

**РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ
ПРИ ГЕМОЛИЗЕ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА**

Войнаровский В.В.

*аспирант кафедры биофизики
Белорусского государственного университета,
г. Минск, Беларусь
voynarovskiy@bsu.by*

Вчерашняя А.В.

*старший преподаватель кафедры биофизики
Белорусского государственного университета,
г. Минск, Беларусь
tuata_de_danann@mail.ru*

Мартинович Г.Г.

*д.б.н.,
заведующий кафедрой биофизики
Белорусского государственного университета,
г. Минск, Беларусь
martinovichgg@bsu.by*

В представленной работе рассмотрена регуляция структурной устойчивости эритроцитов пероксидом водорода при гемолизе наночастицами серебра. Обнаружено повышение структурной стабильности мембраны эритроцитов при гемолизе вызванном наночастицами серебра и нитратом серебра при предварительном инкубировании с пероксидом водорода в течение 10 минут при концентрации 100 – 800 мкМ. Область действия эффекта установлена с применением многофакторной математической модели, учитывающей ключевые пути утилизации пероксида водорода в эритроцитах.

Ключевые слова: эритроциты; наночастицы серебра; структурная стабильность; пероксид водорода

**REDOX REGULATION OF THE STRUCTURAL PROPERTIES OF
ERYTHROCYTES IN HEMOLYSIS BY SILVER NANOPARTICLES**

Voinarovski V.V.

*Postgraduate student of the Department of Biophysics of
Belarusian State University, Minsk, Belarus,
voynarovskiy@bsu.by*

Vcherashniaya A.V.

*Senior Lecturer of the Department of Biophysics of
Belarusian State University, Minsk, Belarus,
tuata_de_danann@mail.ru*

Martinovich G.G.

*Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Biophysics of
Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

martinovichgg@bsu.by

In this work the regulation of the structural stability of erythrocytes by hydrogen peroxide during hemolysis by silver nanoparticles were investigated. An increase in the structural stability of the erythrocyte membrane was found during hemolysis caused by silver nanoparticles and silver nitrate upon preliminary incubation with hydrogen peroxide for 10 minutes at a concentration of 100–800 μM . The area of effect was established using a multivariate mathematical model, suitable key pathways for the utilization of hydrogen peroxide in erythrocytes.

Key words: *erythrocytes; silver nanoparticles; structural stability; hydrogen peroxide*

Важным явлением при клеточном дыхании является образование активных форм кислорода (АФК), обладающих широким спектром физиологического и патофизиологического действия. Умеренное повышение концентрации окислителей активирует защитные механизмы, благодаря которым поддерживается баланс образования и утилизации АФК, а нарушение этого баланса приводит к повреждению клеток и развитию заболеваний. Наночастицы металлов, способные катализировать окислительно-восстановительные процессы, изменяют баланс образования и утилизации АФК в клетках и, тем самым, могут регулировать биологические процессы. С другой стороны, механизм действия наночастиц зависит от внешних редокс-условий. В представленной работе в экспериментах *in vitro* и *in silico* исследованы механизмы действия экзогенного пероксида водорода на структурную стабильность эритроцитов при гемолизе, индуцированном наночастицами серебра.

Материалы и методы: В эксперименте использовали кровь здоровых доноров, полученную в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». Эритроциты выделяли путём центрифугирования при 1500 об/мин в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl , 5 мМ D-глюкозы (рН 7,4).

Наночастицы серебра получали из нитрата серебра, с применением методов зелёной химии. Раствор нитрата серебра в концентрации 1 мМ смешивали с водным экстрактом растений в соотношении 9:1 при рН 8.0 и оставляли на 1 час при комнатной температуре. Окончание синтеза устанавливали по появлению пика локализованного поверхностного плазмонного резонанса при 400 нм.

Кинетики гемолиза эритроцитов измеряли с использованием спектрофлуориметра Solar CM-2203 (SOLAR, Беларусь) путём регистрации оптической плотности клеточной суспензии ($3 \cdot 10^7$ клеток/мл) на длине волны 680 нм. Концентрацию эритроцитов выбирали таким образом, чтобы начальная оптическая плотность составляла 0.5. В измерительную кювету добавляли 1 мл суспензии отмытых эритроцитов и термостатировали в течение 3-4 минут при

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

температуре 37°C при постоянном перемешивании. Гемолиз инициировали путём добавления нитрата серебра при концентрации 100 мкМ или наночастиц серебра, полученных из нитрата серебра, при концентрации 250 мкМ к суспензии эритроцитов при предварительном инкубировании с пероксидом водорода в течение 10 минут при концентрациях 100 – 800 мкМ.

Оценка эффекта (I) определялась как относительная разность оптической плотности после 25 минут инкубирования с наночастицами серебра или нитратом серебра в присутствии пероксида водорода и оптической плотности после 25 минут инкубирования с наночастицами серебра или нитратом серебра без пероксида водорода.

Результаты и обсуждение. Ранее, нами в [1] было показано, что предварительное инкубирование эритроцитов с пероксидом водорода в микромолярных концентрациях индуцирует адаптацию клеток к окислительному стрессу. В данной работе показано, что пероксид водорода повышает структурную стабильность эритроцитов в условиях воздействия наночастиц серебра.

Передача редокс-сигнала на внутриклеточные мишени с учетом редокс-свойств наночастиц представляет собой сложную цепочку взаимосвязанных событий, теоретическое описание которых возможно с использованием многофакторных моделей. В результате исследований разработана математическая модель, связывающая транспорт и метаболизм пероксида водорода, состояние антиокислительной системы эритроцитов, метаболическую активность клеток, редокс-состояние гемоглобина и структурную стабильность мембран. Модель учитывает процессы диффузии пероксида водорода в клетку, утилизацию ферментами каталазой и глутатионпероксидазой, а также взаимодействие с гемоглобином и метгемоглобином. При низких концентрациях пероксида водорода все процессы являются обратимыми. Восстановление метгемоглобина и феррилгемоглобина происходит с участием ферментов и неферментативных восстановителей с расходом энергии, образующейся в процессах гликолиза и пентозофосфатного пути. Взаимодействие белков с мембраной промоделировано кинетикой лиганд-рецепторного взаимодействия. Общая схема процессов представлена на рисунке 1. Диффузия пероксида водорода в клетку и утилизация с участием ферментов каталазы и глутатионпероксидазы приводит к расходу его общего количества во внеклеточной и внутриклеточной среде. Время протекания данных процессов при концентрации пероксида водорода 500 мкМ и количестве клеток 30 млн. не превышает 5 минут. Таким образом, прямое взаимодействие наночастиц и пероксида водорода исключается. Конкурирующими процессами с участием пероксида водорода в клетке являются взаимодействия с основным белком клетки гемоглобином, с образованием его окисленных форм: метгемоглобина или, при высокой концентрации пероксида водорода, феррилгемоглобина. Оба белка имеют высокие константы связывания с мембраной, однако при

связывании метгемоглобина происходит увеличение структурной стабильности мембраны, а образование феррилгемоглобинов и их взаимодействие с мембраной под действием окислительного стресса приводит к уменьшению структурной стабильности.

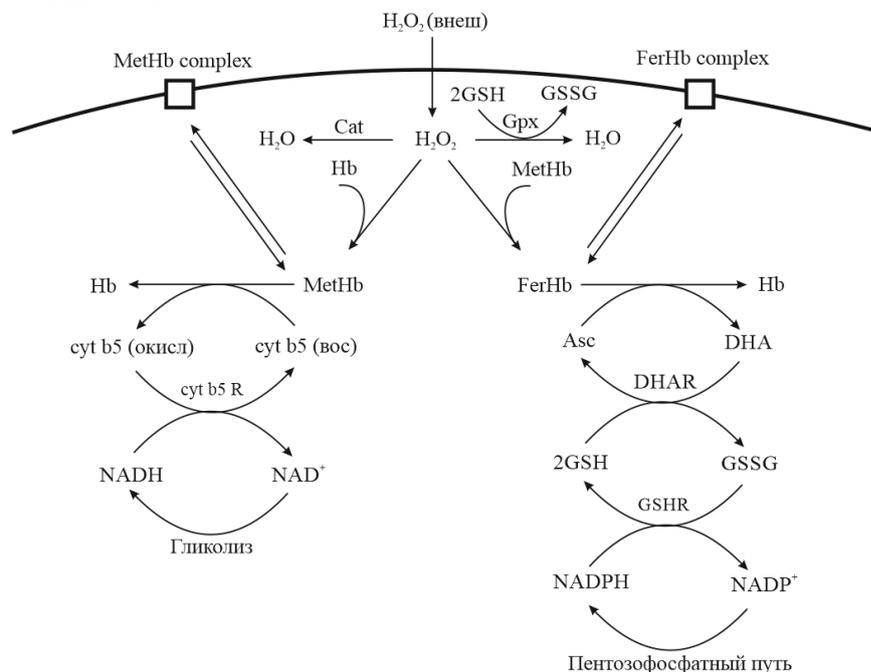
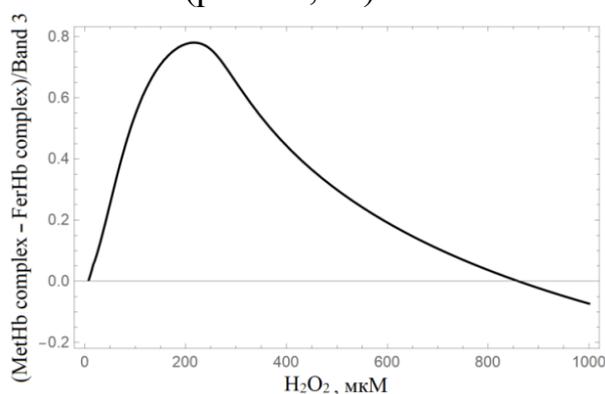


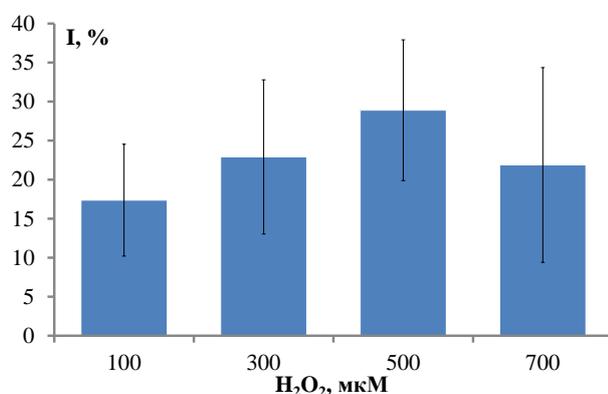
Рисунок. 1. Процессы метаболизма эритроцитов с участием пероксида водорода, рассмотренные в модели. Hb гемоглобин; MetHb метгемоглобин; FerHb феррилгемоглобин; H₂O₂ пероксид водорода; H₂O₂ (внеш) внеклеточный пероксид водорода; Cat каталаза; Gpx глутатионпероксидаза; GSH глутатион; GSSG глутатион дисульфид; cyt b5 (окисл) окисленная форма цитохрома b5; cyt b5 (вос) восстановленная форма цитохрома b5; cyt b5 R цитохром b5 редуктаза; NAD⁺/NADH окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида; Asc аскорбиновая кислота; DHA дегидроаскорбат; DHAR дегидроаскорбатредуктаза; GSHR глутатионредуктаза; NADP⁺/NADPH окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата; MetHb complex мембранный комплекс с метгемоглобином; FerHb complex мембранный комплекс с феррилгемоглобином

На рисунке 2а представлена теоретически рассчитанная зависимость разности количества образованных мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина от количества внеклеточного пероксида водорода, при числе клеток 30 млн. и времени предварительного инкубирования равном 10 минутам. На основе численного моделирования процессов взаимодействия окисленных форм гемоглобина с мембраной эритроцитов была установлена область концентраций внеклеточного пероксида водорода, при которых возможна активация адаптационных процессов, что позволило проведение экспериментальной проверки.

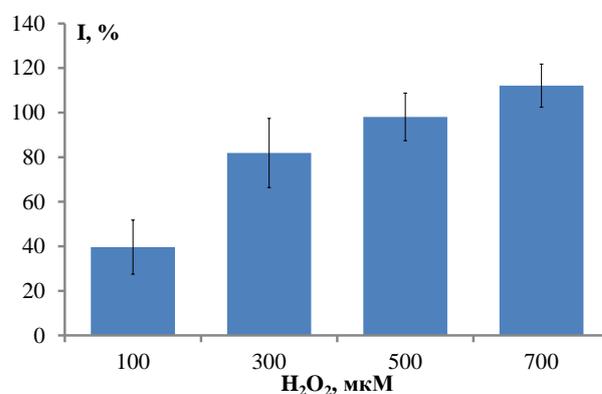
В ходе эксперимента выявлено, что предварительное инкубирование эритроцитов с пероксидом водорода приводит к уменьшению числа гемолизированных клеток в условиях воздействия наночастиц серебра и нитрата серебра. Наблюдается различие в величине эффекта и положении максимума для наночастиц серебра и нитрата серебра. Максимальный протекторный эффект при разрушении нитратом серебра наблюдается при внеклеточной концентрации пероксида водорода 700 мкМ, при этом наблюдается полное отсутствие гемолизированных клеток в сравнении с контролем. В свою очередь, при разрушении наночастицами серебра эффект достигает максимума при 500 мкМ внеклеточного пероксида водорода, при этом в культуре остаётся треть от первоначального количества клеток (рис. 2б, 2в).



а



б



в

Рисунок. 2. Теоретически рассчитанная разность количества мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина (а); доля негемолизированных эритроцитов в зависимости от концентрации внеклеточного пероксида водорода (б — гемолиз наночастицами серебра, в — гемолиз нитратом серебра)

Заключение: В результате теоретических и экспериментальных исследований показано, что пероксид водорода в концентрациях 100 – 700 мкМ активирует адаптационный механизм эритроцитов, обусловленный ростом числа связанного с мембраной метгемоглобина, что повышает структурную

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

стабильность мембраны и снижает число разрушенных наночастицами серебра и нитратом серебра клеток.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б20У-1).

Список литературы

1. Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г. Структурная устойчивость эритроцитов в условиях окислительного стресса: математическая модель и эксперимент; Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 2. / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2021. – 490 с.