов в гипоосмотических растворах. Полученные данные указывают на возможность разнонаправленного действия близких по строению низкомолекулярных дикарбониллов на структуру и функцию биомембран.

Ключевые слова: малоновый диальдегид, глиоксаль, метилглиоксаль, свободнорадикальное окисление, структура мембран.

Окислительный и карбонильный стрессы играют важную роль в патогенезе атеросклероза и сахарного диабета [1,2]. При гиперлипидемии, сопровождающей развитие атеросклероза, происходит интенсификация свободнорадикального окисления полиеновых липидов с последовательным накоплением первичных продуктов (липогидропероксиды) и вторичных продуктов (α -оксоальдегиды, включая малоновый диальдегид – МДА) [1–3]. При диабетической гипергликемии в процессе автоокисления глюкозы образуется гомолог МДА – глиоксаль, а при гликолитическом окислении этой гексозы накапливается изомер МДА – метилглиоксаль [1–3]. Эти высокореакционноспособные низкомолекулярные альдегиды являются активными формами карбониллов, провоцирующих развитие карбонильного стресса, по аналогии с активными формами кислорода (супероксидный анион-радикал, пероксид водорода и др.), провоцирующих развитие окислительного стресса [1,2]. Альдегидные группы дикарбониллов легко взаимодействуют с аминокислотами биопо-

лимерами и фосфолипидами, вызывая их модификацию, что может сопровождаться изменениями в функционировании ферментов и структурно-функциональными перестройками в биомембранах [4,5]. В частности, ранее нами было показано, что карбонильный стресс при диабете приводит к ингибированию активности эритроцитарных ферментов Cu,Zn-супероксиддисмутазы и Se-содержащей глутатионпероксидазы [4], причем активные формы карбониллов способны вызывать структурно-функциональные нарушения в липопротеидах плазмы крови и в мембранах эндотелиоцитов [5]. Исходя из этого, в настоящей работе исследовали влияние активных форм карбониллов на механическую прочность мембран эритроцитов человека при гипоосмотическом воздействии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Венозную кровь практически здоровых доноров (трое мужчин и три женщины, возраст 26 ± 2 лет) отбирали натошак в вакутейнеры с ЭДТА (из расчета 1 мг/мл) в качестве антиоксиданта и антикоагулянта. Цельную кровь центрифугировали в лабораторной рефрижераторной центрифуге при 800 g в течение 10 мин,

Сокращение: МДА – малоновый диальдегид, ЛНП – липопротеины низкой плотности.

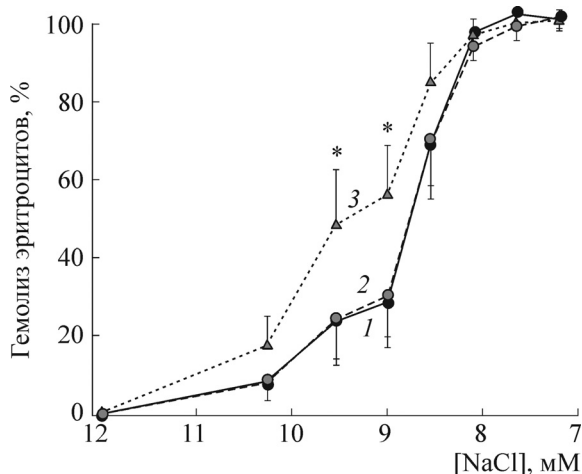


Рис. 1. Влияние глиоксаля (2) и метилглиоксаля (3) на гипоосмотический гемолиз эритроцитов человека; 1 – контроль (без дикарбониллов); * $p > 0,05$.

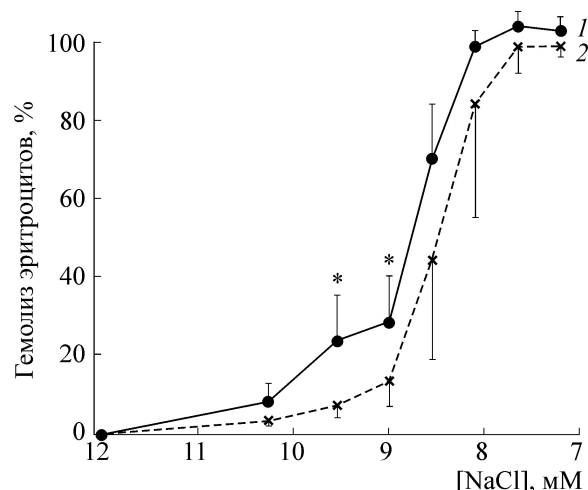


Рис. 2. Влияние малонового диальдегида (2) на гипоосмотический гемолиз эритроцитов человека; 1 – контроль (без дикарбониллов); * $p > 0,05$.

после чего осадок эритроцитов ресуспендировали в том же объеме 0,154 М NaCl и инкубировали при 20°C в изотоническом фосфатно-солевом буфере pH 7,4 в течение 18 ч в присутствии 10 мМ исследуемых дикарбониллов (МДА, глиоксаля или метилглиоксаля) или без добавок (контроль). Затем 50 мкл суспензии эритроцитов добавляли к 950 мкл растворов NaCl различной молярности и инкубировали при 20°C в течение 30 мин. Степень гемолиза эритроцитов оценивали по поглощению гемоглобина при 540 нм на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония) в супернатанте после осаждения клеток [5]. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 методом дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены на рис. 1 и 2. Видно, что инкубация с глиоксалем не оказывает достоверного влияния на лизис эритроцитов даже при использовании растворов с достаточно низкой молярностью NaCl (рис. 1). В то же время инкубация с МДА придает эритроцитам устойчивость к гипоосмотическому гемолизу (рис. 2), а метилглиоксаль, напротив, делает эритроциты более чувствительными к действию гипоосмоса (рис. 1). Тот факт, что МДА способствует увеличению ригидности биомембран и придает клеткам большую жесткость, не является неожиданным. Действительно, ранее подобные результаты были получены нами при исследовании влияния МДА на параметр жесткости (деформируемость) эндотелиоцитов с использованием мето-

да микропипеточной аспирации [5]. Парадоксально, что глиоксаль, который в том исследовании [5], напротив, существенно уменьшал ригидность клеток, в настоящей работе не оказывал какого-либо влияния на механическую прочность мембран эритроцитов при гипоосмотическом воздействии (рис. 1). Тем не менее в наших экспериментах метилглиоксаль – другой дикарбонил, образующий при окислительных превращениях глюкозы – весьма значительно снижал резистентность мембран эритроцитов к осмотическому гемолизу (рис. 2), т.е. оказывал на эритроциты действие, подобное действию глиоксаля на эндотелиоциты [5].

Результаты отдельных исследований по влиянию продуктов свободнорадикального окисления на мембраны эритроцитов *in vivo* достаточно противоречивы. С одной стороны, модификация эритроцитов МДА делает их более ригидными [7], с другой стороны, при диабете (для которого характерно существенное накопление глиоксаля и метилглиоксаля в плазме крови) также отмечено уменьшение резистентности эритроцитов к гемолитическому действию мочевины [8]. Как показано в работе [9], высокомолекулярные флуоресцирующие аддукты [10] при инкубации эритроцитов в присутствии МДА образуются достаточно быстро (в течение 15–45 мин), причем через 6 ч инкубации клеток в присутствии МДА в мембране эритроцитов обнаруживаются первичные продукты свободнорадикального окисления липидов. Тем не менее ранее нами было показано, что по сравнению с внутриклеточными мембранами гепатоцитов мембрана эритроцитов более устойчива к окислению даже столь «аг-

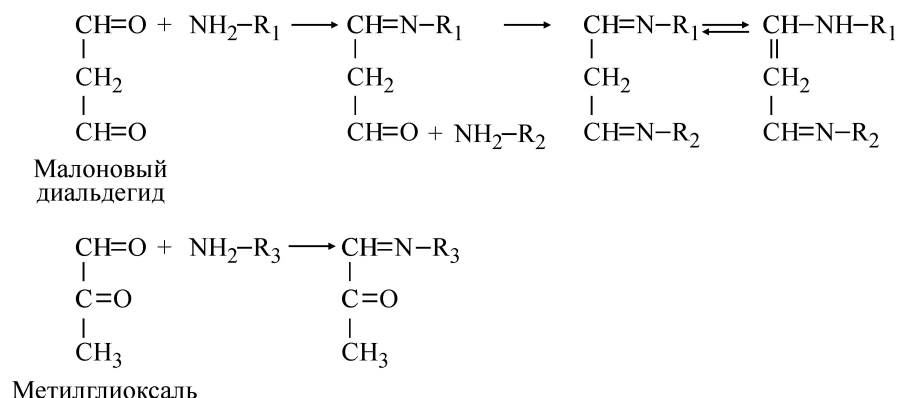


Рис. 3. Схема возможных механизмов модификации структуры биомембран с участием малонового диальдегида и метилглиоксаля. Обозначения: R₁, R₂ и R₃ – концевые аминогруппы мембранных белков или фосфатидилсерина.

рессивным» ферментом как липоксигеназа ретикулоцитов С-15 [11]. Такая резистентность эритроцитарной мембраны вполне оправдана, поскольку именно этот фермент участвует в окислительной элиминации эндогенных мембран ретикулоцита при его трансформации в эритроцит [12]. Исследованные низкомолекулярные дикарбонилы легко диффундируют сквозь эритроцитарную мембрану [4] и способны участвовать в образовании аддуктов с аминокруппами белков и аминоксодержащих фосфолипидов в мембране, приводя к модификации мембранной структуры [2]. Очевидно, что малоновый диальдегид может «сшивать» молекулы мембранных белков или участвовать в образовании «химерных» белок-липидных комплексов в мембране (рис. 3), приводя к увеличению механической прочности мембран МДА-модифицированных клеток (рис. 2). В то же время при взаимодействии метилглиоксаля с мембранными аминоксоединениями кето-группа этого дикарбонила остается свободной, что должно приводить к увеличению общей полярности метилглиоксаль-модифицированной мембраны (рис. 3). Подтверждением такой возможности являются полученные нами ранее данные, указывающие на то, что накопление в липосомальной мембране более полярных, чем неокисленные ацилы, гидроперокси-ацилпроизводных фосфолипидов приводит к существенному уменьшению микровязкости, причем восстановление мембранных ацилгидропероксидов до соответствующих (еще более полярных) спиртов сопровождается еще большим снижением микровязкости липосом [13,14]. По аналогии с описанным процессом карбонильная модификация аминоксоединений в мембране эритроцитов также должна сопровождаться неизбежным увеличением полярности и, как следствие, уменьшением микровязкости, что может влиять на осмотическую рези-

стентность клеток. Очевидно, что меньшая чувствительность к механическому растяжению при гипоосмотическом воздействии у более ригидных МДА-модифицированных эритроцитов вполне объяснима увеличением прочности наружных мембран вследствие образования поперечных сшивок (рис. 3). В то же время уменьшение резистентности к гипоосмосу метилглиоксаль-модифицированных эритроцитов объяснимо повышенной гидратацией их мембран вследствие приобретения ими большей полярности, что должно приводить к «разрыхлению» мембран и снижению их механической прочности (рис. 3).

При сахарном диабете время жизни эритроцитов уменьшено [15], причем при этом заболевании отмечено увеличение содержания метилглиоксаля не только в плазме крови, но и в цитозоле эритроцитов [16], что сопровождается увеличением количества аминоксфосфолипида – фосфатидилсерина, экспонируемого на клеточной поверхности [16–20]. Это приводит либо к ускоренному апоптозу красных кровяных клеток (эритроптозу), либо к связыванию эритроцитов с эндотелием, что создает препятствия нормальной микроциркуляции [16]. Существует, вероятно, и другой механизм деградации модифицированных метилглиоксальем эритроцитов: поскольку макрофаги имеют специфические рецепторы для фосфатидилсерина [21–23], эритроциты с экспонированным на наружной мембране аминоксфосфатидом быстро опознаются, связываются и уничтожаются этими клетками [24,25]. Можно полагать, что экспонирование фосфатидилсерина на клеточной поверхности эритроцитов обусловлено усиленным связыванием аминоксфосфатида с метилглиоксальем, как показано на рис. 3, что приводит к увеличению полярности фосфолипида. В соответствии с этим гликозилирование фосфатидилэтаноламина в частицах липопротеинов низкой плотности

(ЛНП) [26], равно как обработка ЛНП продуктом окислительных превращений глюкозы – метилглиоксалем [27] сопровождаются увеличением окисляемости ЛНП [26,27], вероятно, вследствие «разрыхления» наружного фосфолипидного монослоя [26], что в конечном итоге приводит к захвату окислительно модифицированных частиц ЛНП клетками стенки сосудов и накоплению в них эфиров холестерина из гидрофобного ядра частиц ЛНП [2,3]. Установлено, что неферментативное гликирование (карбонилирование) апобелка ЛНП и аминоксфатидов провоцирует усиленное окисление частиц ЛНП [27–29], причем у больных сахарным диабетом уровень окисленных ЛНП повышен [2,30]. Показано, что гликирование, карбонилирование и перекисное окисление ЛНП способствуют их захвату макрофагами [31,32], причем при взаимодействии метилглиоксала с концевыми аминокислотами апобелка ЛНП возможно, как показано нами [33], генерирование супероксидного анион-радикала, который, в свою очередь, может участвовать в окислении фосфатидилсерина наружного слоя частиц ЛНП, что должно приводить к еще большему увеличению полярности полиеновых ацилов аминоксфатидов и выдвигению их в водную фазу [13,14]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях структуры природных липид-белковых комплексов (биомембран, липопротеидов плазмы крови) при их модификации низкомолекулярными природными дикарбонилами, что может иметь вполне определенное патогенетическое значение.

Авторы считают своим приятным долгом выразить признательность студентке А.В. Неволоиной за помощь в проведении экспериментов и д.б.н. К.Б. Шумаеву за участие в обсуждении работы и ценные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00245).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, В. И. Капелько и др., Биохимия **72** (10), 1081 (2007).
2. V. Z. Lankin, A. K. Tikhaze, G. G. Konovalova, et al. in *Handbook of lipoprotein research*, Ed. by J. E. Rathboun (NOVA Sci.Publish., Inc., NY 2010), pp. 85–107.
3. V. Z. Lankin and A. K. Tikhaze in *Free radicals, nitric oxide, and inflammation: molecular, biochemical, and clinical aspects*, Ed. by A. Tomasi, T. Özben, and V. P. Skulachev (IOS Press, NATO Science Series, Amsterdam etc., 2003), Vol. 344, pp. 218–231.
4. V. Z. Lankin, G. G. Konovalova, A. K. Tikhaze, et al., J. Diabetes (2015) [E-pub ahead of print].
5. E. M. Kumskova, O. A. Antonova, S. A. Balashov, et al., Mol. Cell. Biochem. **396** (1–2), 79 (2014)
6. E. Beutler, W. Kuhl, and C. West, Blood **59** (6), 1141 (1982).
7. D. W. Allen, C. F. Burgoyne, J. D. Groat, et al., Blood, **64** (6), 1263 (1984)
8. Т. Н. Субботина, Н. М. Титова, А. А. Савченко и др., Клин. лаб. диагностика **20** (5), 33 (2004).
9. M. Allegra, C. Gentile, L. Tesoriere, and M. A. Livrea, J. Pineal. Res. **32** (3), 187 (2002).
10. A. L. Tappel, in *Free Radicals in Biology*, Ed. by W. A. Pryor (Acad Press, NY, London, etc., 1980), Vol. 4, pp. 1–47.
11. V. Z. Lankin, in: *Free radicals, nitric oxide, and inflammation: molecular, biochemical, and clinical aspects*, Ed. by A. Tomasi, T. Özben, and V. P. Skulachev (IOS Press, NATO Science Series, Amsterdam etc., 2003), Vol. 344, pp. 8–23.
12. T. Schewe, C. M. Rapoport, and H. Kuhn, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. **58**, 192 (1986).
13. В. З. Ланкин, Ю. Г. Осис и А. К. Тихазе, Докл. РАН **351** (2), 269 (1996).
14. В. З. Ланкин, Ю. Г. Осис и А. К. Тихазе, Биохимия **67** (5), 566 (2002).
15. A. B. Manodori and F. A. Kuypers, J. Lab. Clin. Med. **140** (3), 161 (2002).
16. J. P. Nicolay, J. Schneider, O. M. Niemoeller, et al., Cell. Physiol. Biochem. **18** (4–5), 223 (2006).
17. G. Caimi, A. Serra, A. Catania, et al., Microcirc. Endothelium Lymphatics. **6** (2–3), 149 (1990).
18. S. K. Jain, M. Palmer, and Y. Chen, Metabolism **48** (8), 957 (1999).
19. F. A. Kuypers, K. de Jong, Cell. Mol. Biol. **50** (2), 147 (2004).
20. M. J. Wilson, K. Richter-Lowney, and D. L. Daleke, Biochemistry **32** (42), 11302 (1993).
21. V. A. Fadok, D. L. Bratton, D. M. Rose, et al., Nature **405** (6782), 85 (2000).
22. P. M. Henson, D. L. Bratton, V. A. Fadok, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2** (8), 627 (2001).
23. U. K. Messmer and J. Pfeilschifter, Bioessays **22** (10), 878 (2000).
24. F. E. Boas, L. Forman, and E. Beutler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (6), 3077 (1998).
25. S. Eda and I. W. Sherman, Cell. Physiol. Biochem. **12** (5–6), 373 (2002).
26. A. Ravandi, A. Kuksis, and N. A. Shaikh, Arterioscler. Thrombos. Vascular Biol. **20** (2), 467 (2000).
27. В. З. Ланкин, О. И. Афанасьева, Г. Г. Коновалова и др., Докл. РАН **441**, 287 (2011)
28. T. J. Lyons, A. J. Jenkins, Curr. Opin. Lipidol. **8** (3), 174 (1997).
29. A. Gugliucci, T. Menini, A. J. Stahl, Biochem. Mol. Biol. Int. **32** (1), 139 (1994).
30. V. Lankin, G. Konovalova, A. Tikhaze, et al., Mol. Cell. Biochem. **395** (1–2), 241 (2014).
31. J. V. Hunt, M. A. Bottoms, K. Clare, et al., Biochem. J. **300** (1), 243 (1994)

32. V. Z. Lankin, A. K. Tikhaze, and E. M. Kumskova, *Mol. Cell. Biochem.* **365** (1–2), 93 (2012)
33. К. Б. Шумаев, К. В. Губкина, Е. М. Кумскова и др., *Биохимия* **74** (4), 461 (2009).

Hypoosmotic Hemolysis of Erythrocytes by Active Carbonyl Forms

V.Z. Lankin, E.M. Belova, and A.K. Tikhaze

*Russian Cardiology Research Complex, Ministry of Health of the Russian Federation,
3-ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia*

Low molecular weight dicarbonyls formed during free radical peroxidation of polyene lipids (malondialdehyde) and autooxidation (glyoxal) or other oxidative transformations of glucose (methylglyoxal) are able to modify the structure of lipid-protein supramolecular complexes of the cells. We investigated the changes in erythrocyte membrane structure after an 18-hour exposure of human red blood cells in the presence of various natural dicarbonyls. The changes on the mechanical properties of the membrane after membrane modification by carbonyls was evaluated by the susceptibility of erythrocytes to hypoosmotic hemolysis. It has been shown that treatment of red blood cells with malondialdehyde increases the resistance of these cells to hypoosmotic hemolysis, whereas the malondialdehyde isomer – methylglyoxal, in contrast, makes red blood cells more sensitive to action of hypoosmotic solutions. Paradoxically, that the homologue of malondialdehyde – glyoxal has no effect on hemolysis of red blood cells in the hypoosmotic solutions. The data obtained points to the possibility of the multidirectional effect of structurally similar low molecular weight dicarbonyls on the structure and function of biological membranes.

Key words: malonyl dialdehyde, glyoxal, methylglyoxal, free radical oxidation, membrane structure