

ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВНУТРИЭРИТРОЦИТАРНОГО ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ МЕТИЛ-В-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Е.А. Калаева, Л.О. Соколова, Н.В. Литвинов, В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 15.05.2023 г.

Аннотация. Способность эритроцитов к обратимой деформации при прохождении по микрокапиллярам сосудистого русла обеспечивается главным образом липидным составом мембраны, который определяет ее плотность, гибкость, проницаемость и другие качества. Холестерин в составе липидного бислоя регулирует степень упорядоченности и подвижность углеводородных цепей мембранных фосфолипидов. Оценить роль стеринов в поддержании структуры плазмалеммы возможно посредством направленного изменения концентрации холестерина в ней при использовании метил- β -циклодекстрина (МБЦД), представляющего собой циклический олигосахарид, состоящий из 7 α -(1-4)-связанных звеньев D-глюкопиранозы и содержащий гидрофобную полость, способную вмещать молекулу стерина. Для комплексной оценки влияния МБЦД на эритроцитарные клетки следует изучать не только прямые эффекты его воздействия, связанные с перестройками плазматической мембраны, но и косвенные, обусловленные возможностью взаимодействиями МБЦД со внутриэритроцитарным гемоглобином. Целью работы являлось исследование спектральных характеристик внутриэритроцитарного гемоглобина человека после воздействия метил- β -циклодекстрина в различных концентрациях на суспензии красных клеток крови. С помощью метода УФ- и видимой спектрофотометрии было установлено, что при модификации суспензий эритроцитов растворами метил- β -циклодекстрина в концентрациях 3.0–5.0 мМ происходили конформационные перестройки молекул внутриэритроцитарного гемоглобина, которые сопровождались компактизацией белковой глобулы, выходом остатков триптофана на ее поверхность и затрагивали область контактов глобина с порфириновым компонентом. При этом оптическая плотность образцов в диапазоне длин волн 200–450 нм после воздействия МБЦД снизилась по сравнению с контролем, и с увеличением концентрации модифицирующего агента гипохромный эффект усиливался. Окисления железа гема и образования метгемоглобина в модифицированных образцах выявлено не было. Гемолитический эффект МБЦД в исследованном диапазоне концентраций не проявлялся, о чем свидетельствовали параметры величин оптических плотностей в максимуме полосы Soret и в минимуме при 495–500 нм.

Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости учета воздействия метил- β -циклодекстрина не только на липиды плазматической мембраны эритроцитов, но и на белковые компоненты клеток, так как подобного рода эффекты могут оказывать существенное влияние на кислородтранспортную функцию эритроцитов.

Ключевые слова: внутриэритроцитарный гемоглобин, метил- β -циклодекстрин, плазматическая мембрана, электронные спектры поглощения, эритроциты

Эритроцит представляет собой безъядерную клетку в форме двояковогнутого диска (пеллора), содержащего гемоглобин [1]. Данная морфологическая особенность обеспечивает максимально возможное отношение площади поверхности клетки (136–163 мкм²) к объему (80–100 мкл³), что

является важным качеством клеток, обеспечивающих газообмен [2].

Эритроциты способны «складываться» при прохождении по капиллярам, просвет которых меньше диаметра этих клеток, при этом они подвергаются внешнему воздействию, которое заставляет их претерпевать быстрые обратимые деформации [3]. Данный процесс обусловлен особенностями строения эритроцитарной мем-

браны. Структура мембраны определяется составом и взаимным расположением фосфолипидов, интегральных и периферических белков и холестерина [3]. Основное биологическое значение последнего заключается в способности влиять на степень упорядоченности и подвижность углеводородных цепей мембранных фосфолипидов [4], что отражается на таких характеристиках мембраны, как плотность, проницаемость, вязкость [5].

В полной мере оценить роль стеринов в поддержании структуры плазмалеммы, а также проанализировать влияние липидного состава мембраны на функциональные свойства эритроцитов, возможно посредством направленного изменения концентрации холестерина в ней.

Циклодекстрины (ЦД), также известные как цикломальтодекстрины или циклоамилозы, в настоящее время используются в пищевой, биотехнологической, фармацевтической, косметической и текстильной промышленности [6]. Циклодекстрины повышают проницаемость биомембран [7], биодоступность, безопасность, эффективность, стабильность действующего вещества; дают возможность транспортировать белки, пептиды и гены через мембраны; расширяют спектр возможных способов доставки лекарств (через толстую кишку, легкие, трансдермально, назально) [8]. Наиболее часто используемыми ЦД являются α -, β - и γ -ЦД, состоящие из 6, 7 и 8 глюкопиранозных субъединиц, соответственно [9].

Модификации содержания холестерина в плазматической мембране возможны при использовании метил- β -циклодекстрина (МБЦД) [10], являющегося наиболее эффективным акцептором по сравнению с другими типами циклодекстринов [11]. МБЦД представляет собой циклический олигосахарид, состоящий из 7 α -(1-4)-связанных звеньев D-глюкопиранозы и содержащий гидрофобную полость, способную вмещать молекулу стерина (рис. 1) [12]. МБЦД при приближении к клеточной мембране способен захватывать холестерин как из стерол-обогащенных, так и из остальных участков мембран [13]. В случае воздействия концентрации МБЦД ≥ 5 мМ в течение длительного периода времени (≥ 30 мин), возможно удаление 80–90 % клеточного холестерина [14]. Onodera R. et al. и Roka E. et al. показали, что токсические эффекты циклодекстринов в высоких концентрациях обусловлены гемолизом эритроцитов, индуцированным экстракцией холестерина [8, 15].

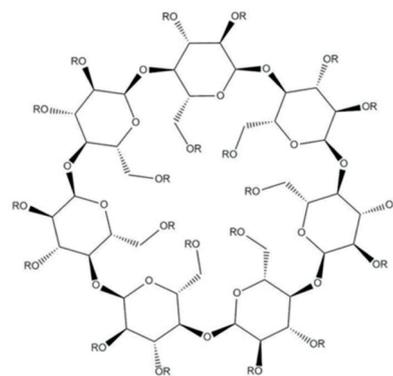


Рис. 1. Структура метил- β -циклодекстрина

Механизм действия МБЦД на биологические мембраны достаточно сложен, не ограничивается одним лишь изъятием стерола из липидного бислоя и нуждается в дальнейшем изучении. Следует также отметить, что как кислородтранспортная единица, эритроцит представляет собой взаимосвязанную и взаимообусловленную систему "мембрана – гемоглобин", и изменения состава, структуры, функционирования одного компонента отражаются на свойствах остальных [16].

Таким образом, для комплексной оценки влияния МБЦД на эритроцитарные клетки следует изучать не только прямые эффекты его воздействия, связанные с перестройками плазматической мембраны, но и косвенные, обусловленные возможными взаимодействиями МБЦД со внутриэритроцитарным гемоглобином.

В связи с изложенным выше целью нашей работы являлось исследование спектральных характеристик внутриэритроцитарного гемоглобина человека после воздействия метил- β -циклодекстрина в различных концентрациях на красные клетки крови.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали суспензию эритроцитов, выделенную из цельной крови доноров, полученной в филиале БУЗ ВО БСМП № 1 «Воронежская областная станция переливания крови». У всех обследуемых было получено добровольное информированное согласие на участие в эксперименте.

1 мл цельной крови смешивали с 4 мл 0.9 % раствора NaCl и осаждали на центрифуге MPW-340 (MPW Med Instruments, Польша) при 1500 об/мин в течение 10 мин. Эритроциты отмывали три раза четырехкратным объемом 0.9 % NaCl в указанном режиме. В экспериментах использовали суспензию клеток, оптическую плотность кото-

рой довели до $D_{490} = 0.7-0.8$ ед., что соответствовало концентрации 10^6 кл./мл [17].

К 1 мл суспензии эритроцитов добавляли МБЦД («Кем-Стор», Россия) в конечной концентрации от 3 до 5 мМ (с шагом 0.5 мМ) и инкубировали в стерильных условиях в суховоздушном термостате ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ») при $+37^\circ\text{C}$ в течение 15 минут [18].

Электронные спектры поглощения (ЭСП) растворов МБЦД и суспензий интактных и модифицированных эритроцитов регистрировали на автоматическом спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм. Для измерения использовали кварцевые кюветы толщиной 10 мм. Оптическую плотность регистрировали на протяжении всего исследуемого диапазона через 1 нм при ширине спектральной щели 1 нм [17].

Статистическую и графическую обработку результатов исследования проводили в пакете программ Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Электронные спектры поглощения растворов метил- β -циклодекстрина характеризовались наличием максимумов поглощения при 196, 200 и 205 нм.

На электронных спектрах поглощения суспензии нативных эритроцитов было выявлено два

максимума в УФ-области (274 и 346 нм) и три полосы поглощения в видимой части спектра (418, 543 и 578 нм), что соответствует спектру поглощения интрацеллюлярного оксигемоглобина. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными [19, 20].

После модификации эритроцитов метил- β -циклодекстрином в диапазоне концентраций 3.0–5.0 мМ на ЭСП исследуемых образцов были обнаружены новые полосы поглощения при 227–229 нм и зарегистрированы изменения положения характерных для интактных суспензий максимумов в ультрафиолетовой области спектра (рис. 2).

Так, после воздействия на суспензию эритроцитов МБЦД в концентрации 3.0 мМ наблюдался батохромный сдвиг пика поглощения, обусловленного ароматическими и серосодержащими аминокислотными остатками, до 280 нм; положение остальных полос не претерпело изменений. Увеличение концентрации модификатора до 3.5 мМ приводило к длинноволновому смещению апобелковой полосы поглощения до 283 нм, максимум при 346 нм также сдвинулся в область больших длин волн – до 349 нм. Дальнейшее повышение содержания МБЦД в образцах индуцировало сдвиг пика при 346 нм до 349 (при 4.0 мМ) – 352 (4.5 мМ) нм (рис. 2).

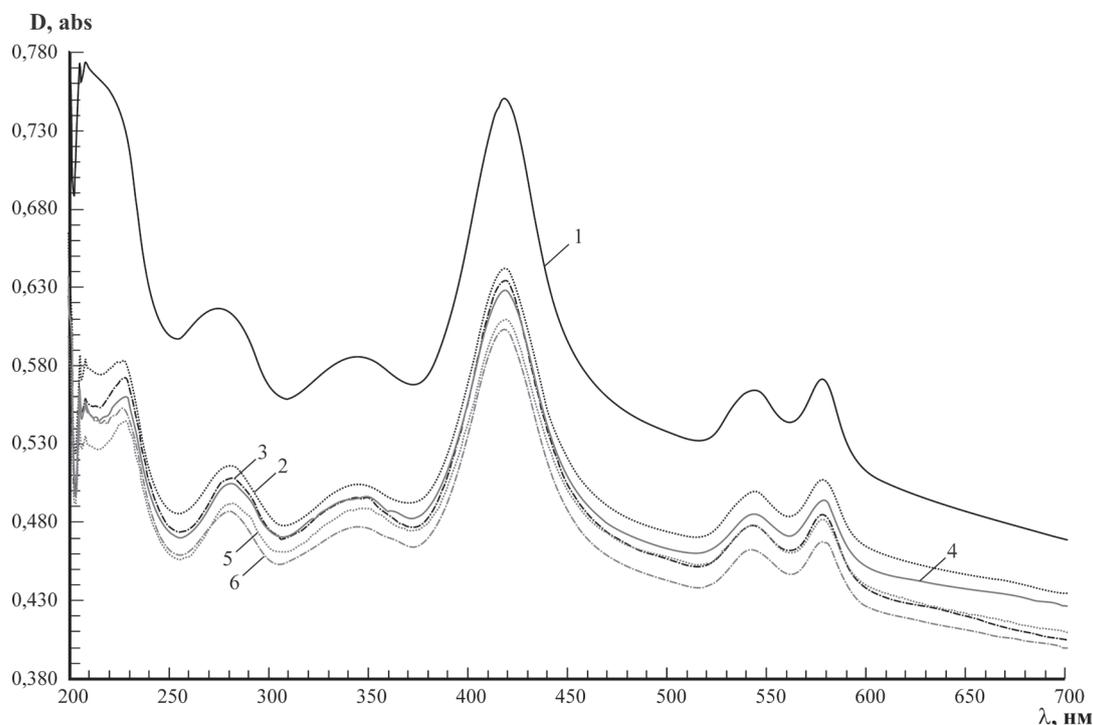


Рис. 2. Электронные спектры поглощения внутриэритроцитарного гемоглобина человека до и после воздействия растворов МБЦД в различных концентрациях. Обозначения: 1 – интактная суспензия эритроцитов; суспензии эритроцитов, модифицированные МБЦД в концентрациях: 2 – 3.0 мМ; 3 – 3.5 мМ; 4 – 4.0 мМ; 5 – 4.5 мМ; 6 – 5.0 мМ.

Следует отметить, что оптическая плотность образцов в диапазоне длин волн 200–450 нм после воздействия МБЦД снизилась по сравнению с контролем (рис. 2), причем с увеличением концентрации модифицирующего агента гипохромный эффект усиливался.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что МБЦД, очевидно, способен проникать через плазматическую мембрану и взаимодействовать с апобелковым компонентом гемоглобина. Индуцированные данным взаимодействием конформационные перестройки сопровождались компактизацией белковой глобулы, экспонированием на ее поверхность остатков триптофана, и частично затрагивали область гем-белковых контактов.

Анализ соотношения величин оптических плотностей в максимуме полосы Соре и в минимуме при 495-500 нм указывал на то, что в используемых концентрациях МБЦД не вызывал гемолиза эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с помощью метода УФ- и видимой спектрофотометрии было установлено, что при модификации суспензий эритроцитов растворами метил-β-циклодекстрина в концентрациях 3.0–5.0 мМ) происходили конформационные перестройки молекул внутриэритроцитарного гемоглобина, которые сопровождались компактизацией белковой глобулы, выходом остатков триптофана на ее поверхность и затрагивали область контактов порфиринового компонента и глобина. Окисления железа гема и образования метгемоглобина выявлено не было. Гемолитический эффект МБЦД в исследованном диапазоне концентраций не проявлялся.

Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости учета действия метил-β-циклодекстрина не только на липиды плазматической мембраны эритроцитов, но и на белковые компоненты клеток. Это связано с тем, что подобного рода эффекты могут оказывать существенное влияние на локализацию молекул гемоглобина в клетке путем регуляции способности гембелка к сорбции – десорбции на мембране, а, следовательно, модулировать кислородтранспортную функцию эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баяева Е.С., Артюхов В.Г. Биофизические и клинико-диагностические основы морфофункциональной организации эритроцитов: монография. Воронеж, ВГУ, 2020, 142 с.

2. Ross M.H., Wojciech P. Histology: Text and Atlas, LWW, 6th ed., 2011, p. 996.

3. Федин А.И., Василенко И.А., Бадалян К.Р. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. №. 9-2. С. 30-37.

4. Biswas D., Banerjee M., Sen G., Das J.K., Banerjee A., Sau T.J., Pandit S., Giri A.K., Biswas T. // Toxicol Appl Pharmacol. 2008. Vol. 230. № 1. P. 57-66.

5. Рабинович А.Л., Корнилов В.В., Балабаев Н.К., Леермакерс Ф.А.М., Филиппов А.В. // Биологические мембраны. 2007. Т. 24. № 6. С. 490-505.

6. Hu Y., Jiang L., Xing K., Li X., Sang S., McClements D. J., Chen L., Long J., Jiao A., Xu X., Wang J., Jin Z., Shang M., Qiu C. // Trends in Food Science & Technology. 2023. Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224423001474> (дата обращения 19.02.2023).

7. Марков А.Г., Бикмурзина А.Е., Федорова А.А., Кривой И.И. // Российский физиологический журнал. 2022. Т. 108. № 5. С. 677-685.

8. Róka E., Ujhelyi Z., Deli M., Bocsik A., Fenyvesi É., Sente L., Fenyvesi F., Vecsernyés M., Váradi J., Fehér P., Gesztelyi R., Félix C., Perret F., Bácskay I.K. // Molecules. 2015. № 20. 20269-20285.

9. Gadade D.D., Pekamwar S.S. // Adv Pharm Bull. 2020. № 10(2). P.166-183.

10. Ефремова Т.Н., Чубинский-Надеждин В.И., Хайтлина С.Ю., Морачевская Е.А. // Цитология. 2012. Т. 54. № 6. С. 508-514.

11. Wang R., Bi J., Ampah K.K., Ba X., Liu W., Zeng X. // Biochim Biophys Acta. 2013. Vol. 1833. № 12. P. 3195-3205.

12. Филатова Н.А., Чубинский-Надеждин В.И., Иванов В.А., Морачевская Е.А. // Цитология. 2010. Т. 52. № 12. С. 983-988.

13. Levitan I., Christian A.E., Tulenko T.N., Rothblat G.H. // The Journal of general physiology. 2000. Vol. 115. № 4. P. 405-416.

14. Zidovetzki R., Levitan I. // Biochim Biophys Acta. 2007. Vol. 1768. № 6. P. 1311-1324.

15. Onodera R., Motoyama K., Okamoto A., Higashi T., Arima, H. // Sci. Rep. 2013. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551233/> (дата обращения 19.02.2023).

16. Садчиков Д.В., Хоженко А.О. // Фундаментальные исследования. 2012. № 4-2. С. 356-360.

17. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Вашанов Г.А., Калаева Е.А., Лавриненко И.А., Наквасина М.А., Путинцева О.В., Радченко М.С., Резван С.Г. Практикум по биофизике. Воронеж, ВГУ, 2016, 314 с.

18. Литвинов Н.В., Соколова Л.О., Калаева Е.А., Наквасина М.А., Артюхов В.Г. // IX Международная

конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков : Сборник тезисов. Новосибирск, 2022, с. 365-366.

19. Соколова Л.О., Путинцева О.В., Калаева Е.А., Артюхов В.Г. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология.

Воронежский государственный университет
*Калаева Е. А., кандидат биол. наук, доцент
кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: kalaevae@gmail.com

Соколова Л. О., аспирант кафедры биофизики и биотехнологии

Литвинов Н. В., магистрант кафедры биофизики и биотехнологии

Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии

Путинцева О. В., доктор биол. наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии

Фармация. 2021. № 1.С. 122-132.

20. Калаева Е. А., Путинцева О. В., Артюхов В. Г., Корвякова П. В., Соколова Л. О. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2023. №1. С. 89-97.

Voronezh State University
Kalaeva E. A., PhD., Associate Professor,
Department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: kalaevae@gmail.com

Sokolova L.O., Postgraduate student, Department of Biophysics and Biotechnology

Litvinov N.V., Master of the Department of Biophysics and Biotechnology dept.

Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology

Putintseva O.V., DSci., Full Professor of the Department of Biophysics and Biotechnology

CHANGES IN THE SPECTRAL CHARACTERISTICS OF HUMAN BLOOD INTRA-ERYTHROCYTE HEMOGLOBIN INDUCED BY METHYL-B-CYCLODEXTRIN

E.A. Kalaeva, L.O. Sokolova, N.V. Litvinov, V.G. Artyukhov, O.V. Putintseva

Voronezh State University

Abstract. The ability of erythrocytes to be reversibly deformed when passing through the microcapillaries of the vascular bed is mainly provided by the lipid composition of the membrane, which determines its density, flexibility, permeability and other qualities. Cholesterol in the lipid bilayer regulates the degree of ordering and mobility of hydrocarbon chains of membrane phospholipids. It is possible to assess the role of sterols in maintaining the plasmalemma structure by targeting changes in cholesterol concentration in it using methyl- β -cyclodextrin (MbCD), which is a cyclic oligosaccharide consisting of 7 α -(1-4)-linked D-glucopyranose links and containing a hydrophobic cavity capable of accommodating a sterol molecule. For a comprehensive assessment of the effects of MBCD on erythrocyte cells, it is necessary to study not only the direct effects of its exposure associated with the rearrangement of the plasma membrane, but also indirect effects due to the possibility of interactions of MBCD with intraerythrocyte hemoglobin. The aim of this work was to investigate the spectral characteristics of human intraerythrocyte hemoglobin after exposure to methyl- β -cyclodextrin in different concentrations on red blood cell suspensions. Using UV- and visible spectrophotometry we found that the modification of red cell suspensions by methyl- β -cyclodextrin solutions in concentrations of 3.0-5.0 mM resulted in conformational changes of intraerythrocyte hemoglobin molecules accompanied by compactization of the protein globule, the appearance of tryptophan residues on its surface, and affected the contact area of globin with the porphyrin component. At the same time, the optical density of samples in the wavelength range of 200-450 nm after exposure to MbCD decreased compared with controls with increasing concentration of the modifying agent hypochromic effect increased. Heme iron oxidation and methemoglobin formation were not detected in the modified samples.

The hemolytic effect of MbCD did not manifest itself in the concentration range studied, as evidenced by the parameters of the values of optical densities in the maximum Sore band and the minimum at 495-500 nm.

Our data indicate the necessity to consider the effect of methyl- β -cyclodextrin not only on the lipids of the erythrocyte plasma membrane but also on the protein components of cells, since such effects may have a significant impact on the oxygen-transport function of erythrocytes.

Keywords: intraerythrocyte hemoglobin, methyl- β -cyclodextrin, plasma membrane, electronic absorption spectra, erythrocytes.

REFERENCES

1. Baeva E.S., Artyuhov V.G. Biofizicheskie i kliniko-diagnosticskie osnovy morfofunkcional'noj organizacii eritrocitov: monografiya. Voronezh, VGU, 2020, 142 s.
2. Ross M.H., Wojciech P. Histology: Text and Atlas, LWW, 6th ed., 2011, p. 996.
3. Fedin A.I., Vasilenko I.A., Badalyan K.R., Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova, 2015, Vol. 115, No. 9-2, pp. 30-37. DOI: 10.17116/jnevro20151159230-37
4. Biswas D., Banerjee M., Sen G., Das J.K., Banerjee A., Sau T.J., Pandit S., Giri A.K., Biswas T., Toxicol Appl Pharmacol, 2008, Vol. 230, No 1, pp. 57-66. DOI: 10.1016/j.taap.2008.02.003
5. Rabinovich A.L., Kornilov V.V., Balabaev N.K., Leermakers F.A.M., Filippov A.V., Biological Membranes, 2007, Vol. 24, No 6, pp. 490-505.
6. Hu Y., Jiang L., Xing K., Li X., Sang S., McClements D. J., Chen L., Long J., Jiao A., Xu X., Wang J., Jin Z., Shang M., Qiu C., Trends in Food Science & Technology, 2023. DOI:10.1016/j.tifs.2023.05.009 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224423001474> (accessed 19.02.2023).
7. Markov A.G., Bikmurzina A.E., Fedorova A.A., Krivoy I.I., Russian Physiological Journal, 2022, Vol. 108, No 5, pp. 677-685.
8. Róka E., Ujhelyi Z., Deli M., Bocsik A., Fenyvesi É., Sente L., Fenyvesi F., Vecsernyés M., Váradi J., Fehér P., Gesztelyi R., Félix C., Perret F., Bácskay I.K., Molecules, 2015, No. 20, pp. 20269-20285. DOI: 10.3390/molecules201119694.
9. Gadade D.D., Pekamwar S.S. //Adv Pharm Bull, 2020, No 10 (2), pp. 166-183. DOI: 10.34172/apb.2020.022.
10. Efremova T.N., Chubinsky-Nadezhdin V.I., Haitlina S.Yu., Morachevskaya E.A., Cytology, 2012, Vol. 54, No 6, pp. 508-514.
11. Wang R., Bi J., Ampah K.K., Ba X., Liu W., Zeng X., Biochim Biophys Acta, 2013, Vol. 1833, No. 12, pp. 3195-3205. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.007
12. Filatova N.A., Chubinskij-Nadezhdin V.I., Ivanov V.A., Morachevskaya E.A., Citologiya, 2010, Vol. 52, No. 12, pp. 983-988.
13. Levitan I., Christian A.E., Tulenko T.N., Rothblat G.H., J Gen Physiol, 2000, Vol. 115, No. 4, pp. 405-416. DOI: 10.1085/jgp.115.4.405
14. Zidovetzki R., Levitan I., Biochim Biophys Acta, 2007, Vol. 1768, No.6, pp. 1311-1324.
15. Onodera R., Motoyama K., Okamatsu A., Higashi T., Arima, H., Sci. Rep. 2013. DOI: 10.1038/srep01104. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551233/> (accessed 19.02.2023).
16. Sadchikov D.V., Khozhenko A.O., Fundamental studies, 2012, No 4-2, pp. 356-360.
17. Artyuhov V.G., Basharina O.V., Vashanov G.A., Kalaeva E.A., Lavrinenko I.A., Nakvasina M.A., Putinceva O.V., Radchenko M.S., Rezvan S.G. Praktikum po biofizike. Voronezh, VGU, 2016, 314 s.
18. Litvinov N.V., Sokolova L.O., Kalaeva E.A., Nakvasina M.A., Artyuhov V.G., IX International Conference of Young Scientists: Virologists, Biotechnologists, Biophysicists, Molecular Biologists and Bioinformaticians : Abstracts, Novosibirsk, 2022, pp. 365-366.
19. Sokolova L.O., Putinceva O.V., Kalaeva E.A., Artyuhov V.G., Vestnik Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2021, No. 1, pp. 122-132.
20. Kalaeva E.A., Putinceva O.V., Artyuhov V.G., Korvyakova P.V., Sokolova L.O., Vestnik Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2023, No. 1, pp. 89-97.