

## **ВЛИЯНИЯ ЦИКВАЛОНА И ДИБУНОЛА НА ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ИОНАМИ МЕДИ И ГИДРОПЕРОКСИДОМ**

Диб Х., Островский О.В., Зайцев В.Г., Веровский В.Е., Симонян А.В.  
Волгоградский государственный медицинский университет. Кафедра  
теоретической и клинической биохимии

Исследование резистентности эритроцитарных мембран является стандартной диагностической процедурой при разнообразных патологических состояниях, связанных с эндогенной интоксикацией [3]. Предполагается, что снижение резистентности эритроцитов отражает дисфункцию и деструкцию клеток организма, вызываемую эндогенными токсическими субстанциями, к которым относятся активные формы кислорода и другие свободные радикалы [1]. Было показано, что гемолиз эритроцитов под действием солей меди определяется перекисным повреждением мембран [5]. Поэтому представлялось интересным исследовать влияние двух фенольных антиоксидантов циквалона (2,6-бис[(3-метокси-4-гидроксифенил) - метилен] - циклогексанон) и дибунола (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол) (ВНТ) на гемолиз эритроцитов в присутствии ионов меди.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния циквалона и дибунола на гемолиз эритроцитов, индуцированный ионами меди.

Опыты выполнены на 36 белых нелинейных крысах самцах. Их декапитировали под эфирным наркозом, эритроциты отмывали физиологическим раствором.

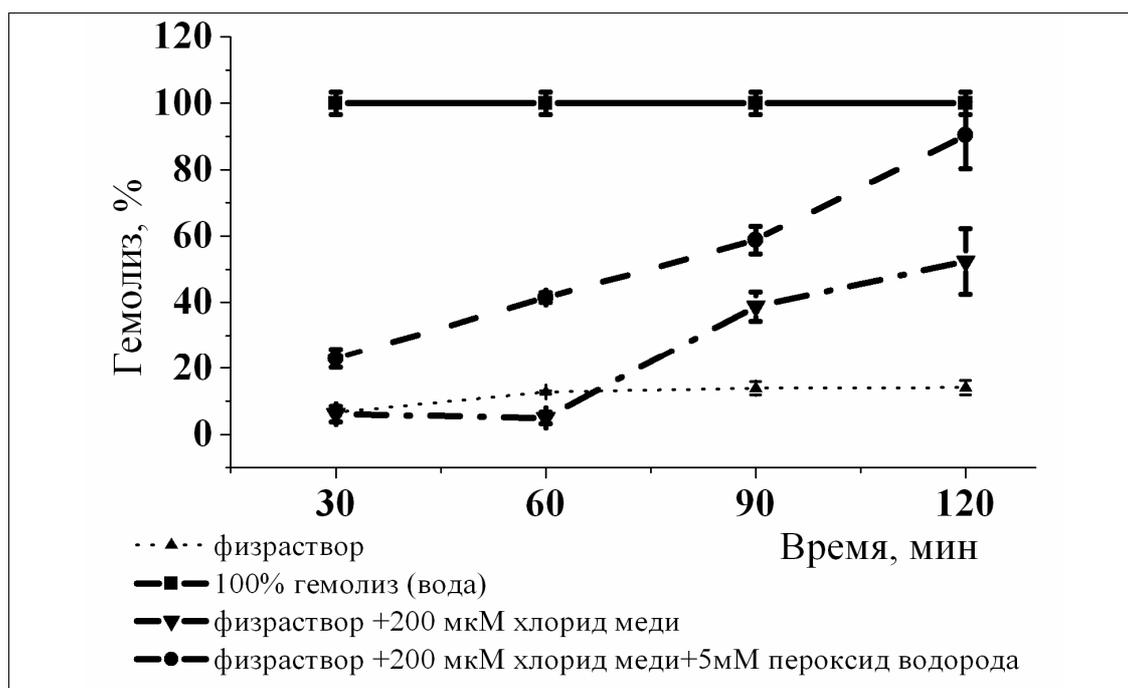
В моделях *in vitro* гемолиз проводили хлоридом меди (конечная концентрация 200 мкМ) в присутствии и отсутствии пероксида водорода (конечная концентрация 5 мМ). Суспензию инкубировали на шейкере-термостате при постоянном перемешивании в течение 2 часов при температуре 37°C.

Фенольные антиоксиданты, растворимые в этаноле добавляли в опытные пробы в разных концентрациях. А в контрольную пробу добавляли этанол в таком же объёме. Для определения степени гемолиза измеряли концентрацию гемоглобина, вышедшего в инкубационную среду при разрушении клеток, прямым спектрофотометрическим методом. Конечный гематокрит в образцах составлял 1%, при полном гемолизе образца поглощение пробы было в диапазоне величин 1,5-2,0 о.е.

В результате исследования доказано, что инкубация образца в отсутствии индукторов вызывала гемолиз 6-14% эритроцитов.

Динамика процесса гемолиза эритроцитов в присутствии 200 мкМ ионов  $\text{Cu}^{2+}$  приведена на (рис.1). Процесс характеризовался длительным (не менее 1 ч) латентным периодом. Достоверные отличия, по сравнению с динамикой гемолиза без инциаторов, отмечались только к 60-й минуте, а затем следовала резкая активация процесса. К концу 2-го часа гемолизировалось около 50% эритроцитов.

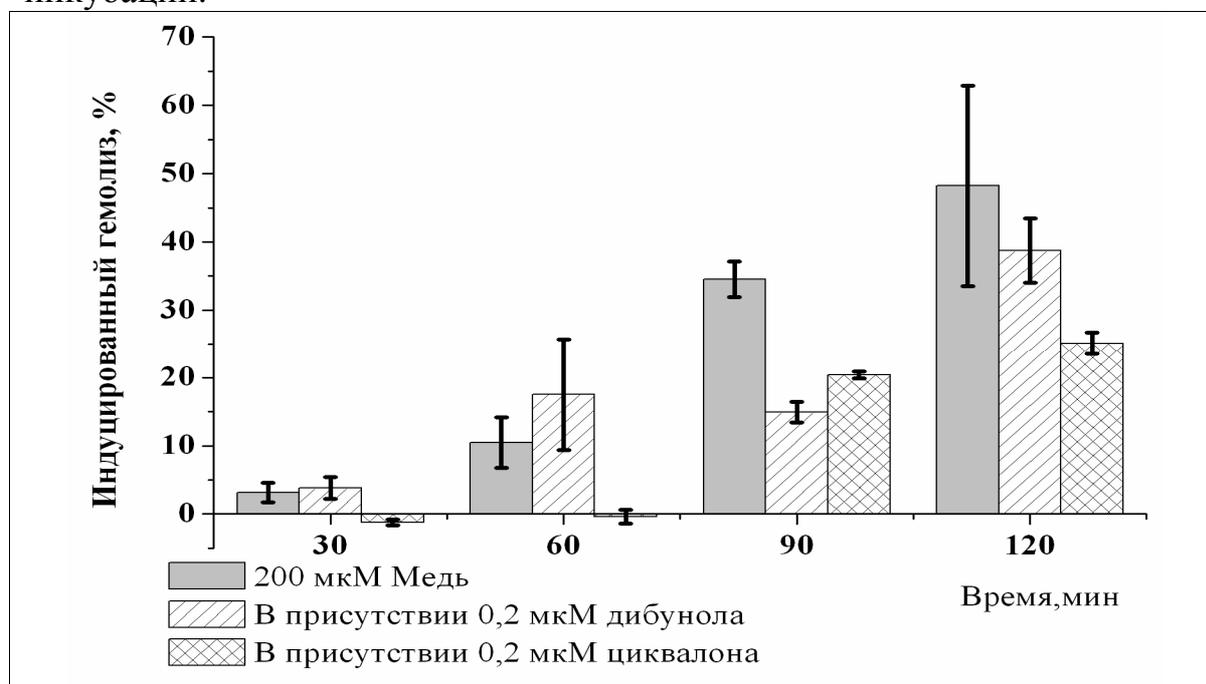
Сочетанное применение  $\text{Cu}^{2+}$  (200 мкМ) и перекиси водорода (5 мМ) изменяло характер динамики процесса: латентный период уменьшался, а количество поврежденных клеток увеличивалось. Так, достоверное увеличение концентрации гемоглобина в надосадочной жидкости наблюдалось уже к 30-й минуте, а затем скорость гемолиза увеличивалась. На 60-й, 90-й и 120-й минутах повреждалось 48, 59 и 86% эритроцитов, соответственно. Надо полагать, что в первом случае, когда в образце присутствовали только ионы меди, генерация свободных радикалов происходила в результате разрушения органических гидропероксидов, при этом образовавшиеся гидроксильный и супероксидный радикалы запускали новые цепи окисления липидов, что и приводило к длительному латентному периоду повреждения клеток. Во втором случае на начальных этапах основным источником активных форм кислорода являлась вносимая нами перекись водорода в концентрации значительно превышающей концентрацию липоперекисей в нативных мембранах, что, по-видимому, и приводит к значительному сокращению латентного периода.



**Рис. 1.** Индукция гемолиза эритроцитов крыс *in vitro* 200 мкМ хлоридом меди: в отсутствие пероксида водорода; и в присутствии 5 мМ пероксида водорода

Циквалона подавлял индуцированный ионами меди гемолиз. Однако при этом подавляющий эффект циквалона имел однонаправленный дозозависимый характер в диапазоне концентраций 0,2 – 20 мкМ. Константа ингибирования, рассчитанная по результатам 2-х часовой инкубации, составила  $(5.3 \pm 1.4) \cdot 10^{-8}$  М, максимальный эффект –  $(90,1 \pm 1,4)\%$ . Повышение концентрации циквалона до 200 -500 мкМ приводило к снижению регистрируемого антигемолитического эффекта практически до исчезновения (значимые различия между образцами без циквалона и в присутствии циквалона в концентрации 500 мкМ – отсутствуют).

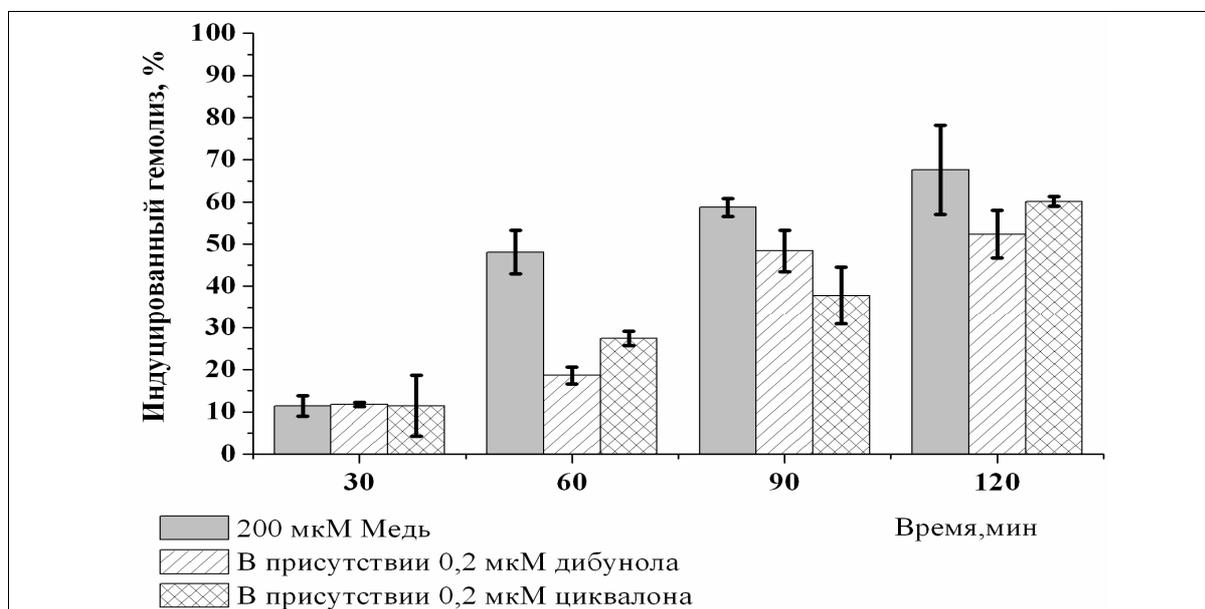
Дибунол снижал степень гемолиза эритроцитов. Однако достоверное снижение степени гемолиза выявилось только в присутствии 0,02 мМ ВНТ при полуторачасовой инкубации. Напротив, препарат в концентрациях 0,2 и 0,5 мМ приводил к увеличению скорости процесса на начальной стадии (инкубация до 90 мин). Как и в случае высоких концентраций циквалона, дибунол в концентрации 0,5 мМ почти двукратно увеличивал степень гемолиза уже к 30-й минуте инкубации.



**Рис.2.** Влияние циквалона и дибунола в дозе 0,2 мкМ на гемолиз эритроцитов крыс индуцированный 200 мкМ хлоридом меди. Приведены результаты за вычетом спонтанного гемолиза (в физрастворе)

Подобный характер зависимости от концентрации циквалона имел место и в случае гемолиза, индуцированного комбинацией ионов меди с перекисью водорода (рис.3). Но, в отличие от индукции только медью, константа ингибирования, рассчитанная по результатам 2-х часовой инкубации, составила  $(1.5 \pm 0.8) \cdot 10^{-6}$  М, а максимальный эффект - всего  $(42 \pm 12)\%$ . Обращает внимание также повышение степени гемолиза от ~ 20% до ~ 40% на начальных стадиях процесса (30 мин) в присутствии высоких концентраций циквалона (500 мкМ). Это обусловлено, по-видимому, высокой липофильностью циквалона и способностью влиять на физико-химические свойства мембраны эритроцитов при сравнительно высоких концентрациях (начиная с 200 мкМ), а также может быть расценено как инверсия свойств ловушки по мере роста концентрации.

В случае индукции гемолиза эритроцитов крыс комбинацией ионов меди и пероксида водорода, действие дибунола более выражено. Диапазон концентраций, при которых наблюдалось достоверное снижение степени индуцированного гемолиза составил 0,01 – 0,2 мМ. Оценка константы ингибирования в этом диапазоне дала величину  $(6,07 \pm 21,46)$  мкМ, а максимальный эффект  $(22,9 \pm 16,3)\%$ . Однако зависимость эффекта от дозы не была достоверной ( $P=0,8$ ).



**Рис.3.** Влияние циквалона и дибунола в дозе 0,2 мкМ на гемолиз эритроцитов крыс индуцированный 200 мкМ хлоридом меди в сочетании с 5 мМ пероксида водорода.

Приведены результаты за вычетом спонтанного гемолиза (в физрастворе)

Таким образом, в модели медь-индуцированного гемолиза эритроцитов в диапазоне концентраций до 0.02 мМ циквалон проявил более выраженные защитные свойства, чем дибунол. Вместе с тем, как циквалон, так и дибунол в концентрациях 0,2-0,5 мМ вызывали увеличение степени гемолиза. Это может быть связано как с непосредственным изменением свойств липидного бислоя в присутствии столь высоких концентраций липофильных веществ, так и с накоплением радикальных форм собственно самих «ловушек» циквалона и дибунола [2, 4].

На модели медь-индуцированного гемолиза эритроцитов, при сравнении действия двух фенольных антиоксиданта было показано, что циквалон проявил более выраженные защитные свойства, чем дибунол.

We compared effects of two phenolic antioxidants, cycvalonum and (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол) by using the model of hemolysis erythrocytes induced by copper was found that, cycvalonum has a more protective effect than 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол.

#### **Список литературы**

1. Владимиров Ю.А, Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. // М.: Наука. -1972. -С 252.
2. Dynlacht J.R, Fox M.H Effect of hyperthermia and membrane-active compounds or low pH on membrane fluidity of Chinese ovary cells. // Int J hyperthermia. - 1992. 8(3):351-62.
3. E Rock, A Mazur, M Jacqueline, P Maxine. The effect of copper supplementation on red blood cell oxidizability and plasma antioxidants middle-aged healthy volunteers.// Free Radical Biology and Medicine.- 2000.-Vol 28, No 3. pp 324-329.
4. Motohiko N. Screening for the pharmacological activity of foodstuff components and additives using their membrane effects as an indication. // The Japan Food Chemical Research Foundation. Research report.- 2003. № 9

5. Nishikawa T, Matusi lee I S, Shiraishi N et al. Identification of S100b as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. // The journal of Biological Chemistry.- 1997. Vol. 272, No.37. pp 23037-23041.