

УДК 577.344

О МЕХАНИЗМЕ ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННОГО ФОТООКИСЛЕННЫМ ПСОРАЛЕНОМ

Мини-обзор

© 2015 Е.В. Невежин^{1,2}, Н.В. Власова¹, И.А. Пятницкий¹,
Е.П. Лысенко¹, М.В. Малахов^{1,2*}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, кафедра физики и математики,
117997 Москва; электронная почта: frost88.07@mail.ru

² Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, отдел медицинской химии и токсикологии,
117997 Москва; электронная почта: malakhov.mikhail@gmail.com

Поступила в редакцию 13.01.15
После доработки 16.03.15

Представлены современные данные о возможном механизме гемолиза эритроцитов, индуцированного фотоокисленным псораленом — медицинским фотосенсибилизатором фурукумаринового ряда. Гипотеза о механохимическом механизме гемолиза рассмотрена с учетом новых данных о фотоиндуцированной агрегации в растворах фотоокисленного псоралена. Обсуждается возможное химическое строение фотопродуктов-гемолизинов и агрегирующих фотопродуктов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: псорален, фотоокисленный псорален, фотопродукты, гемолиз эритроцитов, фотоиндуцированная агрегация, химическая регуляция гемолиза.

Псоралены — трициклические УФ-фотосенсибилизаторы растительного или синтетического происхождения, образованные в результате конденсации фурана и кумарина и успешно применяемые для лечения целого ряда патологий, обусловленных гиперреактивностью Т-клеточного звена иммунитета (витилиго, псориаза, аллергического контактного дерматита и др.) [1]. Лечение может осуществляться посредством проведения ПУВА-терапии (транслитерация от англ. PUVA = psoralen + UV-A) [1] или фотофереза [2], при которых ПУВА-воздействию подвергаются кожа пациента или полученная от пациента лейкоцитарная масса соответственно. В настоящее время считается, что ПУВА-терапия реализуется за счет антипролиферативного и проапоптотического эффектов в отношении ке-

ратиноцитов и иммунокомпетентных клеток, а также вследствие индукции иммуносупрессии [1].

Серия проведенных в нашей лаборатории** исследований показала, что терапевтической эффективностью также обладает фотоокисленный псорален (ФОП), получаемый *in vitro* [3–5]. Этот факт заставил нас переосмыслить все существовавшие ранее представления о фотохимических механизмах, лежащих в основе ПУВА-терапии и фотофереза, сфокусировав свое внимание на исследованиях фотохимии и фотобиологии ФОП [6–9]. Ряд интересных эффектов, согласующихся с нашими результатами, был получен и другими исследователями [10–13]. ФОП представляет собой сложную смесь фотопродуктов псоралена, образующихся при фотоокислении его растворов, но лишь несколько фотопро-

Принятые сокращения: УФ — ультрафиолет; УФ-А — ближний ультрафиолет (315–400 нм); ПУВА — от англ. PUVA (псорален + УФ-А); ФОП — фотоокисленный псорален; НИ-ПУВА-гемолиз — низкоинтенсивный ПУВА-гемолиз (интенсивность УФ-А < 40 Вт/м²); ВИ-ПУВА-гемолиз — высокоинтенсивный ПУВА-гемолиз (интенсивность УФ-А > 120 Вт/м²); РСР — резонансное светорассеяние; GSH — восстановленная форма глутатиона; GSSG — окисленная форма глутатиона.

* Адресат для корреспонденции.

** В основе обзора лежат данные, полученные в лаборатории фотомедицины ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, которую в течение 40 лет возглавлял профессор Александр Яковлевич Поталенко (1944–2014), светлой памяти которого посвящен этот обзор.

дуктов были химически охарактеризованы и протестированы в моделях *in vitro* и *in vivo* [14]. Это объясняется чрезвычайной сложностью разделения и химической идентификации отдельных фотопродуктов вследствие их малого выхода и нестабильности при проведении аналитических процедур [14–16]. По этой же причине исследование фотохимических закономерностей образования отдельных биологически активных фотопродуктов возможно лишь с использованием содержащей их сложной смеси.

Как ПУВА-воздействие, так и обработка ФОП способны повреждать мембраны эритроцитов и индуцировать их гемолиз в разбавленной суспензии (10^7 кл/мл) [5, 17–24]. Эритроциты не являются мишенью ПУВА-терапии и фотофереза, а применяемые при их проведении концентрации псоралена приблизительно на два порядка ниже используемых в экспериментах по индукции гемолиза. Тем не менее модель гемолиза эритроцитов, индуцированного ПУВА-воздействием или обработкой ФОП, может служить простой и легко воспроизводимой моделью для изучения фотохимических механизмов образования биологически активных фотопродуктов, а также влияния ряда физико-химических факторов (интенсивность УФ-А-излучения, концентрация псоралена и др.) на их образование в ходе фотохимических реакций. Кроме того, исследования химической регуляции процесса гемолиза могут предоставить информацию о возможном химическом строении биологически активных фотопродуктов.

Далее мы рассмотрим современные представления о возможном механизме гемолиза эритроцитов, индуцированного ФОП, и предположительном химическом строении фотопродуктов-гемолизиннов.

НИЗКОИНТЕНСИВНЫЙ ПУВА-ГЕМОЛИЗ (НИ-ПУВА-ГЕМОЛИЗ)

НИ-ПУВА-гемолиз индуцируется при воздействии на эритроциты УФ-А-излучением низкой интенсивности (интенсивность УФ-А < 40 Вт/м²) в присутствии псоралена и имеет те же черты и закономерности, что и другие виды фотогемолиза, например, УФ-гемолиз и гемолиз, индуцированный другими фотосенсибилизаторами [25]: 1) гемолизу подвергаются все клетки суспензии; 2) пороговая доза, т.е. доза, ниже которой гемолиз не индуцируется, отсутствует; 3) кривая гемолиза имеет сигмоидную форму; 4) скорость НИ-ПУВА-гемолиза прямо пропорциональна квадрату дозы облучения. НИ-ПУВА-гемолиз протекает по коллоидно-осмотическому меха-

низму (рис. 1), в процессе чего в мембране эритроцитов формируются каналы, проницаемые для катионов, но непроницаемые для крупных осмотически активных молекул (например, сахаразы) [19]. Отличительной особенностью НИ-ПУВА-гемолиза является его термоактивируемость, т.е. гемолиз индуцируется лишь в том случае, когда подвергнутые НИ-ПУВА-воздействию эритроциты затем инкубируют при 37°. Наиболее вероятной мишенью НИ-ПУВА-гемолиза считается белок полосы 3 анионного канала эритроцитов, состоящий из двух субъединиц и повреждаемый при воздействии на него целого ряда фотосенсибилизаторов [26, 27].

ВЫСОКОИНТЕНСИВНЫЙ ПУВА-ГЕМОЛИЗ (ВИ-ПУВА-ГЕМОЛИЗ)

При повышении интенсивности УФ-А-излучения характер гемолиза меняется, и при значениях интенсивности более 120 Вт/м² наблюдаются черты, не характерные для НИ-ПУВА-гемолиза, а именно: 1) появляется пороговая доза облучения; 2) в узком диапазоне надпороговых доз наблюдается незавершенный гемолиз (в суспензии лизирует лишь некоторая доля клеток), и при дальнейшем повышении дозы гемолиз становится завершенным (в суспензии лизируют все клетки); 3) при увеличении дозы облучения скорость завершенного гемолиза парадоксально падает; 4) образующиеся в мембране каналы имеют размеры, большие размеров молекулы сахарозы [19]. Таким образом, механизм ВИ-ПУВА-гемолиза существенно отличается от коллоидно-осмотического и напоминает гемолиз, индуцируемый специфическими детергентами (например, дигитонином) [18]. Влияние температуры постлучевой инкубации на реализацию ВИ-ПУВА-гемолиза имеет сложный характер: при увеличении температуры дозовая зависимость сдвигается в сторону больших доз, при этом скорость гемолиза повышается. Это позволило предположить, что с увеличением температуры постлучевой инкубации количество каналов проницаемости уменьшается, хотя скорость гемолиза растет по причине снижения вязкости мембран и увеличения скорости латеральной диффузии, и, соответственно, увеличения скорости формирования крупных каналов проницаемости. С учетом вышеизложенного неслучайно, что для ПУВА-гемолиза не выполняется закон взаимозаменяемости интенсивности и длительности облучения [20]. В попытке объяснить различие между двумя типами ПУВА-гемолиза, было высказано предположение, что в индукцию ВИ-ПУВА-гемолиза значительный

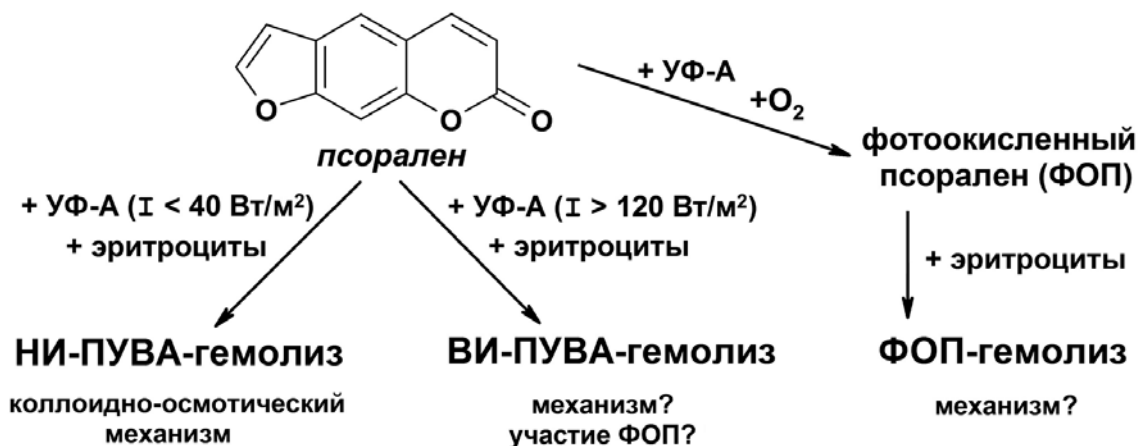


Рис. 1. Основные типы гемолитического повреждения мембран эритроцитов, индуцируемого фотодинамическим воздействием (ПУВА-гемолиз) или фотоокисленным псораленом (ФОП-гемолиз)

вклад вносят продукты фотоокисления псоралена (рис. 1), образующиеся и реализующие свою гемолитическую активность *in situ* в процессе ПУВА-воздействия [28].

ГЕМОЛИЗ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ФОТООКИСЛЕННЫМ ПСОРАЛЕНОМ (ФОП-ГЕМОЛИЗ)

Целая серия работ позволила установить, что описанные выше черты, характерные для ВИ-ПУВА-гемолиза, одинаково характерны и для ФОП-гемолиза [5, 21–24]. Особенно важным представляется тот факт, что образование ФОП-гемолизинов возможно лишь в присутствии кислорода в растворе в процессе УФ-А облучения (рис. 1), т.е. ФОП-гемолизины могут быть лишь продукты фотоокисления псоралена [21]. Кроме того, было выяснено, что образование ФОП-гемолизинов происходит более эффективно при увеличении интенсивности УФ-А-излучения и/или концентрации псоралена в процессе получения ФОП [5]. Также было обнаружено, что растворы ФОП содержат несколько гемолизинов, различающихся по своей стабильности в процессе хранения при разных температурах (в диапазоне от 4 до 45°) и по своей гемолитической эффективности [23, 24, 29]. При этом ни один из обнаруженных эффектов не помог пониманию причины парадоксального снижения скорости гемолиза при увеличении дозы облучения.

Ранее нами был обнаружен факт гемолиза эритроцитов, который индуцируется широко используемым антиоксидантом ионолом (2,6-дигрет-бутил-4-метилфенолом) [30]. В высоких

концентрациях (16–100 мкМ) ионол способен индуцировать гемолиз эритроцитов, причем с увеличением его концентрации скорость гемолиза падала, как и в случае ФОП-гемолиза. В попытках объяснить феноменологическое сходство двух процессов была выдвинута гипотеза о механохимическом механизме гемолиза.

ГИПОТЕЗА О МЕХАНОХИМИЧЕСКОМ МЕХАНИЗМЕ ФОП-ГЕМОЛИЗА

Гипотеза предполагает, что образующиеся в процессе фотоокисления псоралена ФОП-гемолизины агрегируют в растворах, и именно агрегаты механически повреждают мембрану эритроцитов, вызывая гемолиз (рис. 2, а). При малых подпороговых дозах облучения количество агрегатов так мало, что гемолиз не наблюдается. При надпороговых дозах количество агрегатов быстро увеличивается с ростом дозы облучения; при этом быстро увеличивается количество лизированных эритроцитов. Параллельно в растворе происходит процесс укрупнения агрегатов, которые становятся неспособны индуцировать гемолиз клеток, и именно этим может объясняться падение скорости гемолиза с увеличением дозы облучения.

С появлением в арсенале нашей лаборатории метода регистрации резонансного светорассеяния (РСР) [31] был обнаружен факт фотоиндуцированной агрегации в растворах ФОП [32]. С учетом ряда закономерностей образования ФОП-гемолизинов, полученных нами ранее и описанных в разделе о ФОП-гемолизе, мы подробно исследовали процессы фотоиндуциро-

ванной агрегации в растворах ФОП методом регистрации РСР.

Обнаружено, что зависимость формирования агрегатов и гемолизинах от интенсивности УФ-А-излучения и концентрации псоралена имеет сходный характер. Однако существует и принципиальное различие: формирование агрегатов не зависит от присутствия кислорода в процессе облучения в отличие от процессов формирования гемолизинах. Это наблюдение является определяющим доводом против гипотезы о механохимическом механизме ФОП-гемолиза. Вместе с тем результаты исследований позволили нам предположить, что фотопродуктами псоралена, ответственными за формирования сигнала РСР, могут являться C_4 -циклобутановые димеры псоралена (рис. 2, б), хорошо известные из литературы [14, 33]. Действительно, все физикохимические закономерности их образования близко совпадают с таковыми, характерными для агрегатов: формирование димеров не только не зависит от присутствия кислорода в процессе облучения, но даже тушится им, и луч-

ше происходит при увеличении концентрации псоралена и/или интенсивности УФ-А-излучения [14–16, 33]. Учитывая относительную стабильность агрегатов во времени (что также отличает их от крайне нестабильных гемолизинах), предполагается провести сравнение кинетики образования агрегатов (методом регистрации РСР) и димеров (например, методом масс-спектрометрии), что запланировано в дальнейшем наряду с оценкой размеров агрегатов (методом динамического светорассеяния).

МЕХАНИЗМЫ ФОТООКИСЛЕНИЯ ПСОРАЛЕНА И ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ФОП-ПРОДУКТОВ

В данной главе рассмотрены механизмы образования некоторых ФОП-продуктов в процессе фотоокисления псоралена в водной фазе. Условно все фотоокислительные реакции, приводящие к образованию ФОП, можно разделить на три группы: 1) реакции с расщеплением фуранового кольца; 2) реакции с расщеплением пиринового кольца и 3) глубокий фотолиз псоралена (рис. 3).

Механизм образования ФОП-продуктов с расщеплением фуранового кольца связывают с атакой синглетного кислорода, образующегося в процессе фотоокисления псоралена в растворах, двойной связи фуранового кольца с образованием промежуточного диоксетана [34, 35]. Одновременное раскрытие O–O и C–C связей диоксетана приводит к формированию диальдегида с последующим гидролизом эфирной связи и формированием конечного продукта – 6-формил-7-гидроксикумарина (рис. 3, I). Предполагается, что по аналогичному механизму происходит фотоокислительное раскрытие фуранового кольца и в случае 5-метоксипсоралена и 8-метоксипсоралена [14, 34, 35].

ФОП-продукты с расщеплением пиринового кольца могут образовываться по двум механизмам: 1) поглотившая фотон молекула псоралена в электронно-возбужденном состоянии может подвергаться сольволизу водой с образованием фурукумариновой кислоты [14–16]. Дальнейшее окисление двойной связи раскрывшегося пиринового кольца растворенным в воде кислородом (возможно, через стадию интермедиата) может приводить к формированию 5-формил-6-гидроксибензофурана (рис. 3, II); 2) этот же продукт может получаться в результате атаки двойной связи пиринового кольца в электронно-возбужденной молекуле псоралена молекулой воды или кислорода с последующим гидролизом эфирной связи [15].

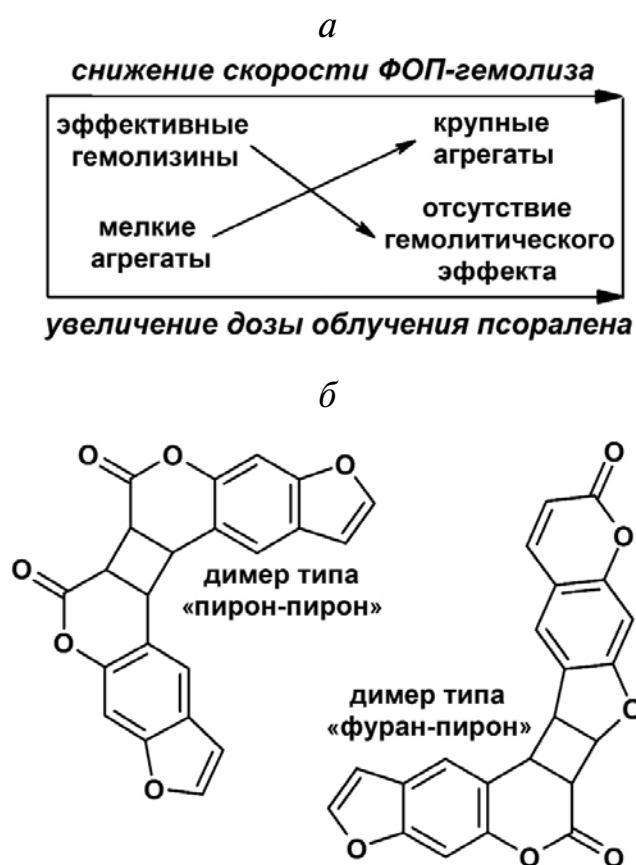


Рис. 2. Схематичное представление о механохимическом механизме ФОП-гемолиза (а) и строение димеров псоралена, образующихся в растворах при его фотолизе (б)

К продуктам глубокого фотолиза псоралена относят фотопродукты с расщеплением и фуранового и пиранового кольца, относящиеся к бензальдегидам и бензодиальдегидам, а также образующиеся в процессе фотоокисления незначительные количества альдегидов (формальдегида и ацетальдегида) и соответствующих карбоновых кислот [15, 16]. Кроме того, в растворах ФОП происходит образование и накопление пероксида водорода (H_2O_2), причем H_2O_2 продолжает накапливаться в растворе даже после окончания облучения, что может являться результатом автоокисления фотопродуктов псоралена альдегидной природы [36]. Фотопродукты-альдегиды обладают поглощением в УФ-А области спектра, поэтому оно может служить инициа-

ром автоокисления, а затем процесс носит цепной характер [16, 36].

ХИМИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФОП-ГЕМОЛИЗА

В контексте химической регуляции ФОП-гемолиза важными представляются два аспекта. Первый связан с модулированием ФОП-гемолиза ионами $Fe(II)$: добавление $Fe(II)$ к ФОП в присутствии эритроцитов приводило к активации ФОП-гемолиза, тогда как инкубация ФОП с ионами $Fe(II)$ в течение 20 мин приводила к его полной отмене [37]. Это может говорить о формировании более эффективных, но корот-

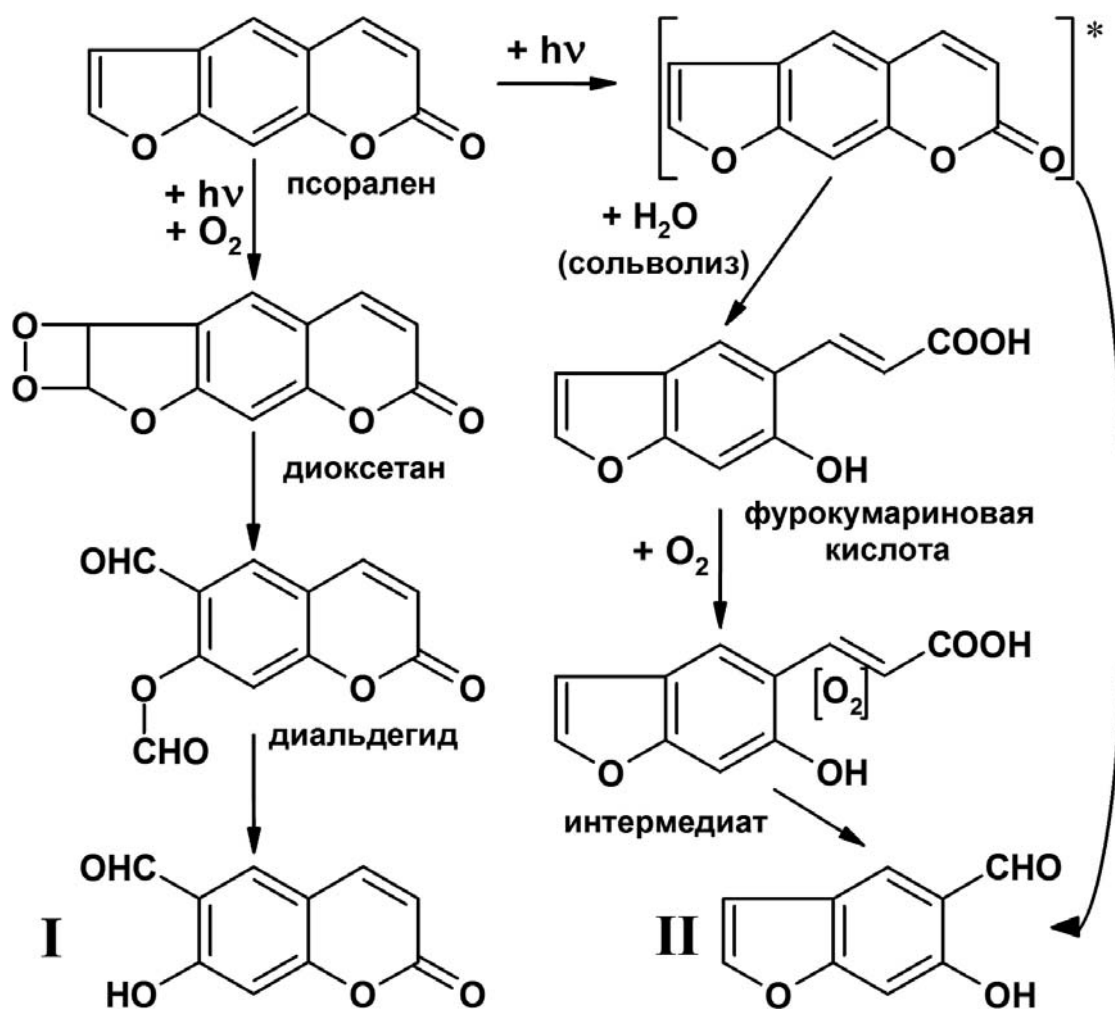


Рис. 3. Предполагаемые фотохимические механизмы, приводящие к образованию ФОП-продуктов альдегидной природы (6-формил-7-гидроксикумарин, I; 5-формил-6-гидроксибензофуран, II)

коживущих гемолизинов при взаимодействии ФОП с ионами Fe(II). С учетом ранее полученных данных о хемилюминесценции, индуцируемой добавлением ионов Fe(II) к растворам ФОП, можно предположить пероксидную природу ФОП-гемолизинов [29, 37, 38]. В то же время с применением каталазы нами было показано, что образующийся в процессе фотоокисления псоралена пероксид водорода не является гемолизином и не участвует в процессе его образования [22]. Поэтому, можно предположить, что короткоживущие пероксиды могут являться интермедиатами процесса формирования альдегидов, например, при окислении фурукумариновой кислоты (рис. 3). О пероксидной природе также может косвенно свидетельствовать то, что ФОП-гемолизин более устойчив при низких температурах (около 4°), чем при высоких (около 45°) [24, 29].

Вторым аспектом является модулирование глутатионом как ПУВА-гемолиза [39], так и ФОП-гемолиза [22, 29]. Активацию ПУВА-гемолиза восстановленной формой глутатиона (GSH) связывали с предположительным образованием свободных радикалов в процессе облучения. Для ФОП-гемолиза наблюдалась более сложная картина. Инкубация ФОП, полученного при 25°, как с восстановленной, так и с окисленной (GSSG) формами глутатиона приводила к активации ФОП-гемолиза [22]. Это может говорить о формировании более эффективных гемолизинов при взаимодействии ФОП и глутатиона, что подкрепляется известными данными [40–42]. В то же время гемолитический эффект ФОП, полученного при 4°, отменялся при его инкубации как с GSH, так и с GSSG [29]. С учетом того, что температура не влияет на первичные фотохимические процессы, можно предпо-

ложить, что температура влияет на постлучевой этап преобразования одного типа ФОП-продуктов в другой. При этом одинаковая активность GSH и GSSG позволяет предположить, что тиольная группа может не участвовать в химической модификации ФОП-продуктов, а взаимодействие происходит по аминогруппе. Это выводит на передний план ФОП-продукты альдегидной природы, поскольку реакция альдегидов с аминами с образованием оснований Шиффа является общеизвестной.

Механизм ФОП-гемолиза, по-прежнему, остается неизвестным, хотя серия экспериментов по исследованию фотоиндуцированной агрегации в растворах ФОП позволила признать несостоятельной гипотезу о механохимическом механизме ФОП-гемолиза. ФОП представляет собой смесь фотопродуктов, различающихся по своей химической природе, а также по фотохимическим механизмам их образования. Высокая реакционная способность таких фотопродуктов как в отношении биологических мишеней, так в отношении друг друга, оставляет широкое поле для возможной трактовки полученных результатов. Особое внимание в последующих исследованиях планируется уделять механизмам образования и активности фотопродуктов альдегидной природы, способ получения которых известен из литературы [15, 43]. Кроме того, представляют интерес механизмы образования и химическая структура пероксидных фотопродуктов, поскольку промотирующая роль пероксидов в гемолизе, индуцированном альдегидами, также известна [44].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-02-00629).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Racz, E., and Prens, E.P. (2015) Phototherapy and photochemotherapy for psoriasis, *Dermatol. Clin.*, **33**, 79–89.
2. Trautinger, F., Just, U., and Knobler, R. (2013) Photopheresis (extracorporeal photochemotherapy), *Photochem. Photobiol. Sci.*, **12**, 22–28.
3. Potapenko, A.Ya., Kyagova, A.A., Bezdetnaya, L.N., Lysenko, E.P., Chernyakhovskaya, I.Yu., Bekhalo, V.A., Nagurskaya, E.V., Nesterenko, V.A., Korotky, N.G., Akhtyamov, S.N., and Lanshchikova, T.M. (1994) Products of psoralen photooxidation possess immunomodulative and antileukemic effects, *Photochem. Photobiol.*, **60**, 171–174.
4. Kyagova, A.A., Nagurskaya, E.N., Bekhalo, V.A., Chernyakhovskaya, I.Y., Belichenko, I.V., and Potapenko, A.Ya. (1996) The attenuation of effectors and induction of suppressors of delayed type hypersensitivity reaction under the treatment with psoralen photooxidation products, *Russ. J. Immunol.*, **1**, 61–68.
5. Kyagova, A.A., Zhuravel, N.N., Malakhov, M.V., Lysenko, E.P., Adam, W., Saha-Moller, C.R., and Potapenko, A.Ya. (1997) Suppression of delayed-type hypersensitivity and hemolysis induced by previously photooxidized psoralen: effect of fluence rate and psoralen concentration, *Photochem. Photobiol.*, **65**, 694–700.
6. Потапенко А.Я., Бутов Ю.С., Левинзон Е.С., Андина Е.С., Юрикова Н.А., Неклюкова М.Б., Мамедов И.С., Лысенко Е.П., Бездетная Л.Н., Кягова А.А. (1999) Фотоокислительные реакции псораленов и их роль в терапии дерматозов, *Вестник РАМН*, **2**, 32–38.
7. Kyagova, A.A., Malakhov, M.V., and Potapenko, A.Ya. (2009) In *Immunosuppression: New research* (Taylor, C.B., ed.), Nova Science Publishers, N.Y., 167–183.
8. Пятницкий И.А., Павлова С.И., Албегова Д.З., Козырь Л.А., Козлов И.Г., Потапенко А.Я., Кягова А.А. (2012) Механизмы супрессорного действия фотоокисленного

- псоралена на афферентной фазе реакции контактной чувствительности у мышей, *Российский иммунологический журнал*, **6**, 139–146.
9. Пятницкий И.А., Павлова С.И., Албегова Д.З., Козлов И.Г., Потапенко А.Я., Кягова А.А. (2013) Супрессорное действие продуктов фотоокисления псоралена на реакцию контактной чувствительности у мышей: Ингибирование пролиферации и индукция апоптоза лимфоцитов, *Российский журнал кожных и венерических болезней*, **6**, 59–63.
 10. Canton, M., Caffieri, S., Dall'Acqua, F., and Di Lisa, F. (2002) PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore, *FEBS Lett.*, **522**, 168–172.
 11. Caffieri, S., Di Lisa, F., Bolesani, F., Facco, M., Semenzato, G., Dall'Acqua, F., and Canton, M. (2007) The mitochondrial effects of novel apoptogenic molecules generated by psoralen photolysis as a crucial mechanism in PUVA therapy, *Blood*, **109**, 4988–4994.
 12. Viola, G., Vedaldi, D., Dall'Acqua, F., Lampronti, I., Bianchi, N., Zuccato, C., Borgatti, M., and Gambari, R. (2008) Furocoumarins photolysis products induce differentiation of human erythroid cells, *J. Photochem. Photobiol. B*, **92**, 24–28.
 13. Salvador, A., Dall'Acqua, S., Sardo, M.S., Caffieri, S., Vedaldi, D., Dall'Acqua, F., Borgatti, M., Zuccato, C., Bianchi, N., and Gambari, R. (2010) Erythroid induction of chronic myelogenous leukemia K562 cells following treatment with a photoproduct derived from the UV-A irradiation of 5-methoxypsoralen, *Chem. Med. Chem.*, **5**, 1506–1512.
 14. Caffieri, S. (2002) Furocoumarin photolysis: chemical and biological aspects, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 149–157.
 15. Marley, K.A., and Larson, R.A. (1994) A new photoproduct from furocoumarin photolysis in dilute aqueous solution: 5-formyl-6-hydroxybenzofuran, *Photochem. Photobiol.*, **59**, 503–505.
 16. Marley, K.A., Larson, R.A., and Davenport, R. (1995) Redox mechanisms of furocoumarin phototoxicity, *The Spectrum*, **8**, 9–14.
 17. Potapenko, A.Y., Wunderlich, S., Pliquett, F., Bezdetsnaya, L.N., and Sukhorukov, V.L. (1986) Photosensitized modification of erythrocyte membranes induced by furocoumarins, *Photobiophys.*, **10**, 175–180.
 18. Potapenko, A.Y., Bezdetsnaya, L.N., Lysenko, E.P., Sukhorukov, V.L., Remisov, A.N., and Vladimirov, Y.A. (1986) Mechanisms of furocoumarin sensitized damage to biological membranes, *Stud. Biophys.*, **114**, 159–170.
 19. Бездетная Л.Н., Потапенко А.Я., Перхова О.Ю., Нагиев А.И., Сухоруков В.Л., Владимиров Ю.А. (1987) Фотосенсибилизированное псораленом повреждение мембран эритроцитов: два механизма, *Биологические мембраны*, **4**, 270–279.
 20. Potapenko, A.Y., Agamalieva, M.A., Nagiev, A.I., Lysenko, E.P., Bezdetsnaya, L.N., and Sukhorukov, V.L. (1990) Photohemolysis sensitized by psoralen: reciprocity law is not fulfilled, *J. Photochem. Photobiol. B*, **54**, 375–379.
 21. Potapenko, A. (1991) Mechanisms of photodynamic effects of furocoumarins, *J. Photochem. Photobiol. B*, **9**, 1–33.
 22. Lysenko, E.P., Melnikova, V.O., Andina, E.S., Wunderlich, S., Pliquett, F., and Potapenko, A.Y. (2000) Effects of glutathione peroxidase and catalase on hemolysis and methemoglobin modifications induced by photooxidized psoralen, *J. Photochem. Photobiol. B*, **56**, 187–195.
 23. Kyagova, A.A., Ismailova, M.I., Malakhov, M.V., and Potapenko, A.Y. (2004) Hemolysis induced by psoralen previously photooxidized in ethanol or aqueous solutions, *Proc. SPIE*, **5474**, 272–280.
 24. Потапенко А.Я., Малахов М.В., Кягова А.А. (2004) Фотобиофизика фурукумаринов, *Биофизика*, **49**, 322–339.
 25. Pooler, J.P. (1985) The kinetics of colloid osmotic hemolysis. II. Photochemolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 199–205.
 26. Pooler, J.P. (1986) A new hypothesis for the target in photohemolysis: dimers of the band 3 protein, *Photochem. Photobiol.*, **43**, 263–266.
 27. Pooler, J.P., and Girotti, A.W. (1986) Photohemolysis of human erythrocytes labeled in band 3 with eosin-isothiocyanate, *Photochem. Photobiol.*, **44**, 495–499.
 28. Potapenko, A.Y., Bezdetsnaya, L.N., Lysenko, E.P., Akhtyamov, S.N., Tomashaeva, S.K., and Sukhorukov, V.L. (1988) Hypothesis of the induction of psoralen phototoxic effects through the stage of photooxidized psoralen formation. Model studies of erythrocytes, *Stud. Biophys.*, **124**, 205–223.
 29. Малахов М.В. (2003) Изучение механизма образования и стабильности биологически-активных продуктов фотоокисления псоралена, *Дисс. канд. биол. наук*, РГМУ, Москва.
 30. Belichenko, I.V., Lysenko, E.P., Zhuravel, N.N., Kyagova, A.A., Malakhov, M.V., Bezdetsnaya, L.N., and Potapenko, A.Ya. (1995) Comparison of haemolytic effects of butylated hydroxytoluene and previously photooxidized psoralen, *Phys. Chem. Biol. Med.*, **2**, 159–164.
 31. Pasternack, R.F., and Collings, P.J. (1995) Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation, *Science*, **269**, 935–939.
 32. Пятницкий И.А., Власова Н.В. (2011) Исследование агрегации продуктов фотоокисления псоралена методом резонансного светорассеяния, *Вестник РГМУ*, **1**, 69–73.
 33. Caffieri, S., and Dall'Acqua, F. (1987) C₄-cyclodimers of psoralen engaging the 4',5'-double bond, *Photochem. Photobiol.*, **45**, 13–18.
 34. Logani, M.K., Austin, W.A., Shah, B., and Davies, R.E. (1982) Photooxidation of 8-MOP with singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 569–573.
 35. Wasserman, H.H., and Berdahl, D.R. (1982) The photooxidation of 8-methoxypsoralen, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 565–567.
 36. Маслов С.А., Блюмберг Э.А. (1976) Жидкофазное окисление альдегидов, *Успехи химии*, **45**, 303–328.
 37. Журавель Н.Н., Беличенко И.В., Кягова А.А., Лысенко Е.П., Халилов Э.М., Потапенко А.Я. (1996) Активация ионами Fe²⁺ гемолиза, индуцированного фотоокисленным псораленом (ФОП). Роль реакций ионов Fe²⁺ с ФОП с эритроцитами, *Биологические мембраны*, **13**, 354–359.
 38. Rodenko, I.N., Osipov, A.N., Lysenko, E.P., and Potapenko, A.Y. (1993) Degradation of psoralen photooxidation products induced by ferrous ions, *J. Photochem. Photobiol. B*, **19**, 39–48.
 39. Potapenko, A.Y., Saparov, S.M., Agamalieva, M.A., Lysenko, E.P., Bezdetsnaya, L.N., and Sukhorukov, V.L. (1993) Fe²⁺-ions and reduced glutathione – chemical activators of psoralen-sensitized photohaemolysis, *J. Photochem. Photobiol. B*, **17**, 69–75.
 40. Uchida, K., Hasui, Y., and Osawa, T. (1997) Covalent attachment of 4-hydroxy-2-nonenal to erythrocyte proteins, *J. Biochem.*, **6**, 1246–1251.
 41. Meacher, D.M., and Menzel, D.B. (1999) Glutathione depletion in lung cells by low-molecular-weight aldehydes, *Cell Biol. Toxicol.*, **15**, 163–171.
 42. Ichihashi, K., Osawa, T., Toyokuni, S., and Ushida, K. (2001) Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes, *J. Biol. Chem.*, **276**, 23903–23913.

43. Malakhov, M.V., Dubinnyi, M.A., Vlasova, N.V., Zgoda, V.G., Efremov, R.G., and Boldyrev, I.A. (2014) End-group differentiating ozonolysis of furocoumarins, *RSC Adv.*, **4**, 61277–61280.
44. Pryor, W.A., Miki, M., Das, B., and Church, D.F. (1991) The mixture of aldehydes and hydrogen peroxide produced in the ozonation of dioleoyl phosphatidylcholine causes hemolysis of human red blood cells, *Chem. Biol. Interact.*, **1**, 41–52.

ON THE MECHANISM OF ERYTHROCYTE HEMOLYSIS INDUCED BY PHOTOOXIDIZED PSORALEN

**E. V. Nevezhin^{1,2}, N. V. Vlasova¹, I. A. Pyatnitskiy¹,
E. P. Lysenko¹, M. V. Malakhov^{1,2*}**

¹ *N. I. Pirogov Russian National Research Medical University,
Department of Physics and Mathematics, ul. Ostrovityanova 1,
Moscow 117997, Russia; E-mail: frost88.07@mail.ru*

² *N. I. Pirogov Russian National Research Medical University,
Medicinal Chemistry and Toxicology Unit, ul. Ostrovityanova 1,
Moscow 117997, Russia; E-mail: malakhov.mikhail@gmail.com*

Received January 13, 2015

Revision received March 16, 2015

Contemporary concepts on a possible mechanism of erythrocyte hemolysis induced by photooxidized psoralen – the medicinal photosensitizing furocoumarin – are reviewed. A hypothesis on a mechanochemical mechanism of hemolysis is considered in view of recent data on photoinduced aggregation in photooxidized psoralen solutions. An appropriate chemical structure of photoproduct hemolysins and aggregating photoproducts is discussed.

Key words: psoralen; photooxidized psoralen, photoproducts, erythrocyte hemolysis, photoinduced aggregation, chemical regulation of hemolysis