

## K<sup>+</sup>-ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ, ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ХЛОРИНОМ e<sub>6</sub>

А.В.ГЮЛЬХАНДАНЯН<sup>1</sup>, Г.В.ГЮЛЬХАНДАНЯН<sup>2</sup>, В.В. ГУКАСЯН<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им.Г.Бунятыана НАН Армении, 375014, Ереван

<sup>2</sup>НИИ Биотехнологии МПУТ Армении, 375056, Ереван

Показано, что фотосенсибилизатор хлорин e<sub>6</sub> при облучении светом с длиной волн в интервале 630-800 нм индуцирует K<sup>+</sup>-проницаемость эритроцитов человека. Выход K<sup>+</sup> сопровождается входом H<sup>+</sup> внутрь клеток. После выхода большей части ионов K<sup>+</sup> из клеток начинается гемолиз и выход H<sup>+</sup> из эритроцитов. Ловушка синглетного кислорода азид Na, антиоксидантный фермент каталаза (но не супероксиддисмутаз), блокатор SH-групп N-этилмалеимид (N-ЭМ) подавляют выход K<sup>+</sup>, вход H<sup>+</sup> и гемолиз эритроцитов, фотосенсибилизированных хлорином e<sub>6</sub>.

Յույց է տրվել, որ 630-800 նմ երկարության ալիքներով ճառագայթման դեպքում քլորին e<sub>6</sub> ֆոտոսենսիբիլիզատորը խթանում է K<sup>+</sup> իոնների արտահոսքը մարդու էրիտրոցիտներից: K<sup>+</sup> իոնների ելքը զուգակցվում է H<sup>+</sup> իոնների մուտքով բջիջների մեջ: Երբ K<sup>+</sup> իոնների մեծ մասը դուրս է գալիս բջիջից, սկսվում է էրիտրոցիտների հեմոլիզ և H<sup>+</sup> իոնների արտահոսք: Մինգլետ թթվածնի թակարդ Na ազիդը, հակաօքսիդիչ ֆերմենտ կատալազը (սակայն ոչ սուպերօքսիդիզիսմուտազը), SH-խմբերի բլոկատոր N-էթիլմալեիմիդը նվազեցնում են քլորին e<sub>6</sub>-ի կողմից ֆոտոսենսիբիլիզացված K<sup>+</sup> իոնների ելքը, H<sup>+</sup> իոնների մուտքը և էրիտրոցիտների հեմոլիզը:

It has been shown that chlorin e<sub>6</sub> photosensitizer induces K<sup>+</sup>-permeability of human erythrocytes at light irradiation with the wavelength of 630-800 nm. K<sup>+</sup> efflux is accompanied by the H<sup>+</sup> influx into erythrocytes. Efflux of the most part of K<sup>+</sup> ions from cells results in hemolysis and H<sup>+</sup> efflux from erythrocytes. Singlet oxygen scavenger Na azide, antioxidant enzyme catalase (but not superoxide dismutase), SH-group blocker N-ethylmaleimide depress K<sup>+</sup> efflux, H<sup>+</sup> influx and erythrocytes hemolysis photosensitized by chlorin e<sub>6</sub>.

*Фотосенсибилизаторы - хлорин e<sub>6</sub> - эритроциты - активные формы кислорода  
- K<sup>+</sup>-проницаемость - антиоксиданты*

В настоящее время фотодинамическая терапия широко применяется в клинике при лечении раковых заболеваний [13]. Метод основан на селективной аккумуляции в опухолевых клетках специальных соединений - фотосенсибилизаторов (ФС), которые при возбуждении светом продуцируют активные формы кислорода, способные к деструкции опухолей [10].

Существует ряд работ, посвященных действию ФС на K<sup>+</sup>-проницаемость эритроцитов. Показано, что облучение эритроцитов видимым светом в присутствии протопорфирина IX приводит к кросс-связыванию мембранных белков, заметному уменьшению способности клеток к деформации, уменьшению активного транспорта K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup>, в то время как пассивный транспорт катионов сильно увеличивается [6, 7]. Было обнаружено, что эти эффекты вызываются не перекисным окислением липидов, а фотоокислением мембранных белков. Производные гематопорфиринов при облучении вызывают выход K<sup>+</sup> из мышинных фибробластов [8], при этом, по мнению авторов, межмолекулярное кросс-связывание белков не связано с усиленной

утечкой K<sup>+</sup> из клеток.

ФС хлорин e<sub>6</sub> (ХЛ) в последнее время находит широкое применение в клинике [11, 12]. Однако влияние его на K<sup>+</sup>-проницаемость и на K<sup>+</sup>-каналы эритроцитов практически не изучено. Между тем, эритроциты являются простой и удобной моделью для изучения действия ФС на ионные потоки.

В настоящей работе выявлена индукция пассивной K<sup>+</sup>-проницаемости и гемолиза эритроцитов человека при фотодинамическом действии ХЛ.

**Материал и методика.** Эритроциты выделяли из свежей гепаринизированной крови доноров. Клетки промывали раствором, содержащим 0,15 М NaCl и 10 мМ трис-HCl (рН 7,4) с повторной последующей промывкой той же средой без буфера.

Концентрации K<sup>+</sup> и H<sup>+</sup> измеряли с помощью K<sup>+</sup>- (стекло марки NAS-2704) и H<sup>+</sup>- ("Radiometer", Дания) селективных электродов, подсоединенных вместе через общий электрод сравнения и выведенных с помощью милливольтметров к самописцам.

При исследовании влияния ХЛ на эритроциты его инкубацию с клетками проводили двумя способами. При I способе инкубации 1 мл плотно отцентрифугированных клеток суспендировали в 3 мл 0,15 М NaCl и вносили 80 мкг или 4 мкг ХЛ (в виде водного раствора), затем инкубировали при непрерывном встряхивании 30 мин в темноте при комнатной температуре. После этого суспензию два раза промывали в растворе 0,15 М NaCl. Для опыта 0,1 мл отцентрифугированных клеток вносили в подэлектродную ячейку с 1,9 мл среды инкубации и размещивали на магнитной мешалке. Если считать, что весь ХЛ связался с эритроцитами, то количество ХЛ составляло 8 мкг/0,1 мл или 0,4 мкг/0,1 мл эритроцитов соответственно.

При II способе инкубации ХЛ непосредственно добавляли в подэлектродную ячейку, в которой инкубировались 0,1 мл эритроцитов и 1,9 мл среды. В этих опытах количество вносимого ХЛ варьировало от 8 мкг/0,1 мл до 40 мкг/0,1 мл эритроцитов.

Стандартная среда инкубации содержала 0,15 мМ холинхлорида и 0,1 мМ KCl. Сами эритроциты вносят в среду приблизительно 0,1 мМ KCl. В некоторых опытах в среде инкубации содержалось 4 мМ NaCl или 1 мМ CaCl<sub>2</sub>.

Облучение проводили лампой с вольфрамовой нитью с использованием стеклянного фильтра с полосой пропускания в интервале 630-800 нм. Интенсивность облучения составляла 30 мВт/см<sup>2</sup>. Сфокусированный луч света попадал на кювету с суспензией эритроцитов с расстояния в 25 см.

Выход K<sup>+</sup> и синхронное изменение рН наблюдали обычно в течение 20-40 мин после начала облучения.

Скорость выхода K<sup>+</sup> под действием ХЛ определяли, градуируя электрод стандартными добавками KCl.

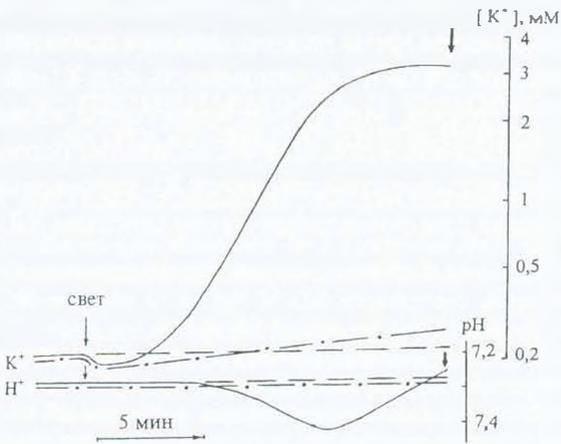
Степень гемолиза эритроцитов по отношению к полному гемолизу, вызываемому сапонином (100% гемолиза), измеряли спектрофотометрически при 540 нм, используя супернатант быстро отцентрифугированной после определенного времени суспензии эритроцитов. В качестве контроля брали супернатант эритроцитов, инкубируемых 30 мин без каких-либо добавок.

Каждый из экспериментов повторяли не менее 3 раз.

Исследования проводили при комнатной температуре (22-25°).

Использовали N-этилмаленимид ("Serva"), трис, меркаптоэтанол, каталазу, Cu-Zn супероксиддисмутазу (СОД) (все "Sigma"). Хлорин e<sub>6</sub> был предоставлен "Предприятием по производству диагностических и лекарственных препаратов", г. Минск.

**Результаты и обсуждение.** На рис.1 показано действие двух разных количеств ХЛ (инкубация I способом) на изменение концентрации K<sup>+</sup> и рН суспензии эритроцитов (0,1 мл клеток, суспензируемых с ХЛ I способом, вносили в 1,9 мл среды, содержащей 150 мМ холинхлорида и 0,1 мМ KCl). Как видно, в отсутствие облучения инкубация эритроцитов с 8 мкг ХЛ/0,1 мл



**Рис. 1.** Фотодинамическое действие хлорина  $e_6$  (ХЛ) на пассивный выход  $K^+$  и изменение рН суспензии эритроцитов. Сплошные линии – 8 мкг ХЛ/0,1 мл клеток, штриховые линии – 8 мкг ХЛ/0,1 мл клеток в отсутствие облучения, штрих-пунктирные линии – 0,4 мкг ХЛ/0,1 мл клеток. Толстыми стрелками здесь и на остальных рисунках показан момент забора проб для определения степени гемолиза.

клеток не приводит к существенному изменению выхода  $K^+$  и рН в течение наблюдаемого времени (штриховые кривые). Включение облучения уже через 2-3 мин приводит к заметному выходу  $K^+$ , хотя рН среды при этом практически не меняется (сплошные кривые). Однако через несколько минут начинается постепенный вход  $H^+$  внутрь эритроцитов (рН в среде инкубации увеличивается). Выход  $K^+$  на 6-7 мин совпадает с увеличением входа  $H^+$  в клетки. Средняя скорость выхода  $K^+$  из эритроцитов, наблюдаемая в течение 10 мин (до замедления движения  $K^+$ ), составляла 3,6 ммоль/мин.л клеток. Пик всплеска рН совпадает с сильным уменьшением выхода  $K^+$ . Очевидно, после выхода на плато основная часть ионов  $K^+$  уже вышла из клеток (добавление сапонина, разрывающего мембрану эритроцитов, дает лишь небольшой дополнительный выход  $K^+$ ). В момент выхода ионов  $K^+$  на плато происходит выход  $H^+$  из эритроцитов (уменьшение рН среды).

В случае инкубации эритроцитов с количеством ХЛ, равным 0,4 мкг/0,1 мл клеток (I способ), скорость фотосенсибилизированного выхода  $K^+$  гораздо ниже и изменения рН не наблюдается (рис. 1, штрих-пунктирные кривые).

Измерение гемолиза клеток, взятых через 5 мин после пика всплеска рН, показали, что процент гемолиза при 8 мкг ХЛ/0,1 мл клеток составляет примерно 4,3 (табл. 1). При использовании 0,4 мкг ХЛ/0,1 мл клеток заметного отличия от контроля не наблюдалось. Для сравнения гемолиза пробы забирали через одинаковое время после включения облучения. Отметим, что фотогемолиз эритроцитов начинается тогда, когда скорость выхода  $K^+$  уже заметно уменьшается, а рН достигает максимума (пик всплеска). При этом, чем меньше время от начала включения освещения до пика всплеска рН, тем больше степень гемолиза эритроцитов.

ХЛ индуцирует  $K^+$ -проницаемость и изменение рН суспензии эритроцитов после включения облучения и при непосредственном добавлении его к суспензии эритроцитов (II способ инкубации). И при этом способе включение облучения через 3 мин инкубации приводит к картине, аналогичной

показанной на рис.1 (сплошные кривые). В этих опытах для получения заметного эффекта мы использовали количества ХЛ, равные 16-20 мкг/0,1 мл клеток. При 8 мкг ХЛ/0,1 мл клеток скорость выхода К<sup>+</sup> незначительна. Изменения же рН по крайней мере в течение 30-40 мин практически не наблюдалось. В дальнейшем мы использовали в основном II способ инкубации эритроцитов с ХЛ.

Таблица 1. Влияние различных соединений на фотогемолиз эритроцитов, вызываемый ХЛ. В случае контроля проба забирается через 30 мин инкубации клеток. В скобках указан % гемолиза, вызываемый только ХЛ.

Контроль	ХЛ, инкубация I способом	ХЛ+азид	ХЛ+каталаза	ХЛ+N-ЭМ
0,5±0,1	4,3±0,2	1,6±0,2 (2,9±0,3)	1,5±0,2 (2,9±0,3)	1,3±0,4 (3,6±0,4)

С целью выяснения активных форм кислорода (АФК), генерируемых ХЛ при облучении, и их влияния на барьерные функции эритроцитов, мы проверили действие ряда ингибиторов АФК на К<sup>+</sup>-проницаемость и гемолиз клеток.

На рис.2 показано влияние ловушки синглетного кислорода азида Na на индуцированный ХЛ выход К<sup>+</sup> из эритроцитов (0,1 мл клеток вносили в 1,9 мл среды, содержащей 150 мМ холинхлорида, 0,1 мМ КСl и 4 мМ NaCl. ХЛ добавляли непосредственно в кювету с суспензией эритроцитов). Как видно из рис.2 (штриховые кривые), инкубация с 2 мМ азида приводит к ингибированию выхода К<sup>+</sup> из клеток, при этом всплеск рН очень слабо выражен. Почти в 2 раза уменьшается и степень гемолиза эритроцитов (табл. 1).

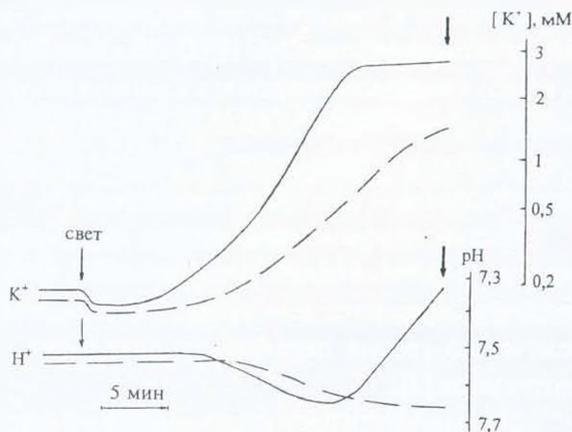


Рис.2. Влияние азида Na на фотоиндуцированный ХЛ выход К<sup>+</sup> и изменение рН суспензии эритроцитов. Сплошные линии — добавлено 16 мкг ХЛ/0,1 мл клеток, пунктирные линии — до ХЛ предварительно внесено 4 мМ азида Na.

Аналогично азиду действует и антиоксидантный фермент каталаза (1 мг/мл; табл. 1).

Другой антиоксидантный фермент супероксиддисмутаза (СОД, 1 мг/мл) оказывает незначительный эффект (не представлено).

При поглощении красного света молекула ХЛ возбуждается и образуются активные формы кислорода, которые, реагируя с мембранными компонентами, приводят к нарушению барьерной функции мембран. Тот факт, что в наших опытах при относительно низких количествах ХЛ облучение в течение наблюдаемого времени не приводит к заметному выходу  $K^+$  и гемолизу эритроцитов как при предварительной инкубации клеток с ХЛ (0,4 мкг ХЛ /0,1 мл клеток; рис.1, I способ инкубации), так и при непосредственном добавлении в ячейку (8 мкг ХЛ/0,1 мл клеток; II способ инкубации), можно объяснить присутствием в эритроцитах мощной антиоксидантной системы. Это в основном СОД, катализирующая реакцию образования  $H_2O_2$  из супероксидного радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), а также каталаза и глутатионпероксидаза, метаболизирующие  $H_2O_2$  до воды и  $O_2$  [4]. Очевидно, есть пороговое количество ХЛ, ниже которой антиоксидантные системы эритроцитов противодействуют разрушению мембраны активными формами кислорода, причем величина этого порога зависит от времени связывания ХЛ с мембранами. Не исключено также и проникновение ХЛ в цитоплазму эритроцитов, что в принципе объясняет большую эффективность ХЛ при длительной инкубации (I способ).

Как видно из наших опытов с азидом и каталазой, активными формами кислорода, образующимися при фотодинамическом действии ХЛ и приводящими к увеличению пассивной  $K^+$ -проницаемости и гемолизу эритроцитов, являются  $^1O_2$  и  $H_2O_2$ . Лосевым [3] ранее было отмечено участие  $^1O_2$  в фотосенсибилизированном хлоринами разрушении молекул и биоструктур в водных средах. Недавно было выявлено участие супероксидного аниона и гидроксильных радикалов в процессе фотогемолиза эритроцитов бактериохлорином синглетного кислорода [9].

Весьма интересно отметить, что азид Na является также и ингибитором каталазы [14]. Ранее нами было показано, что добавление  $H_2O_2$  в условиях ингибирования каталазы эритроцитов азидом приводит к выходу  $K^+$ , увеличению уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и гемолизу эритроцитов [2].

На основании настоящих опытов с азидом можно предположить, что начальным этапом фотодинамического действия ХЛ является появление  $^1O_2$ , очевидно, в результате непрямого взаимодействия возбужденного ФС с  $^3O_2$  и передачи ему энергии [1].

Супероксидный анион-радикал может образоваться при облучении в результате непосредственного взаимодействия молекулы ФС в возбужденном триплетном состоянии с  $O_2$  и передачи ему электрона [1].  $O_2^{\cdot-}$  опасен тем, что реагируя с  $H_2O_2$  может приводить к образованию сильного окислителя и очень реакционно-способного гидроксильного радикала (реакция Хабера-Вейсса) [5].



Однако поскольку добавление СОД не приводит к сколь-нибудь заметному уменьшению пассивной К<sup>+</sup>-проницаемости и степени гемолиза клеток, то скорее всего эта реакция не играет существенной роли в нарушении барьерной функции мембран. Очевидно О<sub>2</sub> превращается в Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> эндогенной СОД.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Потанин А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов, М., Высшая школа, 1989.
2. Гюльханданян А.В. Биол. журн. Армении, 40, 205-240, 1987.
3. Лосев А.П. В сб. "Лазерная биофизика и новые применения лазеров в медицине", Тарту, 5-17, 1990.
4. Мецлер Д. Биохимия, М., Мир, 2, 1980.
5. Фридович И.В. В кн. Свободные радикалы в биологии (под ред. У.Прайора), М., Мир, 1, 272-314, 1979.
6. Dubbelman T.M.A.R., de Bruijne A.W., van Steweninck J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 77, 811-817, 1977.
7. Dubbelman T.M.A.R., de Goeij A.F.P.M., van Steweninck J. Biochim. Biophys. Acta, 595, 133-139, 1980.
8. Dubbelman T.M.A.R., van Steweninck J. Biochim. Biophys. Acta, 771, 201-207, 1985.
9. Hoebeke M., Schuitmaker H.J., Jannink L.E., Dubbelman T.M.A.R., Jakobs A., van de Vorst A. Photochem. Photobiol., 66, 502-508, 1997.
10. Kochevar I.E., Bouvier J., Lynch M., Lin C.W. Biochim. Biophys. Acta, 1196, 172-180, 1994.
11. Orenstein A., Kostenich G., Roitman L., Shechtman Y., Kopolovic Y., Ehrenberg B., Malic Z. Br. J. Cancer., 73, 937-944, 1996.
12. Pandey R.K., Bellnier D.A., Smith K.M., Dougherty T.J. Photochem. Photobiol., 53, 5-72, 1991.
13. Spikes J.D., Jori G. Lasers Med. Sci., 2, 3-15, 1987.
14. Stocks J., Dormandy T.L. Brit. J. Haematol., 20, 95-111, 1971.

Поступила 13.VI.2001