

Кинетические закономерности гемолиза эритроцитов и окисления гемоглобина под действием сера-нитрозильных комплексов железа — доноров оксида азота

Н. И. Нешев,* Б. Л. Психа, Е. М. Соколова, Н. А. Санина, Т. Н. Руднева, С. В. Блохина

Институт проблем химической физики Российской академии наук,
Российская Федерация, 142432 Черноголовка Московской обл., просп. Акад. Семенова, 1.
Факс: (496) 522 3507. E-mail: Neshev@list.ru

Исследована кинетика гемолиза эритроцитов и окисления внутриэритроцитарного гемоглобина под действием синтетических сера-нитрозильных комплексов железа, способных выделять оксид азота в результате спонтанного гидролитического разложения. Добавление этих комплексов к 0.2%-ной суспензии эритроцитов мыши приводит к гемолизу. На кинетических кривых гемолиза наблюдается индукционный период, продолжительность которого для каждого комплекса различна. Гемолизу предшествует окисление гемоглобина проникающим внутрь клетки оксидом азота, которое описывается кинетическим уравнением первого порядка. Определены эффективные константы скорости реакции первого порядка, характеризующие NO-донирующую способность каждого комплекса. Предполагается, что гемолитический эффект исследуемых комплексов связан с образующимся внутри эритроцитов цитотоксичным продуктом взаимодействия оксида азота и супероксидного анион-радикала — пероксинитритом.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, гемоглобин, сера-нитрозильные комплексы железа, оксид азота, пероксинитрит.

Оксид азота в качестве сигнальной молекулы осуществляет в организме важнейшие биологические функции, связанные прежде всего с модуляцией уровня кровяного давления, ингибированием тромбообразования, передачей нервных импульсов, неспецифической иммунной защитой¹. В то же время наблюдаемое во многих случаях избыточное образование оксида азота вызывает цитотоксичность, направленную против собственного организма и выступающую в качестве ведущего патогенетического фактора многих воспалительных и нейродегенераторных заболеваний². Основным источником цитотоксичности, как правило, является не сам оксид азота, а продукты сложных химических превращений, которые происходят в организме в силу высокой реакционной способности NO (см. лит.³). В связи с этим актуальность приобретает исследование химических и биохимических механизмов реализации цитотоксического потенциала оксида азота в различных типах клеток и тканей.

Целью данной работы было исследование кинетики и механизма гемолиза эритроцитов под действием сера-нитрозильных комплексов железа (СНКЖ) — доноров оксида азота.

Экспериментальная часть

Материалы. В качестве источника крови были использованы мыши линии С 57 В1/6f (возраст 3 месяца, вес 18–20 г).

В качестве доноров оксида азота использовали биядерные сера-нитрозильные комплексы железа с различными функциональными лигандами⁴. На рисунке 1 показано кристаллическое строение одного из исследуемых комплексов (комплекс ПИМ, см. ниже) по данным рентгено-структурного анализа. В основе строения данного и всех остальных СНКЖ лежит характерная тетрагональная мостиковая структура, включающая два атома железа, которые связаны с двумя NO-группами каждый, и два атома серы, связанные с характерными для каждого комплекса функциональными лигандами. В данной работе были использованы шесть таких комплексов, отличающихся входящими в их состав серосодержащими лигандами: анионный тио-

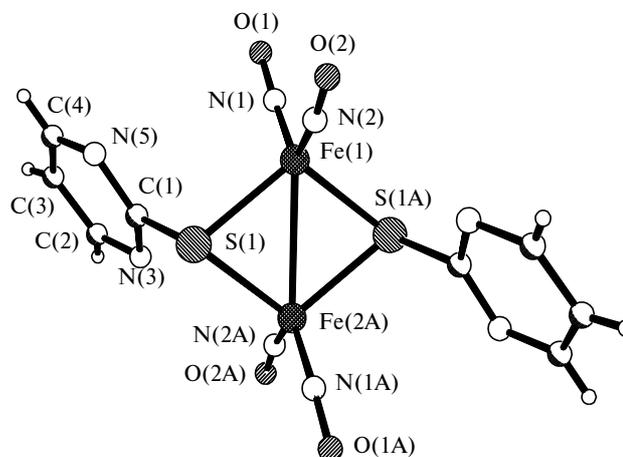


Рис. 1. Кристаллическое строение комплекса $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO}_4)]$, R — пиримидин-2-ил (ПИМ).

сульфатный нитрозильный комплекс железа (ТНКЖ) состава $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; нейтральные нитрозильные комплексы железа состава $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$ (R — пиридин-2-ил (ПИМ), 1-метилимидазол-2-ил (МИМ), бензотиазол-2-ил (БТЗ)) и катионные нитрозильные комплексы железа состава $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]\text{SO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (R — цистеин-амин (ЦАК), $n = 2, 5$ и пенициламин (ПЕН), $n = 5$). Выделение оксида азота указанными комплексами не требует специальной активации (фото-, термо- или ферментативной) и происходит спонтанно в ходе гидролитического распада комплекса⁵. Комплексы вводили в суспензию эритроцитов в растворах в воде (ТНКЖ, ЦАК, ПЕН) или в ДМСО (БТЗ, МИМ, ПИМ), которые готовили непосредственно перед опытом. Весовая концентрация ДМСО в образце не превышала 3%.

Получение эритроцитарной массы. Забор крови производили от предварительно наркотизированной эфиром мыши посредством ее декапитации. В качестве антикоагулянта использовали 0.11 M раствор цитрата натрия. Кровь собирали в склянку, куда предварительно добавляли раствор антикоагулянта, соблюдая соотношение цитрат натрия : кровь = 1 : 5.

Кровь центрифугировали при $1500 \times g$ при 4°C в течение 10 мин. Плазму декантировали, осадок эритроцитов осторожно ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl (0.85% NaCl, содержащий 5 mM Na-фосфатного буфера, pH 7.4). Операцию центрифугирования повторяли трижды. После каждого центрифугирования супернатант декантировали, осадок эритроцитов ресуспендировали в новой порции изотонического раствора NaCl. Эритроцитарную массу, полученную после последнего центрифугирования, хранили при 4°C и использовали в экспериментах в течение 36 ч.

Гемолиз эритроцитов. В экспериментах использовали суспензию эритроцитов, которую готовили непосредственно перед опытом путем разбавления эритроцитарной массы изотоническим раствором NaCl приблизительно в 500 раз. В полученной суспензии определяли концентрацию клеток путем подсчета в счетной камере Горяева. Полученную концентрацию доводили до стандартного для всех опытов значения $4.4 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл (примерно соответствует гематокриту $H = 0.2\%$) путем дополнительного разбавления. Гемолитические эксперименты проводили с термостатированием образцов при 37°C при непрерывном слабом помешивании. За ходом гемолиза эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензии при длине волны 700 нм. С учетом того, что данная длина волны лежит за пределами области электронного поглощения основного молекулярного компонента системы — гемоглобина, ослабление светового потока практически полностью связано с рассеянием света на эритроцитах. При этом оптическая плотность суспензии эритроцитов при $\lambda = 700$ нм при используемом нами уровне разбавления линейно зависит от доли разрушенных клеток^{6,7}. Степень гемолиза (γ) суспензии эритроцитов определяли из соотношения:

$$\gamma = \frac{A_0 - A}{A_0 - A_{\text{H}_2\text{O}}}, \quad (1)$$

где A_0 и A — оптические плотности соответственно контрольного и опытного образца, содержащего СНКЖ; $A_{\text{H}_2\text{O}}$ — оптическая плотность образца в условиях полного лизиса всех эритроцитов дистиллированной водой. Во всех экспериментах оптическая плотность контрольного образца (A_0) составляла 0.8.

Определение метгемоглобина. Из суспензии эритроцитов ($3.5 \cdot 10^8$ клеток \cdot мл⁻¹), осторожно перемешиваемой на магнитной мешалке при температуре 37°C , отбирали али-

квоты по 0.4 мл, к которым добавляли 1.4 мл дистиллированной воды, выдерживали в течение 1 мин до завершения гемолиза и измеряли оптическое поглощение при 630 нм. Концентрацию метгемоглобина определяли по формуле:

$$[\text{HbFe}^{3+}] = \frac{\Delta A_{630}}{\epsilon_{\text{met}} - \epsilon_{\text{oxy}}} d, \quad (2)$$

где ΔA_{630} — прирост оптического поглощения образца при 630 нм, $\epsilon_{\text{met}} = 3.8$ ммоль⁻¹ \cdot см⁻¹ и $\epsilon_{\text{oxy}} = 0.11$ ммоль⁻¹ \cdot см⁻¹ — коэффициенты экстинкции⁸ метгемоглобина и оксигемоглобина соответственно при 630 нм, d — коэффициент разбавления в кювете.

Обсуждение полученных результатов

Влияние СНКЖ на гемолиз эритроцитов было изучено в широком диапазоне концентраций. Пять из шести изученных комплексов показали гемолитический эффект, величина которого зависит от концентрации комплекса. На рисунке 2 показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов, полученные при одной и той же концентрации исследуемых соединений ($4 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л⁻¹). В качестве индивидуальной кинетической характеристики гемолитической активности исследуемых комплексов использовали продолжительность периода индукции гемолиза (I), который определяется как время достижения 10% гемолиза ($\gamma = 0.1$). Периоды индукции гемолиза для соответствующих комплексов приведены в таблице 1. Как видно из рисунка 2, один из изученных нами комплексов, ПЕН, не показал гемолитического действия ни при указанной выше концентрации, ни при более высоких концентрациях, вплоть до 10^{-4} моль \cdot л⁻¹.

При проведении гемолитических экспериментов часто наблюдали изменение окраски суспензии эритроцитов, происходившее до начала гемолиза, что могло свидетельствовать о химических изменениях внутри клетки. Известно, что оксид азота способен быстро реагировать с оксигемоглобином в свободном ра-

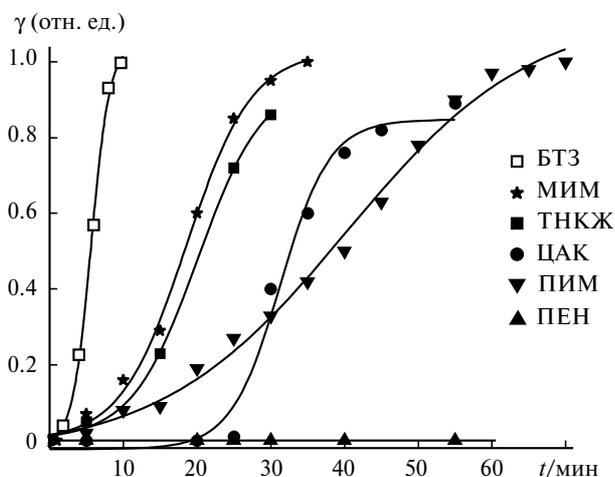


Рис. 2. Кинетика гемолиза эритроцитов под действием СНКЖ с различными функциональными лигандами (концентрация эритроцитов в суспензии 0.2%, содержание клеток $4.4 \cdot 10^7$ клеток \cdot мл⁻¹, 37°C).

Таблица 1. Гемолитическая активность и NO-донирующая способность СНКЖ

Комплекс	Период индукции гемолиза (I/мин)	$k \cdot 10^{-3} / \text{с}^{-1}$
ЦАК	25	1.2 ± 0.8
ТНКЖ	10.5	7.0 ± 1.5
ПИМ	14	9.6 ± 1.7
МИМ	9	11 ± 2.5
БТЗ	3	8.6 ± 3.5
ПЕН	—*	55 ± 9

* Гемолитический эффект отсутствует.

створе с образованием метгемоглобина и нитрат-аниона⁹. С учетом того, что клеточные мембраны не являются серьезным препятствием для диффузии оксида азота¹⁰, в нашем случае можно было ожидать протекания указанной реакции внутри эритроцитов еще до их разрушения. Спектрофотометрическое исследование гемолизатов выявило ряд спектральных изменений, характерных для протекающего в системе процесса окисления оксигемоглобина в метгемоглобин.

На рисунке 3 показаны кинетические кривые, характеризующие накопление метгемоглобина внутри эритроцитов. Накопление метгемоглобина в присутствии каждого из исследуемых соединений протекает с разной скоростью, что может быть связано с различиями в скоростях гидролиза исследуемых комплексов (см. рис. 3). Анализ полученных данных показал, что кинетика образования метгемоглобина хорошо описывается уравнением первого порядка

$$[\text{HbFe}^{3+}] = [\text{HbFe}^{3+}]_{\infty} \cdot (1 - e^{-kt}), \quad (3)$$

где t — время, $[\text{HbFe}^{3+}]$ — концентрация метгемоглобина, k — константа скорости реакции первого порядка, $[\text{HbFe}^{3+}]_{\infty}$ — предельное значение концентрации метгемоглобина при $t \rightarrow \infty$.

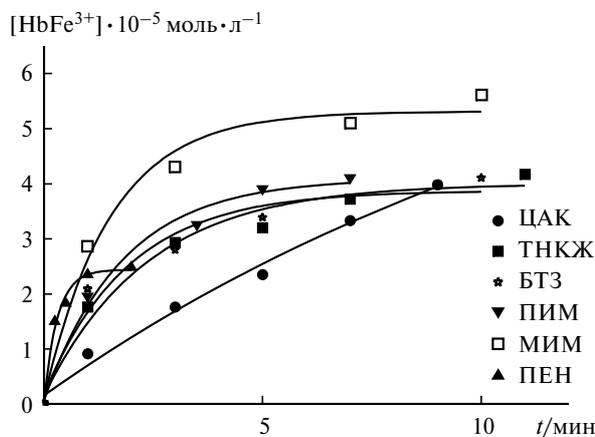


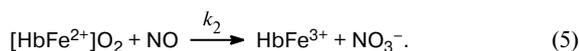
Рис. 3. Кинетика образования метгемоглобина внутри эритроцитов под действием СНКЖ (содержание гемоглобина в суспензии $2 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹; концентрация ПЕН $2 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л⁻¹, концентрация остальных СНКЖ — $1.2 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹).

Константы скорости образования метгемоглобина первого порядка (k) приведены в таблице 1.

Самопроизвольный распад железо-серных комплексов данного класса с донированием NO (см. лит.⁵) подчиняется уравнению первого порядка, а константа скорости близка к 10^{-3} с⁻¹.



Выделяющийся оксид азота, проникая внутрь клетки, способен, как уже отмечалось выше, быстро реагировать с оксигемоглобином

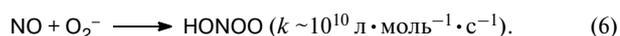


При поступлении оксида азота в суспензию эритроцитов данная реакция протекает с меньшей, чем в свободном растворе¹⁰, но все же со значительной константой скорости, равной $5.16 \cdot 10^4$ с⁻¹.

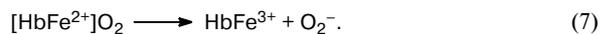
Распад СНКЖ и последующее взаимодействие выделившегося оксида азота с гемоглобином внутри эритроцита можно, таким образом, рассматривать как два последовательных процесса, характеризующихся резко различающимися константами скоростей: k_2 превышает k_1 более чем на семь порядков. Вероятно, в данной системе оксигемоглобин может выступать в качестве эффективной ловушки оксида азота, выделяющегося из СНКЖ. Определенные нами константы скорости образования метгемоглобина в эритроцитах (см. табл. 1) могут служить мерой NO-донирующей способности исследуемых СНКЖ различной структуры. Данная характеристика может быть использована для анализа взаимосвязи структура—активность в рядах синтезируемых комплексов, а также при первичном отборе СНКЖ для последующего углубленного изучения их фармакологической активности.

Рассмотрим взаимосвязь между NO-донирующей и гемолитическими активностями исследуемых комплексов. Как видно из таблицы 1, наиболее слабый NO-донор, ЦАК ($k_2 = 1.2 \pm 0.8 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹), является одновременно наиболее слабым гемолитиком ($I = 25$ мин). Четыре других СНКЖ — ТНКЖ, ПИМ, МИМ и БТЗ — являющиеся более сильными NO-донорами (k_2 находится в пределах $(7-11) \cdot 10^{-3}$ с⁻¹), являются более сильными гемолитиками (I находится в пределах 3—14 мин). В то же время самый сильный донор NO, ПЕН ($k_2 = 55 \pm 9 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹), не показал гемолитического эффекта. Таким образом, зависимость между константами скорости донирования NO и гемолитическим действием исследуемых комплексов имеет экстремальный характер.

В литературе есть много свидетельств того, что основным источником цитотоксичности оксида азота является не сам NO, а продукт сверхбыстрого, диффузионно контролируемого бимолекулярного взаимодействия оксида азота и супероксидного анион-радикала — пероксинитрит¹¹



Источником супероксида для реакции (6) может служить непрерывно протекающая в эритроцитах реакция автоокисления оксигемоглобина



С учетом имеющихся в литературе данных о гемолитическом действии синтетического пероксинитрита в системе *in vitro*¹² можно предположить, что в нашем случае непосредственным инициатором гемолиза может выступать пероксинитрит, образующийся в реакции (6). Скорость образования в клетке пероксинитрита, очевидно, зависит от соотношения скоростей реакций (5), (6) и (7). В частности, реакции (5) и (7), в которых исходным реагентом выступает одно и то же вещество — оксигемоглобин, могут конкурировать друг с другом. В таком случае расходование оксигемоглобина в реакции (5) может снижать возможности клетки образовывать супероксидный анион-радикал по реакции (7), что в свою очередь должно приводить к снижению уровня образования клеткой пероксинитрита в реакции (6). С учетом этого может получить объяснение наблюдаемая нами экстремальная зависимость между NO-донирующей способностью и гемолитической активностью исследованных СНКЖ. В частности, причиной полного отсутствия гемолитического эффекта у самого эффективного донора оксида азота, ПЕН, может быть быстрое израсходование в реакции с оксидом азота оксигемоглобина, являющегося источником супероксида в эритроците.

Как показывают результаты данной работы, пусковым механизмом гемолиза эритроцитов в присутствии доноров оксида азота является, по-видимому, образование в клетке пероксинитрита. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе представлениями о пероксинитрите как важном источнике цитотоксичности, связанной с метаболизмом

оксида азота в живых организмах¹³. При этом реализация цитотоксического потенциала пероксинитрита происходит, по-видимому, через активацию оксидативного процесса внутри эритроцита, конкретный механизм которого требует дальнейших исследований.

Список литературы

1. N. S. Bryan, K. Bian, F. Murad, *Frontiers in Bioscience*, 2009, **14**, 1.
2. P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet, *Physiol. Rev.*, 2007, **87**, 315.
3. D. A. Wink, K. M. Miranda, M. G. Espey, *Exp. Biol. Med. (Maywood, NJ, USA)*, 2001, **226**, 621.
4. Н. А. Санина, С. М. Алдошин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2004, 2326 [*Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, 2004, **53**, 2428].
5. N. A. Sanina, L. A. Syrtsova, N. I. Shkondina, T. N. Rudneva, E. S. Malkova, T. A. Bazanov, A. I. Kotel'nikov, S. M. Aldoshin, *Nitric Oxide*, 2007, **16**, 181.
6. J. D. Young, L. G. Leong, M. A. DiNome, Z. A. Gohn, *Anal. Biochem.*, 1986, **154**, 649.
7. A. Ilani, R. Granoth, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1990, **1027**, 199.
8. W. G. Zijlstra, A. Buursma, W. P. Meeuwssen-van der Roest, *Clin. Chem. (Washington, DC, USA)*, 1991, **37**, 1633.
9. R. F. Eich, T. Li, D. D. Lemon, D. H. Doherty, S. R. Curry, J. F. Aitken, A. J. Mathews, K. A. Jonson, R. D. Smith, G. N. J. Phillips, J. S. Olson, *Biochemistry*, 1996, **35**, 6976.
10. X. Liu, M. J. S. Miller, M. S. Joshi, H. Sadowska-Krowicka, D. A. Clark, J. R. Lancaster, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 18709.
11. J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 1620.
12. H. Kondo, M. Takahashi, E. Niki, *FEBS Lett.*, 1997, **413**, 236.
13. G. Ferrer-Sueta, R. Radi, *ACS Chem. Biol.*, 2009, **4**, 161.

Поступила в редакцию 10 ноября 2010;
после доработки — 25 ноября 2010