П А Т О Ф И З И О Л О Г И Я

УДК 577.352.3

Г.П. ЗУБРИЦКАЯ[1], Ю. М. ГАРМАЗА[1], И. В. ПАТЕЮК[2], А.Г. КУТЬКО[1], Н.П. МИТЬКОВСКАЯ[2], Е. И. СЛОБОЖАНИНА[1]

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АМИЛОИДОВ *IN VITRO* И У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

[1]ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси", Минск, Беларусь
[2]УО "Белорусский государственный медицинский университет", Минск, Беларусь

Обнаружено, что амилоидные фибриллы лизоцима, взаимодействуя с эритроцитами человека *in vitro*, модифицируют структурное состояние их мембран, проявляющееся в увеличении микровязкости мембранных липидов и ингибировании процессов ПОЛ на фоне активации ферментов системы антиоксидантной защиты клеток. Сходные разнонаправленные изменения активности ферментов системы антиоксидантной защиты и микровязкости липидов в мембранах эритроцитов обнаружены и у пациентов с сахарным диабетом II типа, что можно объяснить повышением общей антиоксидантной активности плазмы крови.

Ключевые слова: эритроциты человека, амилоидные фибриллы, антиоксидантная активность, сахарный диабет II типа, микровязкость липидного бислоя.

Введение. Амилоидные отложения играют центральную роль в патогенезе таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, прионные болезни и др. [3, 8, 14]. При сахарном диабете (СД) II типа образование амилоида также является одним из звеньев патогенеза. У пациентов с данным заболеванием имеется недостаточная секреция гормона амилина, обладающего важнейшими физиологическими свойствами. Амилин секретируется параллельно с инсулином β-клетками поджелудочной железы. Его накопление в данных клетках приводит к образованию амилоида, что может существенным образом сказаться на функциональной активности β-клеток и даже привести к их гибели. Связь между накоплением амилоида и развитием СД II типа изучена недостаточно из-за отсутствия возможности получения данных *in vivo* [12, 21, 23,]. Механизмы токсичного действия амилоидных фибрилл на клетки крови и их роль в развитии амилоидозов до сих пор мало исследованы.

Целью данной работы явилось проведение сравнительного исследования модификации структурно-функционального состояния мембран эритроцитов человека под влиянием амилоидных фибрилл *in vitro*, а также эритроцитов, выделенных из периферической крови пациентов с СД II типа для выяснения возможного влияния появившихся в организме амилоидных структур *in vivo.*

Материалы и методы. Эксперименты *in vitro* проведены на эритроцитах условно здоровых доноров и изолированных из них мембранах. Кровь доноров предоставлена РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий Минздрава Республики Беларусь. В работе использована также периферическая кровь пациентов УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска с СД II типа (n=20). Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000 g 10 мин и трижды отмывали в 155 мМ NaCl. Амилоидные структуры были получены по методу M. Malisanskas и соавт. [20] из растворенного лизоцима куриного яйца в 10 мМ HCl, pH 2,0 при 60ºС в течение семь суток при постоянном перемешивании. В экспериментах *in vitro* эритроциты человека предварительно инкубировали в течение 3 ч при 37º С с амилоидными структурами лизоцима.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу, основанному на окислении кверцетина [17], активность глутатионпероксидазы (ГП) – по методу В.М. Моин [7], а каталазы – по методу Е.А. Косенко и соавт. [5]. Уровень восстановленного глутатиона (GSH) определяли по методу G.L. Ellman [15].

Оценку общей антиоксидантной активности (ОАА) плазмы крови проводили с помощью коммерческого набора «Antioxidant assay kit» (Sigma, США) по протоколу, описанному в работе

Ю.М. Гармаза и соавт. [1]. Об изменении физического состояния липидов в мембранах эритроцитов, выделенных по методу J.T. Dodge и соавт. [13], судили по поляризации флуоресценции (Р) липофильного зонда 1-(4-триметиламмоний-фенил)-6-фенил-1,3,5-гексатриена (ТМА-ДФГ, Sigma) [18]. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре «СМ2203» ("СОЛАР", Беларусь), а спектрофотометрические – на спектрофотометре Specord M-40 (Германия) и универсальном анализаторе «VICTOR2™» (Perkin Elmer, США).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение. Ранее было показано, что взаимодействие амилоидных структур с клеточной мембраной приводит к модификации ее структурного состояния. Предварительная инкубация эритроцитов человека в течение 3 ч при 37º С с амилоидными структурами лизоцима вызывала снижение уровня содержания МДА в клетках по сравнению как с контрольными эритроцитами, так и с эритроцитами, предварительно проинкубированными такое же время с раствором лизоцима [6]. Полученные результаты согласуются с данными литературы о снижении процессов ПОЛ в эритроцитах пациентов с болезнью Альцгеймера [2]. Мы предположили, что угнетение процессов ПОЛ в эритроцитах, подвергшихся воздействию амилоидных структур, возможно вследствие физико-химического взаимодействия их с липидным бислоем мембраны. Оценка микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов с помощью ТМА-ДФГ в экспериментах как *in vitro* (при действии амилоидных структур), так и *in vivo* (у пациентов с СД II типа), выявила однонаправленные изменения. Известно, что зонд ТМА-ДФГ обладает интенсивной флуоресценцией и чувствителен к физическому состоянию липидов в мембранах, а значение его поляризации флуоресценции прямо пропорционально изменению микровязкости гидрофильной области липидного бислоя мембран [22]. Как видно из рисунка 1, в мембранах эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидов из лизоцима *in vitro,* происходит увеличение поляризации флуоресценции липофильного зонда ТМА-ДФГ, что свидетельствует о снижении текучести липидного бислоя под влиянием амилоидных структур.

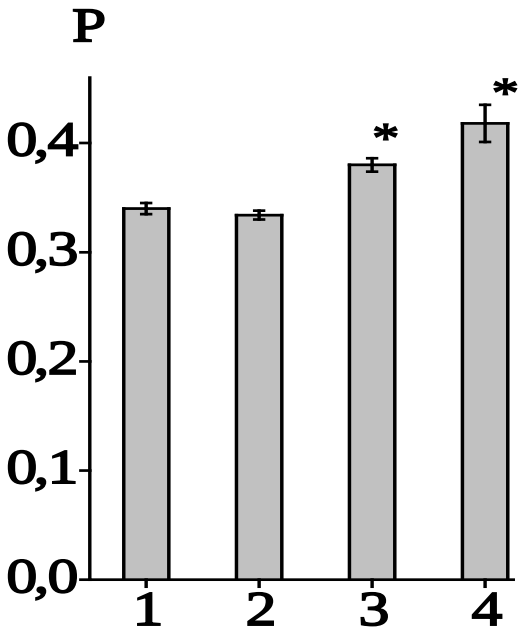

Рис. 1. Поляризация флуоресценции (Р) ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны эритроцитов условно здоровых доноров, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл, и эритроцитов, изолированных из периферической крови пациентов с СД II типа: 1 – интактные изолированные мембраны эритроцитов (контроль1); 2 – изолированные мембраны, подвергшиеся воздействию лизоцима в течение 3 ч (контроль 2); 3 – изолированные мембраны эритроцитов, подвергшиеся воздействию амилоидных структур из лизоцима в течение 3 ч; 4 – изолированные мембраны эритроцитов пациентов с СД II типа. *Достоверность различий по отношению к контролю 1 и 2 (p <0,01)

При сравнительном исследовании величин поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ, включенного в изолированные мембраны эритроцитов условно здоровых доноров и пациентов с СД II типа, обнаружено повышение этого показателя в патологических мембранах, что указывает также на снижение текучести (повышение микровязкости) мембранных липидов эритроцитов *in vivo* (рис. 1). Поскольку при СД II типа островковые клетки начинают выделять амилоидные пептиды или амилин, который секретируется так же, как и инсулин, а островки Лангерганса обильно снабжены кровеносными сосудами, то можно предположить, что наряду с легко проникающим в кровеносное русло инсулином туда могут поступать и амилоидные пептиды. Кроме этого, накопление амилоидных пептидов в бета-клетках поджелудочной железы приводит к их гибели из-за апоптоза, при этом накопление амилоида является одним из частных патологических изменений островковых клеток, имеющихся у пациентов с СД II типа. Он обнаруживается как минимум в одном островке более чем у 90% больных. В то же время у лиц без нарушения углеводного обмена в возрасте старше 60 лет накопление амилоида наблюдается лишь в 15% случаев [12, 21].

Другой причиной, приводящей к ингибированию процессов ПОЛ, может являться модификация системы антиоксидантной защиты (АОЗ) клеток. Поэтому был проведен сравнительный анализ активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, ГП), а также содержания GSH в эритроцитах как *in vitro* после взаимодействия клеток с амилоидными структурами, так и *in vivo* (у пациентов с СД II типа).

Как известно, наиболее важным фактором в оксигенации является способность эритроцитов к переносу кислорода, которая, в свою очередь, зависит от энергетического и антиоксидантного статуса клеток. Поскольку эритроциты находятся в постоянном контакте с амилоидными пептидами, локализованными в сосудах мозга или в тканях, мы предположили, что такое взаимодействие может приводить к изменению их метаболизма и антиоксидантного статуса. В литературе описаны изменения в антиоксидантной системе эритроцита, в ее ферментативной части и системе глутатиона, в метаболизме клеток и структуре мембраны при действии коммерческого амилоидного пептида Аβ25-35 [11]. Показано, что активность ГП в эритроцитах при их инкубации с Аβ25-35 в среде, содержащей глюкозу, не меняется в течение всего периода воздействия, но достоверно снижается и достигает максимального ингибирования к концу инкубационного периода в среде, не содержащей глюкозу. Также имеются данные об изменении антиоксидантного состояния эритроцитов при старении и болезни Альцгеймера. Установлено, что при старении в эритроцитах усиливаются свободнорадикальные процессы, что проявляется в снижении отношения GSH/GSSG и активности глутатионтрансферазы. Также снижена активность ГП у пациентов с болезнью Альцгеймера, что служит новым маркером данной патологии [4]. В наших исследованиях выявлено, что в эритроцитах, подвергшихся *in vitro* воздействию амилоидных фибрилл в течение 3 ч при 37º С, происходит ингибирование активности ГП на фоне активации каталазы (которым принадлежит роль в утилизации липидных гидроперикисей и пероксида водорода) и увеличения концентрации GSH (главного низкомолекулярного антиоксиданта эритроцитов) по сравнению с интактными эритроцитами доноров. Уровень активности СОД в эритроцитах, обработанных амилоидами, практически не изменялся по сравнению с контрольной группой (таблицf). В то же время сравнительный анализ выявил разнонаправленные изменения активности ферментов АОС эритроцитов *in vitro* и *in vivo*. Так, в эритроцитах пациентов с СД II типа активность ГП повышалась, а каталазы – снижалась по сравнению с нормой.

Стоит отметить, что если концентрация GSH в экспериментах *in vitro* (эритроциты, подвергшиеся воздействию амилоидов) была увеличена в среднем на 50–60 %, то в экспериментах *in vivo* (эритроциты пациентов с СД II типа) – рост составил 15–20%. Полученные результаты можно объяснить тем фактом, что при высокой скорости образования пероксида водорода в клетках преобладает каталазная активность, а при низкой скорости – пероксидазная [9]. Таким образом, преобладание каталазной активности в экспериментах *in vitro* и пероксидазной *in vivo* можно охарактеризовать в первом случае как «острое» действие амилоидных структур на эритроциты человека и во втором случае – как хроническое, при котором в организме запускаются адаптационные реакции.

Известно, что неферментативные антиоксиданты, такие как альбумин, α-токоферол, аскорбиновая кислота, билирубин и др. формируют сеть антиоксидантов плазмы крови, изучение которых является необходимым при оценке антиоксидантного статуса организма человека *in vivo* [19].

Таблица. Состояние системы антиоксидантной защиты эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур *in vitro* и *in vivo* у пациентов с СД II типа

Показатель	**Контроль (эритроциты здоровых доноров)**	**Эритроциты, подвергшиеся воздействию амилоидных структур *in vitro***	**Эритроциты пациентов с СД II типа**
Активность глутатионпероксидазы, **%**	100	50±6,6*	120±7,8*
Активность каталазы, **%**	100	120±3,5*	60±4,2*
Активность супероксиддисмутазы, %	100	105±5,5	110±6,2
Уровень содержания восстановленного глутатиона, %	100	160±5,5*	120±5,9*

За 100 % приняты значения исследованных параметров в эритроцитах условно здоровых доноров.*Достоверность различий показателей по сравнению с таковыми в контроле (p<0,05)

Однако большое их количество в плазме крови создает определенные трудности в изучении каждого антиоксиданта в отдельности. Из предложенных в последнее десятилетие разнообразных методов интегральной оценки ОАА биологических жидкостей наиболее удачным считается метод «тролокс-эквивалент антиоксидантной активности» (ТЭАА), основанный на модельной системе «метмиоглобин–H_2O_2–АБТС–тролокс» [16]. При его использовании обнаружено увеличение ОАА плазмы крови пациентов, страдающих СД II типа, по сравнению с группой условно здоровых доноров. Как видно из рисунка 2 , наблюдается достоверное (p<0,05) увеличение ОАА плазмы крови на 25–30 % у пациентов с СД II типа, которое составило 0,867±0,055 мМ по сравнении с 0,68±0,08 мМ – в группе условно здоровых доноров.

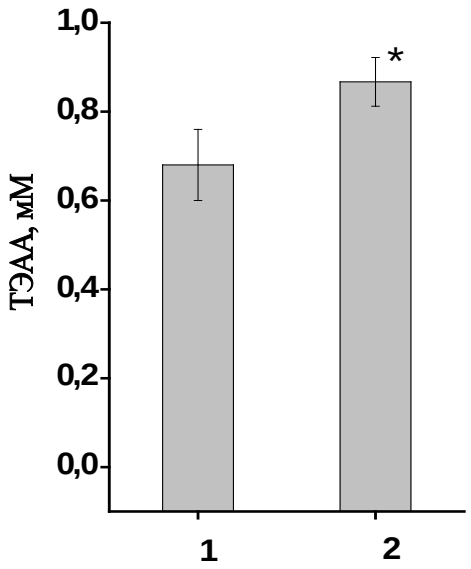

Рис. 2. Общая антиоксидантная активность плазмы периферической крови, выраженная 1 – условно здоровые доноры (контроль); 2 – пациенты с СД II типа. *Достоверность различий по сравнению с контролем (p<0,05)

Ответ ОАС плазмы крови пациентов с диагностированным СД II типа приводил к увеличению ее ОАА. Это согласуется с данными литературы о повышении активности пероксидазы, СОД и каталазы в сыворотке крови у пациентов с СД II типа [10]. Причиной этому могут быть нарушения со стороны липидного и углеводного обмена, в частности увеличение содержания триацилглицеридов, липопротеидов очень низкой плотности, мочевой кислоты в плазме крови, что вносит вклад в итоговые результаты.

Заключение. Таким образом, амилоидные структуры при взаимодействии с эритроцитами *in vitro* модифицируют их структурно-функциональное состояние, проявляющееся в ингибировании процессов ПОЛ на фоне активации антиоксидантных процессов в клетке (изменении активности ферментов системы АОЗ клеток и повышении концентрации GSH). Сходные разнонаправленные

изменения активности антиоксидантных ферментов (ГП, каталазы и СОД) и увеличение содержания GSH, а также увеличение микровязкости липидов мембран эритроцитов обнаружены у пациентов с СД II типа. Установлено, что общая антиоксидантная активности плазмы крови у пациентов с сахарным диабетом II типа значительно выше по сравнению с условно здоровыми донорами. Сравнительная оценка действия амилоидных фибрилл на структурную модификацию мембран эритроцитов показала, что амилоид индуцированное нарушение их состояния *in vitro* частично обусловлено ответом клеток со стороны системы АОЗ эритроцитов, а *in vivo* (СД II типа) связано также с ОАА плазмы крови.

Данная работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б11К-152 и М15-112.

Литература

[1]. *Гармаза Ю.М.* и др.// Медицинский академический журнал. 2013. Т.13, № 4. С. 71–76.
[2]. *Герасимов Н. Ю., Голощапов А. Н., Бурлакова Е. Б.* // Химическая физика. 2009. Т. 28, № 7. С. 82–86.
[3]. *Довидченко Н.В. и др.* // Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 203–230
[4]. *Косенко Е. А. и др*. // Биомедицинская химия 2013. Т. 59, № 4. С. 443–451.
[5]. *Королюк М. А.* // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
[6]. *Лукьяненко Л.М. и др.* // Новости медико-биологических наук. 2013.Т.7, № 1. С. 9–13.
[7]. *Моин В. М.* // Лаб. дело. 1986. № 12, С. 724–727.
[8]. *Нижников А.А., Антонец К.С., Инге-Вечтомов С.Г.* // Биохимия. 2015. Т.80. С. 1356–1375.
[9]. *Шевченко О.Г., Шишкина Л.Н. //* Успехи соврем. биологии.2014. Т. 134. № 2. С. 133–148.
[10]. *Ahmed F. N., Naqvi F. N., Shafiq F.* // Ann. N. Acad. Sci. 2006. Vol. 1084. P. 481–489.
[11]. *Aliev G. et al.* // Neurotox Res. 2003. Vol. 5, №. 7. P. 491–504.
[12]. *Clark A. et al.* // Diabetes Res Clin Proc. 1988. Vol. 9. P. 151–159.
[13]. *Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.* // Arch. Biochem. Biophys.1963. Vol. 100, № 2. P. 119–130.
[14]. *Duce J.A. et al.* // Cell. 2010. Vol. 142, № 6. P. 857–867.
[15]. *Ellman G. L.* // Arch Biochem Biophys. 1959. Vol. 82, № 1. P. 70–77.
[16]. *Kambayashi Y. et al.* // J. Clin. Biochem. Nutr. 2009. Vol. 44, № 1. P. 46–51.
[17]. *Kostyuk V. A., Potapovitch A. I.* // Biochem. Int. 1989. Vol. 19. P. 1117–1124.
[18]. *Kuhry J.G., Duportail G., Bronner C.* et al. // Biochim Biophys Acta. 1985. Vol. 845. P. 60–67.
[19]. *Lovasova E., Sesztakova E.* // Slovak J. Anim. Sci. 2009. Vol. 42, № 1. P. 42–45.
[20]. *Malisauskas M.* et al. // The J. of Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 6269–6275.
[21]. *Rocken C. et al.* // Arch Pathol. Anat. Histopathol. 1992. Vol. 421. P. 339–344.
[22]. *Vareesangthip K. et al.* // Transplantations Proceedings. 2001. Vol. 33. P. 1198–1200.
[23]. *Westermark P. et al.* //Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. Vol. 140. P. 827–831.

Поступила в редакцию: 08.02.2017 г.

G. P. ZUBRITSKAYA[1], Y. M. HARMAZA[1], I.V. PATEUK[2], H. G. KUTSKO[2], N.P. MITKOVSKAYA[2], E. I. SLOBOZHANINA[1]

A COMPARISON STUDY CHANGES OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES UNDER AMYLOID EXPOSURE *IN VITRO* AND IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE II

[1]Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Summary

It was found that interaction of the lysozyme amyloid fibrils with human red blood cells in vitro led to modification of the membranes structural state that exhibit in rise of the membrane lipids microviscosity and inhibition of lipid peroxidation processes in the background of the cell antioxidant defense system (ADS) enzymes. Similar opposite changes of the ADS enzymes activity and erythrocyte membrane lipids microviscosity were found in patients with diabetes mellitus type II probable due to increase in total antioxidant activity of blood plasma.

Key words: human erythrocytes, amyloid fibrils, diabetes mellitus type II, antioxidant activity, lipid bilayer microviscosity.