

УДК 611.018.51

## ЭТАНОЛЬНЫЙ ЭКСТРАКТ ОБОЛОЧКИ СЕМЯН ТАМАРИНДА ЭФФЕКТИВНО ЗАЩИЩАЕТ ЭРИТРОЦИТЫ ОТ ЭРИПТОЗА, ВЫЗВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

© 2020 Дж. Кенгайя<sup>1</sup>, С.К.М. Нандиш<sup>1</sup>, Ч. Рамачандрайя<sup>1</sup>, Чандрама<sup>1</sup>, А. Шивайя<sup>1</sup>,  
Дж.Дж. Вишалакши<sup>2</sup>, М. Польш<sup>2</sup>, С.М. Сантош<sup>3</sup>, Р.Л. Шанкар<sup>4</sup>, Д. Саннанингайя<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Studies and Research in Biochemistry and Centre for Bioscience and Innovation,  
Tumkur University, 572103 Tumkur, India

<sup>2</sup> Department of Studies in Biochemistry, University of Mysore, Manasagangothry, 570006 Mysore, India

<sup>3</sup> Department of Medical Biochemistry and Microbiology (IMBM) Uppsala Biomedical Centre, 75237 Uppsala, Sweden

<sup>4</sup> Department of Sericulture, Yuvaraja's College, University of Mysore, 570006 Mysore, India;  
E-mail: sdevbiochem@gmail.com

Поступила в редакцию 01.04.2019

После доработки 04.10.2019

Принята к публикации 17.10.2019

Апоптоз или запрограммированная гибель эритроцитов – это ключевой момент в выявлении анемии при различных патологических состояниях, включая сахарный диабет, хронические заболевания почек (ХБП), рак, сепсис и др. Окислительный стресс, важный триггер в процессе ускоренной гибели эритроцитов при эриптозе, является основным механизмом, лежащим в основе возникновения анемических состояний при вышеуказанных патологиях. Поэтому выявление антиоксидантных и антиэриптогических средств для лечения связанных со стрессом заболеваний сегодня является все более востребованным. В настоящей работе продемонстрированы антиоксидантные и антиэриптогические свойства этанольного экстракта оболочки семян тамаринда (TSCEE), действующие против индуцированного ААРН (2,2' азобис (2-амидинопропан гидрохлорид)) окислительного стресса и эриптоза. Присутствие вероятных вторичных метаболитов в экстракте TSCEE исследовали с помощью колоночной хроматографии RP-HPLC. Активные функциональные группы, присутствующие в экстракте, были изучены с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FT-IR). Циклические вольтамперометрические исследования подтвердили антиоксидантный потенциал препарата. Кроме того, способность экстракта TSCEE защищать эритроциты была подтверждена при оценке маркеров эриптоза, таких как активные формы кислорода (АФК), внутриклеточный уровень кальция и экстернализация фосфатидилсерина. Также было показано, что экстракт TSCEE понижал уровень перекисного окисления липидов, содержание карбонильных групп в белках, восстанавливал внутриклеточный уровень глутатиона (GSH), способствовал активации антиоксидантных ферментов и ферментов, участвующих в восстановлении пула GSH. В заключение следует отметить, что TSCEE имеет обширное терапевтическое применение, поэтому он может быть перспективным терапевтическим агентом для лечения эриптоза, индуцированного окислительным стрессом, и следующей за этим анемии при различных патологиях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** этанольный экстракт оболочки семени тамаринда (TSCEE – Tamarind Seed Coat Ethanol Extract), активные формы кислорода (АФК), эриптоз, (GSH/GSSG), G6PDH, антиоксидант, ААРН.

DOI: 10.31857/S032097252001011X

Эритроциты – это наиболее уникальные клеточные компоненты, присутствующие в кровотоке, они являются основным средством снабжения кислородом и удаления углекислого газа из тканей через газообмен в легких. Каж-

дый день у здоровых взрослых людей появляются ~200 миллионов эритроцитов, и их продолжительность жизни составляет 120 дней. Цитокин под названием эритропоэтин, образующийся в почках, заставляет гемопоэтические стволовые клетки из костного мозга проходить ряд стадий дифференцировки, чтобы сформировать зрелые эритроциты, которые характеризуются отсутствием митохондрий и ядра [1, 2]. Будучи клетками, несущими кислород, эритроциты более подвержены окислительному повреждению. Некоторые аспекты, такие как непрерывное воздействие кислорода, высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в их липид-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ААРН – 2,2' азобис (2-амидинопропан гидрохлорид); GSH – восстановленный глутатион; GSH – окисленный глутатион; GRdx – глутатионредуктаза; GPx – глутатионпероксидаза; GST – глутатион-S-трансфераза; MetHb – метгемоглобин; СОД – супероксиддисмутаза; САТ – каталаза; ФС – фосфатидилсерин; ХБП – хронические болезни печени.

\* Адресат для корреспонденции.

ном бисное и автоокисление гемоглобина, приводящее к деградации гема, делают циркулирующие эритроциты восприимчивыми к окислительному повреждению [3]. В нормальных условиях эритроциты хорошо снабжены антиоксидантными молекулами и детоксицирующими ферментами для борьбы с окислительным стрессом. Однако сообщалось, что при некоторых патологических состояниях, включая диабет, рак и хронические заболевания почек (ХБП), наблюдали повреждение эритроцитов в результате окислительного стресса. В настоящее время показано, что терапевтические препараты, используемые для лечения этих патологических состояний, управляют окислительным стрессом, вызывая повреждение эритроцитов. Избыточный окислительный стресс вызывает как лизис эритроцитов [4], так их старение и гибель от эриптоза. Эриптоз – это суицидальная гибель эритроцитов, которая характеризуется сморщиванием клеток и скремблированием рассматриваемыми как признаки апоптоза [5]. Таким образом, устойчивый окислительный стресс может изменить параметры крови за счет снижения количества эритроцитов и, наконец, может привести к тяжелым анемическим состояниям. Анемия вызывает гипоксию в различных органах, а симптомы анемии включают расстройство желудка, нарушение когнитивных функций, депрессию, сердечно-сосудистые осложнения, головокружение и одышку при физической нагрузке. Кроме того, у пациентов, страдающих раком, ХБП и сердечно-сосудистыми осложнениями, окислительный стресс, вызванный анемией, является наиболее распространенной проблемой [6]. Антиоксидантная терапевтическая стратегия помогает в более эффективном управлении вышеуказанной проблемой, чтобы преодолеть эти вторичные побочные эффекты при различных патологиях. Лекарственное растение тамаринд – источник богатый антиоксидантными молекулами – является предпочтительным выбором для терапии. Тамаринд индийский или индийский финик (*Tamarindus indica L*) относится к семейству Fabaceae и подсемейству Caesalpinioideae. Хотя родиной этого тропического дерева является Африка, оно широко представлено в мире. *T. Indica* является стручком и, подобно фруктам, имеет съедобную часть и семена. Съедобная часть используется в ресторанах и традиционной медицине по всему миру. В то же время семенная оболочка (TSCEE), содержит множество фитохимических веществ, главным образом полифенолов, алкалоидов, флавоноидов, тритерпенов и полисахаридов, используемых при лечении различных патофизиологических состояний человека [7].

Несмотря на огромное терапевтическое применение оболочки семян тамаринда его способность защищать эритроциты не была исследована. Таким образом, в настоящей работе показана эффективность защиты эритроцитов с помощью TSCEE против ААРН-индуцированного окислительного стресса.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Химические соединения и реактивы.** 2,2'-азобис (2-амидинопропан гидрохлорид) (AAPH); 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин (DCFDA); Fura-2AM, меченый аннексин V-FITC; HEPES [4-(2-гидроксиэтил)-1 пиперазин этансульфоновая кислота]; тиобарбитуровая кислота (ТВА); 1,1',3,3'-тетраметоксипропан (TMP); восстановленный глутатион (GSH); окисленный глутатион (GSSG); *O*-фталевый альдегид; 1-хлор-2,4-динитробензол (CDNB) и кальцеин были приобретены у фирмы «Sigma», США. Все остальные реактивы были аналитической чистоты.

**Растительный материал и получение экстракта оболочки семени тамаринда.** Семена тамаринда были приобретены на местном рынке в городе Тумкур. Семена были тщательно помыты и высушены при комнатной температуре в течение 24 ч, после этого высушенные семена прогревали при температуре 50 °С в течение 15 мин, семенные оболочки механически отделяли, гомогенизировали, перетирая пестиком в ступке, добавляя 95% этанол. Полученный этанольный экстракт фильтровали через фильтровальную бумагу Ватман № 1 и выпаривали спирт. Полученный фильтрат полностью растворяли в воде и использовали для проведения дальнейшего анализа.

**Анализ растительных компонентов экстракта TSCEE с помощью прибора HPLC-PDA.** Растительные компоненты экстракта TSCEE определяли при помощи HPLC-PDA («Waters Corporation», США). Примерно 20 мкл образца TSCEE наносили на колонку C<sub>18</sub> (150 мм × 4,60 мм, размер частиц 5 мкм). Колонку предварительно уравнивали 10%-м ацетонитрилом в воде для HPLC. Образец элюировали с использованием линейного градиента воды для HPLC и ацетонитрила (растворители А и В, 9 : 1 v/v). Скорость потока составляла 1 мл/мин, и образец сканировали при различных длинах волн в диапазоне 200–800 нм.

**Инфракрасная спектрофотометрия с преобразованием Фурье (FT-IR – Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) и определение антиоксидантной активности экстракта TSCEE с помощью циклической вольтамперометрии.** Измере-

ния спектров FT-IR и циклическую вольтамперометрию проводили по методам Karegu et al. [8] и Arulpriya et al. [9]. ИК-спектры записывали, используя Frontier FT-IR/FIR system («Perkin Элмера», США) в виде гранул КБР. Циклическую вольтамперометрию (CV – cyclic voltammetry) проводили на приборе CHI608E model potential state в стандартных трехэлектродных ячейках из стекловидного углерода с платиновой проволокой и электрода Ag/AgCl при комнатной температуре.

**Забор крови человека.** Забор крови у здоровых взрослых волонтеров проводили с использованием антикоагулянта, кислой цитратной декстрозы (ACD – Acid Citrate Dextrose; 85 мМ цитрата натрия, 71 мМ лимонной кислоты и 111 мМ декстрозы) в соотношении 6/1 = = кровь/ACD (v/v), после чего центрифугировали при 200 g в течение 10 мин при 37 °С. В результате была получена обогащенная тромбоцитами плазма (супернатант) и осадок, содержащий эритроциты. Осажденные эритроциты промывали 2–3 раза 10 мМ фосфатным солевым буфером (PBS – Phosphate Buffer Saline, pH 7,4). Далее получали 2%-ный гематокрит на основе осажденных эритроцитов с добавлением 1 мМ глюкозы в 10 мМ PBS, и использовали его для дальнейшего анализа.

**Определение уровня индуцированного ААРН метгемоглобина (MetHb) и активности MetHb-редуктазы.** Образование MetHb в эритроцитах определяли с помощью метода Benesch et al. [10] с небольшими изменениями. Вкратце, по 1 мл эритроцитов (2%-ный гематокрит) помещали в пробирки, независимо обрабатывали различными концентрациями ААРН (0–500 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. После завершения инкубации клетки лизировали в PBS, содержащем 1%-ный Triton X-100 (1/1, v/v) и измеряли поглощение при 630 нм. В качестве положительного контроля эритроциты обрабатывали 20 мМ NaNO<sub>2</sub> (это означало, что образуется 100% MetHb). Для определения защитного эффекта к предварительно обработанным ААРН (500 мкМ) эритроцитам добавляли различные концентрации экстракта TSCEE (0–200 мкг/мл).

Активность MethHb-редуктазы определяли по методу Sharma et al. [11]. Вкратце, к исходным ААРН (500 мкМ) и предварительно обработанным ААРН (500 мкМ) гемолизатам добавляли различные концентрации TSCEE (0–200 мкг/мл) вместе с НАДН и 2,6 дихлорфенолиндофенолом в качестве акцептора электронов, после чего измеряли поглощение образцов при 600 нм. Активность MethHb-редуктазы рассчитывали по скорости снижения поглощения.

**Определение уровня активных форм кислорода (АФК), внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и экстернализации фосфатидилсерина (ФС).** Ключевые параметры эриптоза, такие как повышение содержания АФК, повышение уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и экстернализация фосфатидилсерина, оценивали с помощью метода Driver et al. [12] с некоторыми незначительными изменениями. Для индукции эриптоза использовали ААРН (1 мМ), а для исследования ингибирования эритроциты (2%-ный гематокрит) предварительно инкубировали с ААРН (1 мМ) и затем обрабатывали различными концентрациями экстракта TSCEE (0–200 мкг/мл). Конечный объем доводили до 200 мкл раствором Рингера, содержащим 125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 3 мМ MgSO<sub>4</sub>, 5 мМ HEPES, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ глюкозы (pH 7,4) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Далее в реакционную смесь добавляли флуоресцентные красители, такие как DCF-DA (10 мкМ), Fura-2AM (2 мкМ) и аннексин V-FITC (5 мкМ), и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, чтобы определить уровни АФК, внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и степень экстернализации ФС соответственно. Полученную флуоресценцию измеряли с помощью считывателя для микропланшет Varioskan multimode plate reader («Thermo Scientifics», США) при возбуждении реакционной смеси при 488 нм с последующей эмиссией при 530 нм для определения АФК. Для определения внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> возбуждение клеток проводили при 340 и 380 нм при постоянной длине волны эмиссии 500 нм. Экстернализация ФС проводили при длине волны возбуждения 496 нм и длине волны эмиссии 530 нм.

**Определение жизнеспособности эритроцитов.** Анализ жизнеспособности эритроцитов проводили по методу NaveenKumar et al. [13]. Сначала эритроциты (2%-ный гематокрит) независимо обрабатывали или ААРН (1 мМ) или TSCEE (200 мкг/мл). При определении ингибирующей роли клетки обрабатывали ААРН (1 мМ) в присутствии возрастающих концентраций TSCEE (0–200 мкг/мл) и инкубировали в течение 8 ч при 37 °С, затем их окрашивали кальцеином AM (10 мкМ) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Клетки дополнительно промывали и измеряли флуоресценцию при длине волны возбуждения 488 нм, а эмиссию регистрировали при 585 нм.

**Определение перекисного окисления липидов (LPO – lipid peroxidation) и содержания карбонильных групп в белках (PCC – protein carbonyl content).** Перекисное окисление липидов оценивали с помощью метода Ohakawa et al. [14]. В сухие пробирки для определения размещали ~1,0–2,0 мг белка лизата эритроцитов, обрабо-

таных агонистом AAPH (1 мМ) и TSCEE (0–200 мкг/мл). Затем в каждую пробирку добавляли ~1,5 мл 20%-ной уксусной кислоты (v/v) (pH 3,5), 0,2 мл 8%-го (w/v) SDS и 1,5 мл 0,8%-ной (w/v) тиобарбитуровой кислоты. Реакционную смесь нагревали при 45–60 °С в течение 45 мин, затем центрифугировали при 450 g в течение 10 мин. Образующиеся аддукты экстрагировали 1-бутанолом (3 мл). Образующийся продукт TBARS (Thiobarbituric Acid-Reactive Substance) регистрировали при 532 нм и рассчитывали его количество, используя в качестве стандарта TMP (1,1,3,3-тетраметоксипропан).

Содержание карбонильных групп в белках измеряли с помощью динитрофенилгидразина (DNPH) в соответствии с методом, описанным Levine et al. [15]. К 1 мг/мл белка лизата эритроцитов, обработанных агонистом AAPH (1 мМ) и TSCEE (0–200 мкг/мл), добавляли 5 мкл 10 мМ DNPH в 2 N HCl и инкубировали в течение 1 ч при периодическом встряхивании при комнатной температуре. Соответствующие контрольные образцы приготавливали путем добавления только 2N HCl. После завершения инкубации реакционную смесь осаждали с помощью 20%-ной TХУ и центрифугировали при 1200 g в течение 15 мин. Полученный осадок дважды промывали ацетоном, центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин и растворяли в 1 мл 20 мМ Tris-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 0,14 M NaCl и 2% SDS. Поглощение супернатанта регистрировали при 360 нм. Разницу в значении поглощения определяли и выражали в мкм карбонильных групп/мг белка, используя коэффициент молярной экстинкции 22 ММ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>.

**Определение содержания GSH и GSSG.** Чтобы выявить редокс-статус эритроцитов, определяли уровни GSH и GSSG, используя метод Sundaram et al. [16]. Вкратце, чтобы оценить уровень GSH, к эритроцитам (2%-ный гематокрит), предварительно обработанным агонистом AAPH (1 мМ) и ингибиторами TSCEE (0–200 мкг/мл), добавляли *o*-фталевый альдегид (1 мг/мл) при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее чтобы определить соотношение GSH/GSSG, до добавления *o*-фталевого альдегида образцы обрабатывали *N*-этилмалеимидом (10 мМ). Итоговую флуоресценцию измеряли при 430 нм после возбуждения образцов при 365 нм. Концентрацию GSH и GSSG определяли с использованием стандартных кривых.

**Определение активности ферментов, участвующих в поддержании редокс-гомеостаза.** *Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ).* Определение активности СОД и КАТ в лизатах эритроцитов проводили с использованием метода, описанного Sundaram et

al. [7]. Вкратце, 2%-ный гематокрит в PBS обрабатывали как контроль, а 1 мМ AAPH – как агонист соответственно. Для исследования ингибирующего влияния эритроциты, обработанные AAPH, инкубировали с TSCEE (0–200 мкг) в течение 2 ч. После завершения инкубации эритроциты лизировали в дистиллированной воде и использовали для определения активности ферментов, таких как СОД и КАТ. Для определения активности СОД 0,1 мл лизата эритроцитов (0,05 мг белка) добавляли в реакционную смесь (1 мл), состоящую из фосфатного буфера (16 мМ, pH 7,8), смеси TEMED/ЭДТА (8 мМ/0,08 мМ) и 0,15% (w/v) кверцетина. Снижение величины поглощения регистрировали в течение 1 мин при 406 нм. За единицу принимали количество белка, которое ингибирует процесс автоокисления кверцетина на 50%. Для определения активности КАТ в лизатах эритроцитов проводили измерение скорости гидролиза H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при 240 нм. Образцы эритроцитов (0,05 мг белка) добавляли в реакционную смесь (1мл), содержащую натрий-фосфатный буфер (100 мМ, pH 7,4) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8,8 мМ). Регистрировали снижение поглощения при 240 нм в течение 3 мин и активность фермента выражали в виде количества мМ разложившейся H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мин/мг белка.

*Определение активности глутатионредуктазы (GRdx), глутатионпероксидазы (GPx) и глутатион-S-трансферазы (GST).* Активность GRdx в лизатах эритроцитов определяли по методу, описанному Sundaram et al. [7]. Кратко, к 1 мл 100 мМ фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего 2 мМ ЭДТА, 20 мМ GSSG и 2 мМ НАДФН (в 0,1%-ном NaHCO<sub>3</sub>) добавляли 0,1 мл лизата эритроцитов (0,05 мг белка). Снижение величины поглощения при 340 нм регистрировали в течение 3 мин.

Активность GPx измеряли с помощью метода с сопряженными ферментами, как это было описано Tung et al. [17]. В реакционную смесь (1 мл), содержащую 770 мкл 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,0), 100 мкл 10 мМ GSH, 100 мкл 2 мМ НАДФН, 10 мкл 1,125 M азида натрия и 10 мкл 100 U/мл GPx, добавляли ~10 мкл лизата эритроцитов. После уравнивания смеси в течение 10 мин реакцию начинали, добавляя в реакционную смесь 50 мкл 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и измеряли окисление НАДФН в течение 3 мин при 340 нм. Активность GPx рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции для НАДФН при 340 нм, равный 6,22 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

Активность GST измеряли в соответствии с методом Guthenberg et al. [18]. В реакционную смесь (1 мл), содержащую 900 мкл 100 мМ PBS (pH 6,5), 1 мМ ЭДТА, 50 мкл 20 мМ GSH и 50 мкл CDNB (20 мМ раствор в этаноле), аго-

нист (AAPH, 1 мМ) и ингибитор (TSCEE, 0–200 мкг/мл), добавляли предварительно обработанные эритроциты (2%-ный гематокрит). Смесь инкубировали течение 3 ч, после чего регистрировали увеличение поглощения при 340 нм в течение 3 мин. За единицу активности глутатион-редуктазы, глутатиопероксидазы и глутатион-S-трансферазы принимали количество фермента, необходимое для получения 1,0 мкмоль соответствующего продукта или потребления 1,0 мкмоль соответствующего субстрата за 1 мин.

**Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH).** Активность G6PDH определяли по увеличению величины поглощения при 340 нм в течение 3 мин благодаря НАДФ-зависимому превращению глюкозо-6-фосфата [16]. Вкратце, промытые эритроциты (2%-ный гематокрит в PBS) обрабатывали агонистом AAPH (1 мМ). При исследовании ингибирующего эффекта обработанные AAPH эритроциты инкубировали с TSCEE (0–200 мкг) в течение 3 ч при 37 °С. После завершения инкубации эритроциты суспендировали и лизировали в 1 мМ PBS буфере. Лизаты использовали для определения активности G6PDH в реакционной смеси (1 мл) 50 мМ Tris-HCl (рН 7,5), содержащей 3,8 мМ НАДФ, 3,3 мМ глюкозо-6-фосфата и 6,3 мМ MgCl<sub>2</sub>. За единицу активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы принимали количество фермента, способное производить 1,0 мкмоль НАДФН в течение 1 мин.

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка в образцах определяли по методу Lowry et al. [19], используя в качестве стандарта БСА.

**Статистическая обработка данных.** Статистический анализ был выполнен при использовании программы Graph Pad Prism. Все результаты представляют среднее значение ± стандартная ошибка отклонения трех независимых экспериментов.

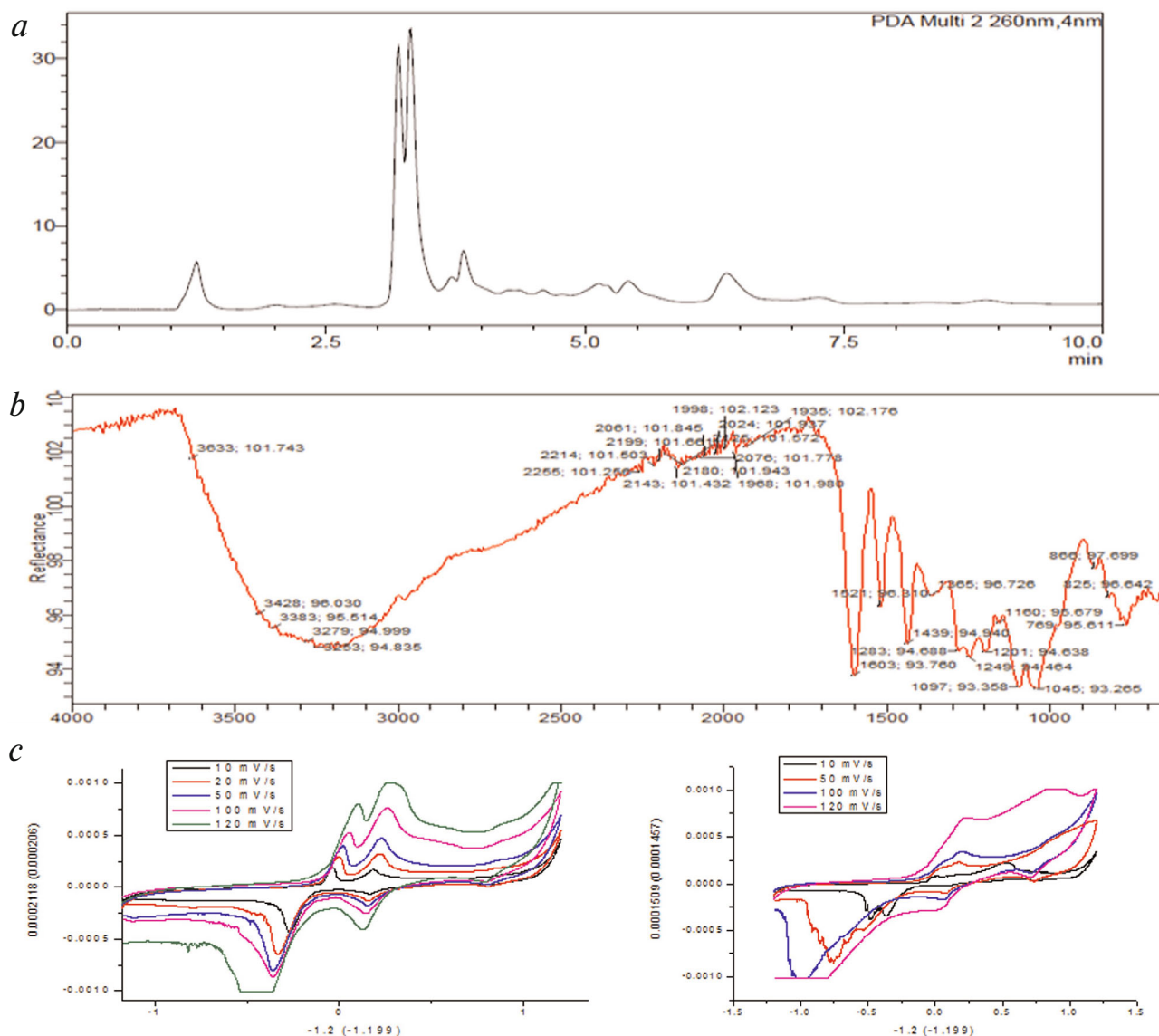
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экстракт TSCEE содержит большое количество алкалоидов, флавоноидов и полифенолов.** Для определения фитохимических составляющих в экстракте TSCEE, образцы подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке C18 с фотодиодным регистратором (RP-HPLC-Photo Diode Array detector). Мониторинг хроматографического разделения проводили в диапазоне длин волн 200–800 нм в течение 1 ч. Полученные хроматограммы свидетельствуют о том, что фитохимическими веществами, присутствующими в экстракте TSCEE, яв-

ляются алкалоиды, флавоноиды и полифенолы (рис. 1, а). Далее спектры FTIR экстракта TSCEE показали присутствие полосы поглощения при 3446 и 3429 см<sup>-1</sup>, предполагающие растяжение связи О–Н. Кроме того, в экстракте TSCEE была обнаружена арильная полоса при 590 см<sup>-1</sup>, а алкильные полосы появились при 507 и 521 см<sup>-1</sup>. Это укрепляет предположение о присутствии гидроксильных, арильных и алкильных групп в экстракте TSCEE, что свидетельствует о наличии активных биохимических соединений (рис. 1, б).

**Антиоксидантная активность экстракта TSCEE.** Для определения антиоксидантного потенциала экстракта TSCEE скорость окислительно-восстановительного сканирования измеряли, используя различные системы растворителей K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] + K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] + KCl (5 мМ) в диапазоне скорости сканирования 10–120 мВс<sup>-1</sup> и KOH (0,3 мМ). Установлено, что диапазон потенциалов окислительно-восстановительных пиков для электрода сравнения составляет от -1,2 до +1,2 В относительно Ag/AgCl (0,1 мМ KCl). Был приготовлен электрод на основе углеродной пасты (CPE) путем измельчения порошка графита (70%) и силиконового масла (30%) при использовании небольшого пестика и ступки при ручном перемешивании в течение ~30 мин, что позволило получить гомогенный чистый CPE. Он действует как рабочий электрод, платиновая проволока выступает в качестве противоположного электрода и Ag/AgCl – в качестве электрода сравнения. Для этого экстракта нами были получены два пика окисления (E<sub>рс</sub> = -0,030 и 0,175) и два пика восстановления (E<sub>ра</sub> = -0,270 и 0,164). Анодный пиковый ток сдвигает E<sub>ра</sub> в анодном направлении в присутствии TSCEE. Это указывало на то, что фитоконституенты TSCEE адсорбировались на поверхности электрода. Наши наблюдения позволяют предположить, что процесс был диффузионно контролируемым. Кроме того, было обнаружено, что E<sub>ра</sub> смещается в анодном направлении с увеличением скорости развертки, что указывает на квазиобратимый характер электродной реакции. Было также отмечено, что анодный пиковый потенциал (E<sub>ра</sub>) и полупиковый потенциал (E<sub>рс</sub>) были смещены в сторону более положительных значений, это свидетельствует о том, что экстракт тушит свободные радикалы кислорода. Рис. 1, с представляет собой электрохимические циклические вольтамперограммы кривых экстракта TSCEE.

**Экстракт TSCEE снижает индуцированное AAPH образование АФК, уровень внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, смягчает экстернализацию ФС и снижает уровень гибели эритроцитов.** Было изучено



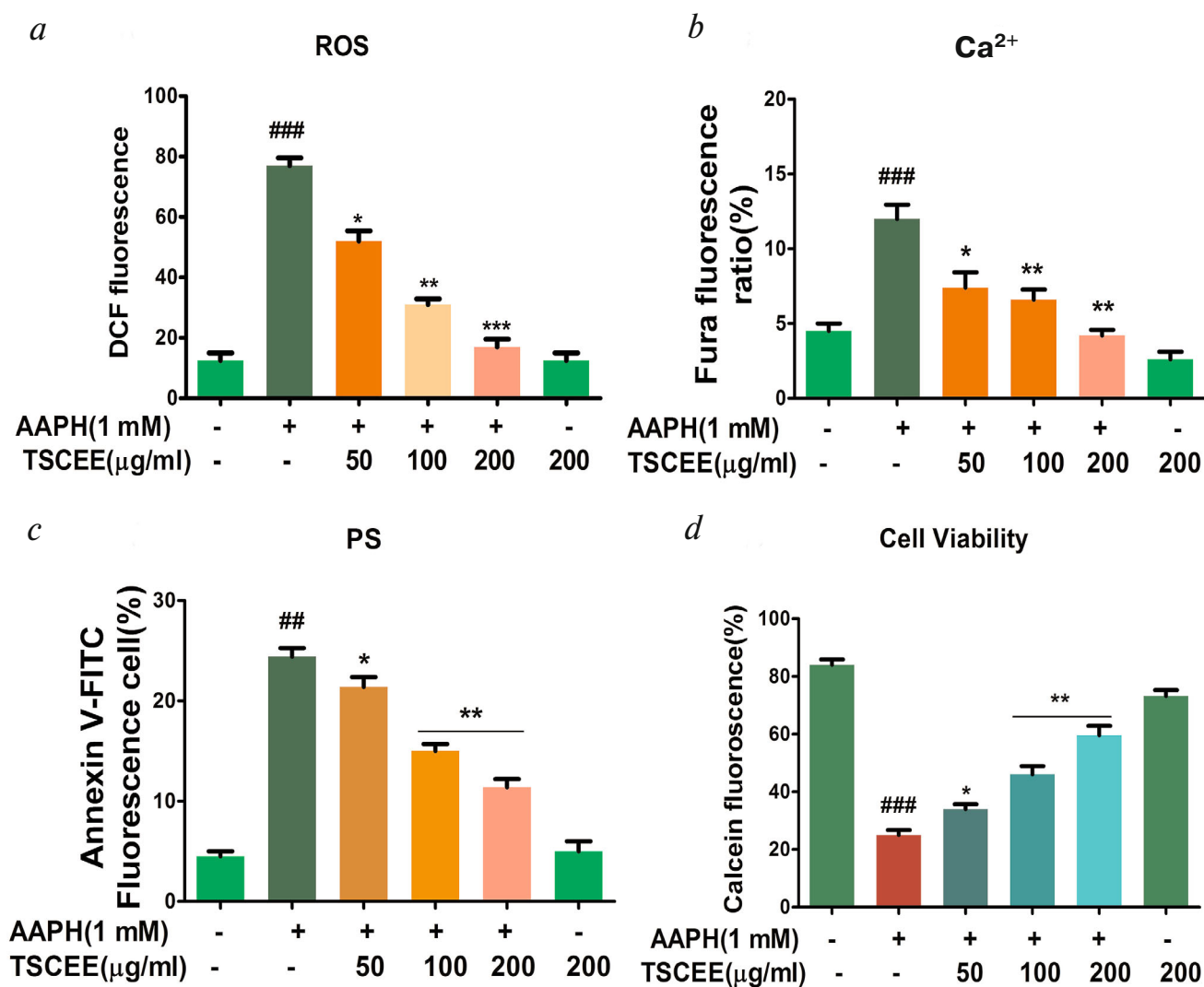
**Рис. 1.** Анализ с использованием HPLC и антиоксидантная активность экстракта TSCEE. На рис. 1 представлены результаты проведенного анализа TSCEE с использованием RP-HPLC и FTIR и циклической вольтаперометрии. *a* – TSCEE анализировали с помощью метода RP-HPLC с использованием колонки  $C_{18}$  ( $150 \times 4,60$  мм; размер частиц 5 мкм). Колонка, предварительно уравновешенная 10%-м ацетонитрилом в воде для HPLC. Образец элюировали с использованием линейного градиента (9 : 1 v/v) растворителя А (вода для HPLC) и растворителя В (ацетонитрил) со скоростью потока 1 мл/мин в диапазоне 200–800 нм. Белок элюировали при скорости потока 1 мл/мин при мониторинге в диапазоне 200–800 нм. *b* – Спектры FTIR (Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье) экстракта TSCEE показывают вероятные функциональные группы в TSCEE. *c* – Результаты цикловольтаперометрического анализа, объясняющие редокс-потенциал экстракта оболочки семян тамаринда. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

влияние экстракта TSCEE на запускаемую ААРН генерацию АФК с помощью маркировки эритроцитов флуорофором DCF-DA. Значительное повышение уровня АФК наблюдали при инкубации эритроцитов только с ААРН, в то время как не было никаких изменений при инкубации эритроцитов только с экстрактом

TSCEE. Кроме того, экстракт TSCEE значительно снижал уровень генерации АФК, вызванной ААРН, это явление зависело от дозы, и полное ингибирование наблюдали при концентрации 200 мкг (рис. 2, *a*). На рис. 2, *b* показано влияние TSCEE на индуцированное ААПГ повышение уровня  $Ca^{2+}$  в эритроцитах. Для измерения уров-

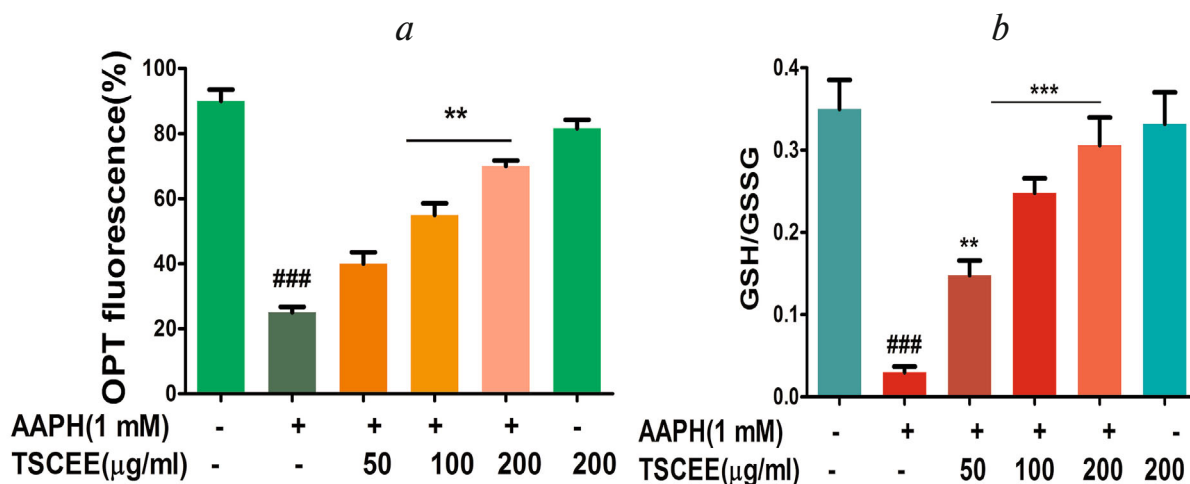
ня содержания внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  использовали флуоресцирующий индикатор их присутствия. Обработка промытых эритроцитов с использованием ААРН вызвала повышение уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Экстракт TSCEE повышал уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в результате дозозависимой индукции ААРН. Было обнаружено, что TSCEE осуществляет значительную защиту при концентрации

200 мкг. Устойчивое повышение внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  является ключевым событием в иницировании скремблирования мембран и экстернализации ФС, которое можно идентифицировать с помощью окрашивания аннексином V. Как видно на рис. 2, с ААРН усиливал связывание аннексина V, а экстракт TSCEE ингибировал связывание аннексина в зависимости от дозы, и значительное ингибирование на-



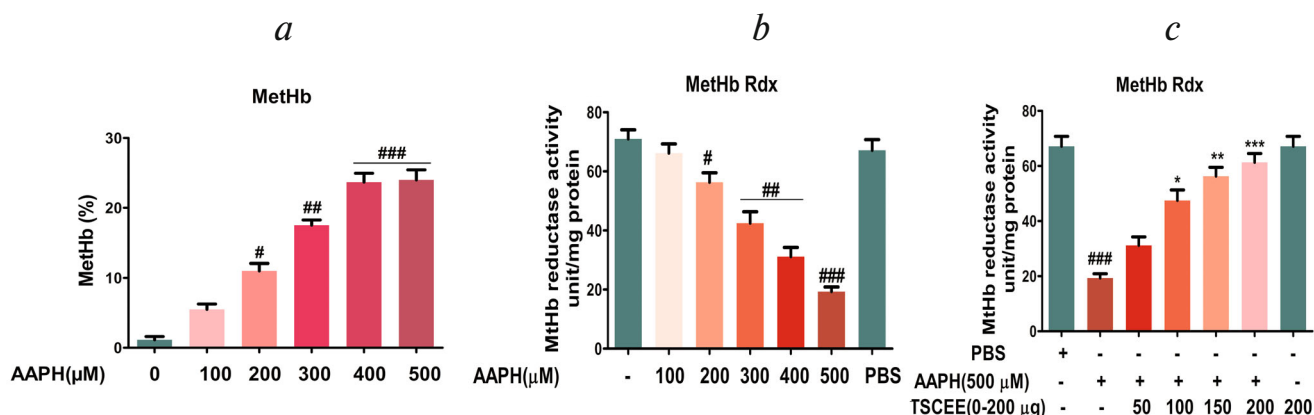
**Рис. 2.** Влияние TSCEE на ААРН-индуцированное образование АФК, внутриклеточный уровень ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , ФС и процесс гибели эритроцитов. Влияние TSCEE на ААРН-индуцированное образование АФК и репрезентативная диаграмма, на которой представлены средние значения изменений интенсивности флуоресценции DCF (a). б – Влияние TSCEE на ААРН-индуцированные изменения уровня ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клеток. с – Влияние TSCEE на ААРН-индуцированную экстернализацию ФС эритроцитов, и их репрезентативную гистограмму, показывающую медианные изменения интенсивности флуоресценции FITC-конъюгированного аннексина-V. д – Определение выживаемости клеток при использовании регистрации флуоресценции кальцеина. Промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в растворе Рингера, дополненной ААРН в присутствии или в отсутствие TSCEE. Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ), выраженных в виде процентов, на которые возросла флуоресценция DCF, Fura-2/AM и аннексина в сравнении с контролем. ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с контролем. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с ААРН.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohshm/>



**Рис. 3.** Влияние TSCEE на ААРН-индуцированный окислительный стресс в эритроцитах и оценка маркером стресса. Соотношение GSH (a) и GSH/GSSG (b) в эритроцитах. Вкратце, промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в PBS, дополненной ААРН (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE. Для определения соотношения GSH и GSH/GSSG были использованы лизаты отмытых эритроцитов, что достоверно отличалось от контроля. Значения представлены в виде среднего  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); ###  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с контролем; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с ААРН.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>



**Рис. 4.** Влияние ААРН на образование MetHb определяли по активности MetHb-редуктазы. a – ААРН дозозависимо индуцировал образование MetHb при концентрации 100, 200, 300, 400, 500 мкМ в течение 24 ч при 37 °С. b – активность MetHb-редуктазы в лизате эритроцитов, обработанном ААРН (0-500 мкМ). c – Ингибирование ААРН-индуцированного образования MetHb с помощью преинкубации с TSCEE. Все данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  по сравнению с контролем PBS; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению только с ААРН.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

блюдали при концентрации 200 мкг. Для определения эффективности защиты экстракта TSCEE для эритроцитов, обработанных ААРН, проводили анализ жизнеспособности клеток с использованием кальцеинового красителя (рис. 2, d). Примечательно, что TSCEE показал значительную защитную эффективность на поврежденных клетках эритроцитов, поскольку он способствовал сохранению нормальной

морфологии клеток в концентрации 200 мкг, которая была сопоставима только с положительными контрольными эритроцитами. Поэтому можно предположить, что TSCEE защищает эритроциты от эритроптоза, индуцированного окислительным стрессом.

**TSCEE восстанавливает уровень GSH в эритроцитах.** GSH играет жизненно важную роль в смягчении окислительного

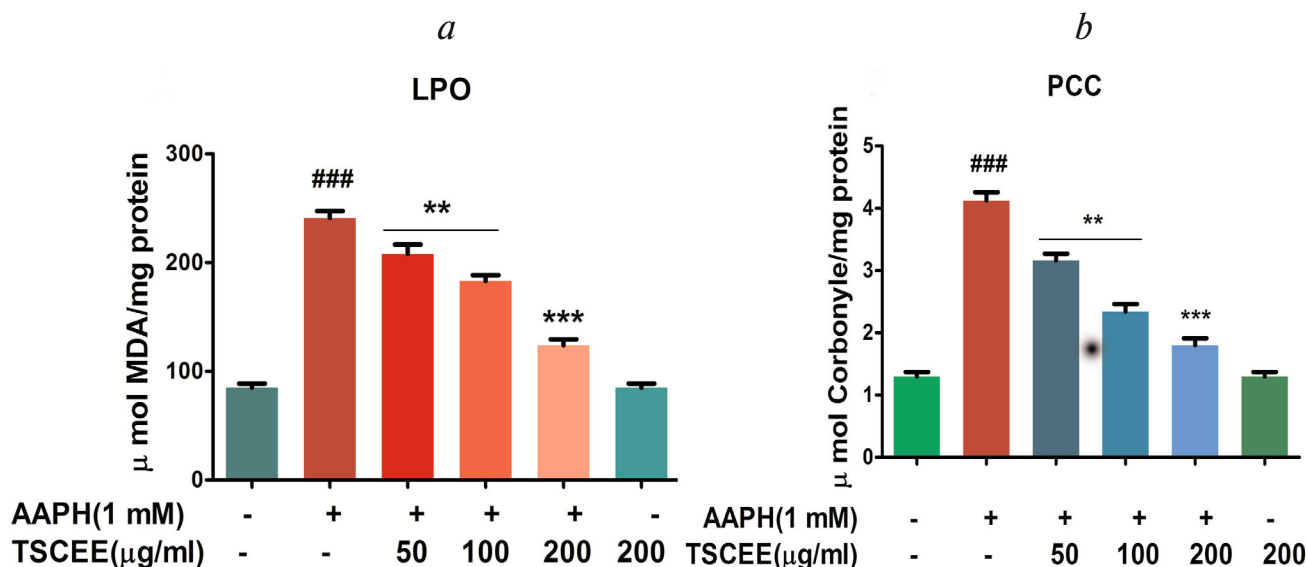


стресса, так как он участвует в детоксикации через конъюгацию. Снижение уровня GSH оказывает негативное влияние на клеточную и молекулярную функцию. Поэтому нами было изучено влияние экстракта TSCEE на уровень GSH в эритроцитах, обработанных AAPH. В нормальных эритроцитах был выявлен обычный уровень GSH. С другой стороны, в эритроцитах, обработанных AAPH, уровень GSH был понижен в сравнении с контролем. Следует подчеркнуть, что 200 мкг экстракта TSCEE способствовали восстановлению нормального уровня GSH в эритроцитах, обработанных AAPH (рис. 3, *a*). Кроме того, обработка клеток экстрактом TSCEE эффективно восстанавливала соотношение GSH/GSSG, нарушенное применением AAPH (рис. 3, *b*).

**TSCEE восстанавливает уровень редуктазы MetHb в эритроцитах.** В обработанных AAPH лизатах РБК наблюдался повышенный процент образования MetHb по сравнению с необработанным лизатом эритроцитов (рис. 4, *a*). Исследовали активность редуктазы MetHb, ответственной за реверсию MetHb в гемоглобин. В поврежденных эритроцитах уровень редуктазы MetHb был резко снижен по сравнению с лизатом эритроцитов, обработанным PBS (рис. 4, *b*). Интересно, что TSCEE нормализовал уровень редуктазы MetHb в лизате

эритроцитов, обработанном AAPH, дозозависимым образом по сравнению с необработанным лизатом эритроцитов (рис. 4, *c*).

**TSCEE уменьшает вызванные действием AAPH перекисное окисление липидов и карбонилирование белков.** Перекисное окисление липидов — ключевое событие, которое демонстрирует последствия окислительного стресса. На рис. 5, *a* представлены результаты изучения влияния экстракта TSCEE на индуцированное AAPH перекисное окисление липидов. Эритроциты, которые подверглись воздействию AAPH, демонстрировали значительное повышение уровня перекисного окисления липидов, что можно видеть по существенному увеличению содержания малонового альдегида (МДА). Вызывает интерес тот факт, что TSCEE понижал уровень МДА в дозозависимом режиме, и полное ингибирование наступало при концентрации 200 мкг/мл. Далее исследовали защитное действие TSCEE на степень окисления белков в эритроцитах человека. Экспериментальные результаты показали значительное повышение уровня карбонильных групп в эритроцитах обработанных AAPH по сравнению с контролем. Более того, экстракт TSCEE в концентрации 200 мкг/мл вызывал значительное снижение уровня карбонильных групп в эритроцитах, подвергшихся воздействию AAPH (рис. 5, *b*).



**Рис. 5.** Влияние TSCEE на AAPH-индуцированный окислительный стресс в эритроцитах и оценка маркеров стресса. Вкратце, промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в PBS, дополненной AAPH (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE. Влияние TSCEE на индуцированное AAPH (*a*) перекисное окисление липидов (LPO), *b* — содержание карбонильных групп в белках (PCC), LPO и PCC определяли с использованием образцов мембран эритроцитов (1 мг/мл). Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). <sup>###</sup>  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с контролем; <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$ , <sup>\*\*\*</sup>  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с AAPH.

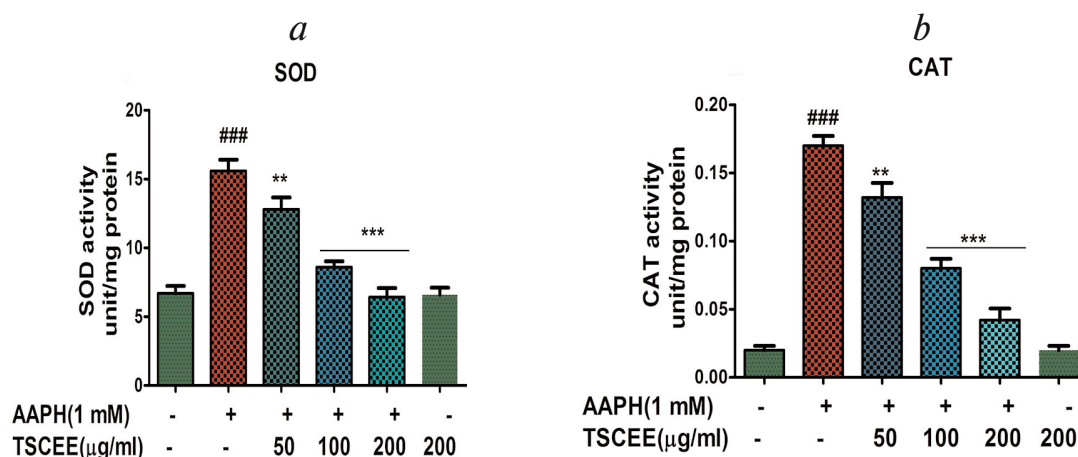
С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

**TSCEE модулирует ААРН-индуцированное окислительное повреждение и восстанавливает активность ферментов, участвующих в окислительно-восстановительном гомеостазе.** Постоянный окислительный стресс является первичным фактором, который истощает антиоксидантную систему клеток. Эндогенные антиоксидантные ферменты, такие как СОД и КАТ, играют ключевую роль в восстановлении исходного редокс-состояния клеток. Поэтому в настоящей работе было оценено защитное действие экстракта TSCEE на уровни антиоксидантных ферментов. Значительное повышение активности антиоксидантных ферментов (СОД и КАТ) было отмечено в эритроцитах, обработанных ААРН (1 мМ) (рис. 6, *a* и *b*), и резкое снижение активности СОД и КАТ наблюдали в эритроцитах, обработанных TSCEE (0–200 мкг). В дополнение к изменениям активности антиоксидантных ферментов еще одним ключевым событием в борьбе с окислительным стрессом является повышение уровня эндогенного GSH. Поэтому в настоящей работе были определены уровни ферментов, которые восстанавливают исходный уровень GSH, включая GST, GR, GPx и G6PDH, в эритроцитах, обработанных ААРН (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE (рис. 7, *a* и *b*). Было показано, что в эритроцитах, обработанных ААРН (1 мМ), происходит значительное увеличение активности всех антиоксидантных ферментов. Более того, наблюдали значительное понижение активности G6PDH и GST, а обработка клеток экстрактом TSCEE (200 мкг) приводила к

существенному восстановлению активности этих ферментов. Кроме того, активность ферментов, задействованных в кругообороте глутатиона, таких как GRdx (рис. 7, *c*) и GPx (рис. 7, *d*), снижалась после обработки клеток ААРН. В то же время обработка эритроцитов экстрактом TSCEE (200 мкг) приводила к существенному восстановлению активности GRdx и GPx в эритроцитах, обработанных ААРН.

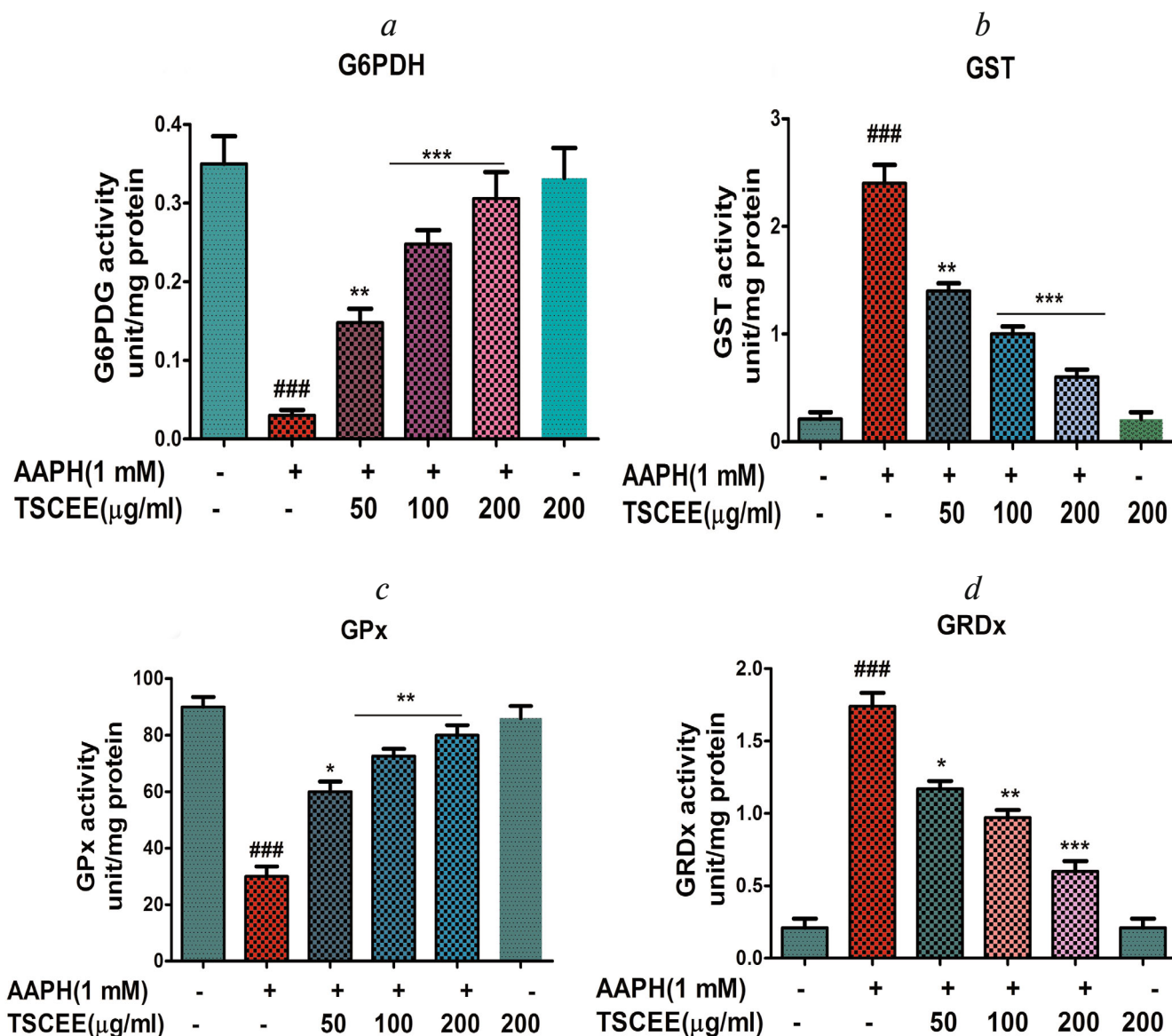
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эритроциты являются основными клеточными компонентами, которые в кровотоке часто подвергаются воздействию различных химических соединений способных быстро разрушить мембрану эритроцитов и воздействовать на их нормальное функционирование. Эритроциты являются основными несущими кислород клетками, поэтому они наиболее склонны к окислительному повреждению, которое может в дальнейшем закончиться гемолизом или вызвать самоубийственную смерть, называемую эриптозом [20]. Подобно апоптозу, эриптоз характеризуется увеличением внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , сморщиванием клеток, обесцвечиванием мембран и экспонированием фосфатидилсерина на клеточной мембране. Сообщалось, что окислительный стресс вызывает эриптоз путем активации чувствительного к ионам  $Ca^{2+}$  проницаемого неизбирательного катионного канала. Проникновение внутрь клетки значительных



**Рис. 6.** TSCEE модулирует ААРН-индуцированные окислительные повреждения и восстанавливает активность ферментов, участвующих в окислительно-восстановительном гомеостазе. Активность супероксиддисмутазы (*a*) и каталазы (*b*) в эритроцитах. Вкратце, промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в PBS, дополненной ААРН (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE. Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); ###  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с контролем; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с ААРН.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>



**Рис. 7.** Влияние TSCEE на активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах, обработанных ААРН. Вкратце, промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в PBS, дополненной ААРН (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE (a). b – Активность G6PDH и GST. c – Активность GPx. d – Активность GRDx. Значения представлены в виде среднего  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); ###  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с контролем; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  достоверно по сравнению с ААРН.

С цветным вариантом рис. 7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

количество ионов  $\text{Ca}^{2+}$  может привести к возникновению последующих событий эриптоза, например, сморщивание клеток путем активации каналов, чувствительных к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^+$ , с последующей гиперполяризацией мембраны. Выход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает сморщивание клеток из-за потери КСI вместе с водой в результате осмоса. Повышение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  также ассоциируется со скремблингом мембран и ФС, основными признаками эриптоза. Кроме

того, окислительный стресс может привести к активации каспаз, тем самым запуская эриптоз [21].

При некоторых случаях окислительного стресса, ассоциированного с патологическими состояниями, такими как рак, диабет, ХБП и др., наблюдается повышенная гибель эритроцитов в результате эриптоза и последующая тяжелая анемия. Кроме того, было показано, что несколько противоопухолевых препаратов так-

же индуцируют эриптоз [3, 21]. Таким образом, регулирование окислительного стресса может стать ключом к борьбе с анемией при этих клинических заболеваниях. Было показано, что ряд антиоксидантных молекул растительного происхождения обеспечивают защиту от индуцированного окислительным стрессом эриптоза [22]. Лекарственное использование различных частей тамариндового дерева хорошо документировано в традиционной медицине [23]. В настоящем исследовании оценивали защитную эффективность TSCEE против индуцированного окислительным стрессом эриптоза. Хроматограмма экстракта TSCEE, полученная при RP-HPLC анализе, показала присутствие различные биологически активные компоненты таких как флавоноиды, каротиноиды и полифенолы. Более того, данные анализа FTIR указывают на присутствие в растительных компонентах экстракта TSCEE карбонильных, гидроксильных и кетонных групп. Гидроксильные группы могут тушить образовавшиеся во время окислительного стресса свободные радикалы, и это обстоятельство может быть отнесено на счет эффективности защиты экстракта TSCEE. Более того, с помощью циклических вольтамперометрических исследований также была подтверждена антиоксидантная активность экстракта TSCEE.

ААРН запускает окислительный стресс, индуцирующий образование метгемоглобина с пониженной редуцтазной активностью. Превращение гемоглобина в MetHb может отменить способность связывать молекулярный кислород, превращая его в нефункциональный белок. Это может привести к возникновению состояния, называемого метгемоглобинемией [24–26]. Метгемоглобинредуктаза является ключевым ферментом, который превращает MetHb в гемоглобин и восстанавливает его функциональную активность. Возможно, благодаря снижению уровня окислительного стресса и восстановлению активности метгемоглобинредуктазы TSCEE в значительной степени снижает образование MetHb. На основе предыдущих исследований можно предполагать, что окислительный стресс является главным фактором, индуцирующим образования MetHb. Любые такие изменения делают эритроциты более восприимчивыми к старению и гибели клеток. Поврежденные эритроциты удаляются из кровотока в результате особого процесса гибели клеток, который называется эриптозом. Повышение концентрации АФК и последующее проникновение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в эритроциты, в свою очередь, может активировать каспазы и способствовать транслокации ФС на поверхность эритроцитов, тем самым

подготавливая их к эриптотической гибели клеток [21]. Таким образом, способность экстракта TSCEE противостоять эриптозу может быть связана с его врожденным антиоксидантным потенциалом, благодаря которому он может тушить АФК и таким образом снижать уровень окислительного стресса. Более того, TSCEE в значительной степени понижал уровень перекисей липидов и содержание карбонильных групп в белках, которые являются маркерами окислительного стресса. Перекисное окисление липидов является одним из основных индикаторов окислительных повреждений, вызванных АФК. Эритроциты богаты ненасыщенными липидами, и их мембраны более склонны к окислительному повреждению. Известно, что большое количество перекисей липидов вызывает нарушение нормального функционирования клетки, снижение текучести мембран, инактивацию мембраносвязанных рецепторов и ферментов и повышение неспецифической проницаемости ионов, что в итоге приводит к повреждению клетки [27–29]. Кроме того, карбонилирование белков может вызвать изменения структуры и функций клетки [30]. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных групп в белках также в значительной степени снижалось в результате действия TSCEE, это свидетельствовало о том, что TSCEE может ингибировать вызванные воздействием ААРН нарушения в эритроцитах.

Выживание эритроцитов абсолютно зависит от их способности поддерживать клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз. Как ферментативные, так и неферментативные механизмы работают совместно для борьбы с окислительным стрессом. GSH — основной эндогенный антиоксидант, который помогает клеткам избавляться от повышенных уровней АФК [31, 32]. Было обнаружено, что TSCEE восполняет количество глутатиона в эритроцитах, которые были предварительно обработаны индуктором свободных радикалов, ААРН. Кроме того, экстракт TSCEE также способствовал восстановлению активности антиоксидантных ферментов, таких как СОД и КАТ. Кроме того, TSCEE восстановил активность ферментов (GST, GR GPx и G6PDH), участвующих в пополнении GSH. В процессе регенерации GSH молекула НАДФН является одним из ключевых факторов, которые образуются в эритроцитах с помощью фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH) в ходе гексозомонофосфатного пути (HMP shunt pathway) [33]. Поэтому защитная эффективность TSCEE может быть обусловлена ее способностью восстанавливать клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз.

В заключение, можно резюмировать, что TSCEE способен эффективно защищать эритроциты от индуцированных ААРН окислительных повреждений и эриптоза. Это может быть связано с наличием активных фитохимических веществ, таких как алкалоиды, флавоноиды и полифенольные соединения. Благодаря способности тушить свободные радикалы терапевтические средства на основе лекарственных растений могут стать эффективным средством в борьбе с окислительным стрессом и возникающим вследствие его эриптозом и противодействовать анемии при различных патологических состояниях.

**Финансирование.** Работа была выполнена при финансовой поддержке Правительства Индии, Нью Дели и VGST и Правительства Каранатака.

**Благодарности.** Джайанна выражает благодарность UGC-RGNF, Правительству Индии, Нью

Дели за представленную стажировку. DS благодарит проф. К. Кемпарайю, университет Мисора, проф. Гириш К.С., доктора П. Рагхавендра Кумар, Бхагялакшми М., университет Тумкура за их помощь при выполнении данной работы. Авторы также выражают благодарность Маникара М. и Светакумар Б., университет Мисора за их любезную помощь при выполнении работы.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Palis, J. (2014) Primitive and definitive erythropoiesis in mammals, *Front. Physiol.*, **5**, 3, doi: 10.3389/fphys.2014.00003.
- Lang, K.S., Lang, P.A., and Bauer, C. (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death, *Cell. Physiol. Biochem.*, **15**, 195–202.
- Bissinger, R., Modicano, P., Alzoubi, K., Honisch, S., Faggio, C., Abed, M., and Lang, F. (2014) Effect of saponins on erythrocytes, *Int. J. Hematol.*, **100**, 51–59.
- Lang, E., Bissinger, R., Qadri, S.M., and Lang, F. (2017) Suicidal death of erythrocytes in cancer and its chemotherapy: a potential target in the treatment of tumor-associated anaemia, *Int. J. Cancer*, **141**, 1522–1528.
- Lang, F., Lang, K.S., Lang, P.A., Huber, S.M., and Wieder, T. (2006) Mechanisms and significance of eryptosis, *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1183–92.
- Girish, K.S., Paul, M., Thushara, R.M., Hemshekhar, M., Shanmuga, S.M., Rangappa, K.S., and Kemparaju, K. (2013) Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **438**, 198–204.
- Sundaram, M.S., Hemshekhar, M., Santhosh, M.S., Paul, M., Sunitha, K., Thushara, R.M., Naveen Kumar, S.K., Devaraja, S., Rangappa, K.S., Kemparaju, K., and Girish, K.S. (2015) Tamarind Seed (*Tamarindus indica*) Extract ameliorates adjuvant-induced arthritis via regulating the mediators of cartilage/bone degeneration, inflammation and oxidative stress, *Sci. Rep.*, **5**, 11117.
- Kareru, P.G., Keriko, J.M., Gachanja, A.N., and Kenji, G.M. (2008) Direct detection of triterpenoid saponins in medicinal plants, *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **5**, 56–60.
- Arulpriya, P., Lalitha, P., and Hemalatha, S. (2010) Cyclic voltametric assessment of the antioxidant activity of petroleum ether extract of *Samanea saman* (Jacq) Merr, *Adv. Appl. Sci. Res.*, **1**, 24–35.
- Benesch, R.E., Benesch, R., and Yung, S. (1973) Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures, *Anal. Biochem.*, **55**, 245–248.
- Sharma, R.D., Katkar, G.D., Sundaram, M.S., Paul, M., NaveenKumar, S.K., Swethakumar, B., Hemshekhar, M., Girish, K.S., and Kemparaju, K. (2015) Oxidative stress-induced methemoglobinemia is the silent killer during snakebite: a novel and strategic neutralization by melatonin, *J. Pineal Res.*, **59**, 240–254.
- Driver, A.S., Kodavanti, P.R., and Mundy, W.R. (2000) Age related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates, *Neurotoxicol. Teratol.*, **22**, 175–181.
- NaveenKumar, S.K., Thushara, R.M., Sundaram, M.S., Hemshekhar, M., Paul, M., Thirunavukkarasu, C., Basappa, Nagaraju, G., Raghavan, S.C., Girish, K.S., Kemparaju, K., and Rangappa, K.S. (2015) Unconjugated bilirubin exerts pro-apoptotic effect on platelets via p38-MAPK activation, *Sci. Rep.*, **5**, 15045.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351–358.
- Levine, R.L., Garland, D., and Oliver, C.N. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.*, **186**, 464–478.
- Sundaram, M.S., Hemshekhar, M., Thushara, R.M., Santhosh, M.S., Kumar, S.K., Paul, M., Devaraja, S., Kemparaju, K., Rangappa, K.S., and Girish, K.S. (2014) Tamarind seed extract mitigates the liver oxidative stress in arthritic rats, *Food Funct.*, **5**, 587–597.
- Tung, B.T., Hai, N.T., and Thu, D.K. (2017) Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities in vitro of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice, *J. Ethnopharmacol.*, **198**, 24–32.
- Guthenberg, C., Alin, P., and Mannervik, B. (1985) Glutathione transferase from rat testis, *Methods Enzymol.*, **113**, 507–510.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Föller, M., Huber, S.M., and Lang, F. (2008) Erythrocyte programmed cell death, *IUBMB Life*, **60**, 661–668.
- Lang, F., Abed, M., Lang, E., and Föller, M. (2014) Oxidative stress and suicidal erythrocyte death, *Antioxid. Redox Signal*, **21**, 138–153.

22. Jagadisha, S., Hemshekara, M., NaveenKumara, S.K., Sharath Kumar, K.S., Sundaram, M.S., Basappa, Girisha, K.S., and Rangappa, K.S. (2017) Novel oxolane derivative DMTD mitigates high glucose induced erythrocytes apoptosis by regulating oxidative stress, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **334**, 167–179.
23. Bhadoriya, S.S., Ganeshpurkar, A., Narwaria, J., Rai, G., and Jain, A.P. (2011) *Tamarindus indica*: extent of explored potential, *Pharmacogn. Rev.*, **5**, 73–71.
24. Dong, X., Kiss, L., Petrikovics, I., and Thompson, D.E. (2017) Reaction of dimethyl trisulfide with haemoglobin, *Chem. Res. Toxicol.*, **30**, 1661–1663.
25. Ding, Y., Liu, H., Tekwani, B.L., Nanayakkara, N.P.D., Khan, I.A., Walker, L.A., and Doerksen, R.J. (2016) Methemoglobinemia hemotoxicity of some antimalarial 8-aminoquinoline analogues and their hydroxylated derivatives: density functional theory computation of ionization potentials, *Chem. Res. Toxicol.*, **29**, 1132–1141.
26. Puchulu-Campanella, E., Chu, H., Anstee, D.J., Galan, J.A., Tao, W.A., and Low, P.S. (2013) Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane, *J. Biol. Chem.*, **288**, 848–858.
27. Qadri, S.M., Mahmud, H., Föller, M., and Lang, F. (2009) Inhibition of suicidal erythrocyte death by xanthohumol, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 7591–7595.
28. Shaik, N., Lupescu, A., and Lang, F. (2013) Inhibition of suicidal erythrocyte death by probucol, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **61**, 120–126.
29. Zierle, J., Bissinger, R., and Lang, F. (2016) Inhibition by teriflunomide of erythrocyte cell membrane scrambling following energy depletion, oxidative stress and ionomycin, *Cell. Physiol. Biochem.*, **39**, 1877–1890.
30. Sebastin Santhosh, M., Hemshekhar, M., Thushara, R.M., Devaraja, S., Kemparaju, K., and Girish, K.S. (2013) Vipera russelli venom induced oxidative stress and hematological alterations: amelioration by crocin a dietary colorant, *Cell. Biochem. Funct.*, **31**, 41–50.
31. Vitak, T.Y., Wasser, S.P., Nevo, E., and Sybirna, N.O. (2017) Enzymatic system of antioxidant protection of erythrocytes in diabetic rats treated with medicinal mushrooms *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), *Int. J. Med. Mushrooms*, **19**, 697–708.
32. Jha, R., and Rizvi, S.I. (2011) Carbonyl formation in erythrocyte membrane proteins during aging in humans, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.*, **155**, 39–42.
33. Vishalakshi, G.J., Hemshekhar, M., Kemparaju, K., and Girish, K.S. (2018) Para-tertiary butyl catechol induces eryptosis *in vitro* via oxidative stress and hemoglobin leakage in human erythrocytes, *Toxicol. In Vitro*, **52**, 286–296.

## PROTECTIVE EFFICACY OF TAMARIND SEED COAT ETHANOLIC EXTRACT ON OXIDATIVE STRESS INDUCED ERYPTOSIS

**J. Kengaiah<sup>1</sup>, S. K. M. Nandish<sup>1</sup>, Ch. Ramachandraiah<sup>1</sup>, Chandramma<sup>1</sup>, A. Shivaiah<sup>1</sup>, G. J. Vishalakshi<sup>2</sup>, M. Paul<sup>2</sup>, S. M. Santhosh<sup>3</sup>, R. L. Shankar<sup>4</sup>, and D. Sannanigaiah<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Department of Studies and Research in Biochemistry and Centre for Bioscience and Innovation, Tumkur University, 572103 Tumkur, India

<sup>2</sup> Department of Studies in Biochemistry, University of Mysore, Manasagangothry, 570006 Mysore, India

<sup>3</sup> Department of Medical Biochemistry and Microbiology (IMBM), Uppsala Biomedical Centre, 75237 Uppsala, Sweden

<sup>4</sup> Department of Sericulture, Yuvaraja's College, University of Mysore, 570006 Mysore, India; E-mail: sdevbiochem@gmail.com

Received April 1, 2019

Revised October 4, 2019

Accepted October 17, 2019

Suicidal erythrocyte death or eryptosis is the key event in eliciting anaemia in multitude of pathological conditions including diabetes, chronic kidney diseases, cancer, sepsis, etc. Oxidative stress is an important trigger in accelerating erythrocyte loss by eryptosis and has been shown to be the underlying mechanism for anaemic conditions in above said pathologies. Thus, the identification of antioxidant and anti-eryptotic agents for management of the oxidative stress-related ailments is in increasing demand today. The current work demonstrates antioxidant and anti-eryptotic assets of tamarind seed coat ethanol extract (TSCEE) against AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride)-induced oxidative stress and eryptosis. The presence of probable secondary metabolites in the TSCEE extract was investigated by RP-HPLC column chromatography. The active groups present in the TSCEE were studied using the Fourier-transform infrared spectroscopy. Cyclic voltammetric studies confirmed the antioxidant potential of TSCEE. Further, the red blood cells protection property of TSCEE was confirmed by assessing various eryptotic markers such as reactive oxygen species, cellular calcium level, and phosphatidyl serine exposure. In addition, TSCEE reduced lipid peroxidation and protein carbonyl content, restored cellular glutathione level, antioxidant enzymes and enzymes involved in glutathione replenishment. Thus, TSCEE may be a promising therapeutic agent for curing oxidative stress-induced eryptosis and subsequent anaemia in various pathologies.

**Keywords:** tamarind seed coat ethanol extract (TSCEE), reactive oxygen species (ROS), eryptosis, GSH/GSSG, G6PDH, antioxidant, AAPH