

УДК 577.112:612

**ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ,
МЕТГЕМОГЛОБИНООБРАЗОВАНИЯ И ГЕНЕРИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ
ФОРМ КИСЛОРОДА В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ**

Ёлкина Н.М.

*Крымский факультет Запорожского национального университета, Симферополь, Украина
E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

Установлено, что в эритроцитах больных эритремией интенсификация процессов пероксидации липидов и метгемоглибинообразования сопровождается усилением генерирования супероксиданиона и гидроксил-радикала.

Вместе с этим, наблюдается некоторое снижение содержания в эритроцитах нитрат-анионов и существенное увеличение активности индуцибельной NO-синтазы.

Ключевые слова: эритроциты, супероксиданион, гидроксил-радикал, пероксидация липидов, метгемоглибинообразование, метаболизм оксида азота, эритремия.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биохимических особенностей организма человека при различных заболеваниях является одной из задач современной биологии и медицины [1-3]. Известно, что при многих заболеваниях нарушается прооксидантно-антиоксидантное равновесие, активизируются свободно-радикальные реакции, развивается окислительный стресс [4-8]. В патологический процесс могут вовлекаться эритроциты [9, 10]. Поэтому представляется важным понять, как происходит генерирование активных форм кислорода (АФК) и окисление различных органических соединений в эритроцитах в условиях патологии, в частности, при гематологических заболеваниях онкологического характера.

В связи с этим, целью настоящей работы было изучение процессов генерирования АФК, а также перекисного окисления липидов (ПОЛ) и метгемоглибинообразования в эритроцитах при эритремии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (25 доноров станции переливания крови г. Симферополя) и больных эритремией I степени (9 человек, средний возраст 59,0 лет). В каждой обследованной группе соотношение мужчин и женщин было приблизительно одинаковым. Кровь больных брали на базе Крымского онкологического центра при поступлении в стационар перед началом лечения.

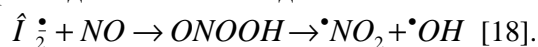
Эритроциты гемолизировали в дистиллированной воде, взяв за основу метод Драбкина [11]. В гемолизатах эритроцитов определяли содержание метгемоглобина [12], первичных продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты) [13] и вторичных продуктов ПОЛ (ТБК-активные продукты) [14], а также скорость генерирования супероксиданиона ($\hat{I}_{\frac{1}{2}}^{\bullet}$) и \bullet ОН-радикала [15], процентное содержание нитрат-анионов (NO_3^-) и активность индуцибельной синтазы оксида азота (i NOS) [16, 17]. Использовали спектрофотометрические методы биохимического анализа. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, в эритроцитах больных эритремией существенно усиливаются реакции перекисидации липидов, о чем свидетельствует увеличение содержания диеновых конъюгатов (в 3,3 раза) и ТБК-активных продуктов (в 2,0 раза) по сравнению с контрольной группой доноров (таблица 1).

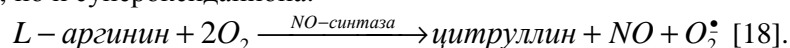
Имеются данные о том, что перекисное окисление липидов, связанное с образованием первичных и, в дальнейшем, вторичных продуктов ПОЛ, в основном, обусловлено действием \bullet ОН-радикала и супероксиданиона [18].

Было выявлено, что в эритроцитах больных эритремией скорость генерирования супероксиданиона возрастает в 2,6 раза по сравнению с контрольной группой, а скорость генерирования \bullet ОН-радикала увеличивается в 6,2 раза (таблица 2). Согласно современным представлениям, основная роль в инициации реакций ПОЛ отводится \bullet ОН-радикалу, генерирование которого может осуществляться разными путями, в частности, через образование пероксинитрита в реакции между супероксиданионом и оксидом азота:



Существенный вклад этого пути в генерирование \bullet ОН-радикала в эритроцитах при эритремии подтверждается некоторым снижением уровня NO_3^- -анионов (на 22%) и достоверным увеличением активности индуцибельной NO-синтазы (в 2,0 раза) по сравнению с контрольной группой (таблица 3).

Необходимо отметить, что NO-синтазная реакция является источником не только NO, но и супероксиданиона:



Пути утилизации $\hat{I}_{\frac{1}{2}}^{\bullet}$ также разнообразны и связаны с образованием как свободных радикалов (\bullet ОН, \bullet NO₂), так и стабильных метаболитов NO, например, нитрат-анионов, способных энзиматическим путем превращаться в оксид азота [18].

Из этого следует, что реакции, ведущие к образованию оксида азота, его метаболитов и \bullet ОН-радикала, имеют циклический характер и тесно сопряжены между собой в общем пуле метаболических процессов.

Самостоятельный интерес представляет генерирование супероксиданиона, возрастающее в эритроцитах при эритремии. Вполне вероятно, что NO-синтазная

реакция генерирует только определенную часть $\hat{I} \frac{\bullet}{2}$, поскольку не является в эритроцитах единственным источником супероксиданиона. Большую роль в образовании $\hat{I} \frac{\bullet}{2}$ играет также окисление гемоглобина с его переходом в метформу:

Таблица 1
Содержание диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов ПОЛ в эритроцитах больных эритремией (процентная доля от показателя контрольной группы*); $M \pm m$

Обследованные группы	Диеновые конъюгаты	ТБК-активные продукты
Контрольная группа	100 ± 17,0	100 ± 11,8
Больные эритремией	333,0 ± 55,0**	201,6 ± 17,6**

* – контроль – 100%;

** – достоверность различия показателя по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 2
Скорость генерирования супероксиданиона и \bullet ОН-радикала, содержание нитрат-анионов (NO_3^-) в эритроцитах больных эритремией (процентная доля относительно показателя контрольной группы*); $M \pm m$

Обследованные группы	Скорость генерирования $\hat{I} \frac{\bullet}{2}$	Скорость генерирования \bullet ОН-радикала	NO_3^-
Контрольная группа	100 ± 17,0	100 ± 16,0	100 ± 16,0
Больные эритремией	264,5 ± 39,0**	622 ± 65,0**	78,0 ± 10,0

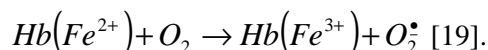
* – контроль – 100%;

** – достоверность различия показателя по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 3
Активность индуцибельной синтазы оксида азота (i NOS) и содержание метгемоглобина (MtHb) в эритроцитах больных эритремией ($M \pm m$)

Обследованные группы	Активность i NOS, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$	Содержание MtHb, %
Контрольная группа	2,1 ± 0,34	2,5 ± 0,30
Больные эритремией	4,2 ± 0,59*	11,18 ± 0,75*

* – достоверность различия показателя по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).



Как показали исследования, у больных эритремией прослеживается выраженное метгемоглибинообразование: содержание метгемоглобина в эритроцитах возрастает в 4,47 раза по сравнению с контрольной группой (таблица 3).

Тот факт, что в наших исследованиях отмечается более выраженное генерирование \bullet ОН-радикала по сравнению с супероксиданионом, позволяет предположить возможность активизации в эритроцитах больных эритремией утилизации супероксиданиона по пути генерирования \bullet ОН-радикала (вышеупомянутая реакция через образование пероксинитрита, реакции Хабер-Вайса и Фентона: $2O_2^{\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$; $O_2^{\bullet} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$; $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + OH^- + Fe^{3+}$) [18].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительной интенсификации генерирования \bullet ОН-радикала и супероксиданиона, а также метгемоглибинообразования в эритроцитах при эритремии, что создает условия для усиления прооксидантного статуса эритроцитов и окислительного преобразования не только липидов, но и других функционально-значимых органических компонентов, прежде всего, эритроцитарных ферментов и гемоглобина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В эритроцитах больных эритремией интенсифицируются реакции пероксидации липидов и метгемоглибинообразование.
2. При эритремии в эритроцитах существенно возрастает генерирование супероксиданиона и гидроксил-радикала. Прослеживается более активное генерирование \bullet ОН-радикала.
3. Усиление генерирования \bullet ОН-радикала и супероксиданиона в эритроцитах больных может быть обусловлено как активизацией утилизации оксида азота и его стабильных метаболитов, так и метгемоглибинообразованием.

Список литературы

1. Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньщиков, Н.К. Зенков // Успехи совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-169.
2. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии / Ю.А. Владимиров // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 1. – С. 5-7.
3. Kaur K. Lipid peroxidation and the level of antioxidant enzymes in coronary artery disease / K. Kaur // Indian J. of Clin. Biochem. – 2008. – V. 23, № 1. – P. 33-37.
4. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5-18.
5. Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщиков. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
6. Муравлёва Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлёва, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев // Фундаментальные исследования. – 2010, № 1. – С. 74-78.
7. Сато Э. Окислительный стресс вызывает регресс гемопоэза печени плода / Э. Сато, Э. Накагава, К. Хирамото, С. Ямамацу // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 1. – С. 25-29.

8. Ranjan R. Oxidative stress in erythrocytes, liver and kidneys of X-ray exposed rabbits / R. Ranjan // Res. report Florida. – 2009. – V. 42, № 2. – P. 88-93.
9. Ёлкина Н.М. Энзиматическая активность эритроцитов человека при ишемической болезни сердца в условиях развития окислительного стресса / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко, И. Шашуа // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – Серия: Биология, химия. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 124-128.
10. Новицкий В.В. Белковый спектр мембран эритроцитов у больных раком легкого и с опухолями головы и шеи / В.В. Новицкий, В.Е. Гольберг, М.В. Колосова // Бюл. эксперим. биол. и медиц. – 1999. – Прил. 1. – С. 18-20.
11. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1949. – V. 21. – P. 224-226.
12. Кушаковский М.С. Метгемоглобинемии / М.С. Кушаковский // Справочник по функциональной диагностике. – М.: Медицина, 1970. – С. 423-427.
13. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лаб. дело. – 1988, № 2. – С. 60-64.
14. Мещишен І.Ф. Метод визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові / І.Ф. Мещишен, В.П. Пишак, В.П. Польовий // Буковинський медичний вісник. – 2007. – Т. 11, № 3. – С. 165-167.
15. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals / H.S. Basaga // Cell. Biol. – 1990. – V. 68, № 5. – P. 989-998.
16. Jsukahara H. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats / H. Jsukahara // Amer. J. Physiol. – 1996. – V. 270, № 5. – P. 840-845.
17. Chin S.Y. Increased activity and expression of Ca²⁺-depended NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / S.Y. Chin, K.N. Pandey, S.J. Shi // Amer. J. Physiol. – 1999. – V. 277, N 5. – P. 797-804.
18. Ткаченко М.М. Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження / М.М. Ткаченко, В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк, А.В. Коцюруба, Г.М. Поперека, Л.Г. Степаненко, О.Ф. Сенюк // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 32-41.
19. Дубинина Е.Е. Активность супероксиддисмутазы и содержание метгемоглобина в эритроцитах человека и животных / Е.Е. Дубинина, Л.А. Данилова, Л.Ф. Ефимова, А.П. Соловьев, А.М. Бейн // Журн. эволюционной биохим. и физиол. – 1988. – Т. 24, вып. 4. – С. 552-568.

Йолкина Н.М. Процеси пероксидації ліпідів, метгемоглобіноутворення та генерування активних форм кисню в еритроцитах хворих на еритремію / Н.М. Ёлкина // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 39-45

Установлено, що в еритроцитах хворих на еритремію інтенсифікація процесів пероксидації ліпідів і метгемоглобіноутворення супроводжується посиленням генеруванням супероксиданіону та гідроксил-радикалу.

Разом із тим, спостерігається деяке зниження вмісту в еритроцитах нітрат-аніонів та суттєве підвищення активності індукцибельної NO-синтази.

Ключові слова: еритроцити, супероксиданіон, гідроксил-радикал, пероксидація ліпідів, метгемоглобіноутворення, метаболізм оксиду азоту, еритремія.

**PROCESSES OF LIPIDS PEROXIDE AND METHHEMOGLOBIN FORMATION
AND GENERATION OF OXYGEN ACTIVE FORMS IN ERYTHROCYTES OF
PATIENTS WITH ERYTHRAEMIA**

Yolkina N.M.

*Crimea faculty of Zaporozhie National University, Simferopol, Ukraine
E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

Elucidation of the molecular basis of various diseases and pathological states of human organism is one of the most significant problems of medicine and biology [1-3]. It is known, that under many pathologies prooxidative-antioxidative balance is disturbed, free-radical reaction are activated and oxidative stress is development [4-8]. Given that in some diseases erythrocytes are involved in pathological process [9, 10], the aim of the present work was to study the indexes of lipids peroxide and methhemoglobin formation and generation of oxygen active forms in erythrocytes of patients with erythraemia. The materials for the study were the erythrocytes of healthy subjects (control group) and patients with erythraemia I degree (9 patients, middle age – 60 years). The blood of patients was taken in Crimea Cancer Centre before treatment for an illness. The erythrocytes were hemolysed by distilled water. In hemolysates of erythrocytes was determined the content of primary (dien conjugates) [11] and secondary (TBA-active) products of lipids peroxides [12], methhemoglobin [13] and rate of generation of superoxideanion and hydroxyl-radicals [14], percentage content of nitrate-anion [15] and activity of inducible – NO-synthase (iNOS) [15, 16]. It has been shown, that in erythrocytes of patients with erythraemia the reactions of lipids peroxidation are intensified essentially. The content of dien conjugates was risen (233% higher as compared with control group). The content of TBA-products was risen also (100% higher as compared with control group). At present time it is known that the main significance for initiation of lipids peroxide reactions have hydroxyl-radicals [17]. One from ways of hydroxyl-radicals formation is reaction of superoxideanion with nitric oxide [17]. It is confirmed by some lowering of the content of nitrate-anions (22% less as compared with control group) and significant rising of the activity of inducible NO-synthase (100% higher as compared with control group). It is known, that NO-synthase reaction produced not only NO, but superoxideanion also. Great importance for generation of superoxideanion is attached with formation of methhemoglobin [18]. It has been shown, that in erythrocytes of patients with erythraemia the content of methhemoglobin is risen (347% higher as compared with control group). So far as the content of $\cdot\text{OH}$ -radicals is far more than the content of superoxideanion, it may be assumed that in erythrocytes of patients significant part of superoxideanion is utilized in the way of generation of hydroxyl-radicals.

Thus, under erythraemia the development of oxidative stress creates conditions for intensification of prooxidative state of erythrocytes and oxidative modification not only lipids, but others organic components.

Keywords: erythrocytes, superoxideanion, hydroxyl-radicals, lipids peroxidation, methhemoglobin formation, metabolism of nitric oxide, erythraemia.

References

1. Menshikov E.B., Zenkov N.K., Oxidative stress under inflammation, *Impr. mod. biol.*, **117**, **2**, 155 (1997).
2. Vladimirov U.A., Active forms of oxygen and nitric: importance for diagnostic, prophylactic and therapeutics, *Biochemistry.*, **69**, **1**, 5 (2004).
3. Kaur K., Lipid peroxidation and the level of antioxidant enzymes in coronary artery disease, *Indian J. Clin. Biochem.*, **23**, **1**, 33 (2008).
4. Dubinina E.E., Pustigina A.V., Oxidative modification of proteins, its importance in pathological states, *Ukr. biochem. J.*, **80**, **6**, 5 (2008).
5. Menshikov E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Oxidative stress: pathological states and diseases, 284 p. (ARTA, Novosibirsk, 2008).
6. Muravljova L.E. Oxidative modification of proteins: the problems and perspectives of investigation, *Fund. Investig.*, **1**, 74 (2010).
7. Sato E., Nakagawa E., Chiramoto K., Jamamazu C., Oxidative stress causes regress of homopoiesis of liver and embryon, *Biochemistry*, **69**, **1**, 25 (2004).
8. Ranjan R. Oxidative stress in erythrocytes, liver and kidneys of X-ray exposed rabbits, *Res. report Florida*, **42**, **2**, 88 (2009).
9. Yolkina N.M., Konoshenko S.V., Shashua I., Enzym activity of human erythrocytes under ischemic heart disease, *Scientific Notes Taurida National V.I. Vernadsky University*, **24** (**63**), **2**, 124 (2011).
10. Novitski V.V., Goldberg V.E., Kolosova M.V., Protein spector of erythrocyte membranes of patients with lung cancer and tumours of head and neck, *Bul. experim. biol. and med.*, **suppl. 1**, 18 (1999).
11. Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., Chmara N.F., Measuring of dien conjugates in blood plasma by UV-absorption of heptane and isopropanol extracts, *Lab. affair.*, **2**, 60 (1988).
12. Mecshishen I.F., Pishak V.P., Poljovij V.P., Method for definition of total blood plasma antioxigative activity, *Bukovina medic. herald*, **11**, **3**, 165 (2007).
13. Kushakovski M.S. Methemoglobinemias, 423 p. (Medicine, Moscow, 1970).
14. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals, *Cell. Biol.*, **68**, **5**, 989 (1990).
15. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J., Analysis of nitrate, nitrite and [N⁺⁵]-nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, **126**, **1**, 131 (1982).
16. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J., Increased activity and expression of Ca²⁺ – depended NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats, *Amer. J. Physiol.*, **277**, **5**, 797 (1999).
17. Tkachenko M.N., Sagach V.F., Baziljuk O.V., Kotsuruba A.V., Popereka G.M., Stepanenko L.G., Senjuk O.F., Age-related peculiarities of contractive vascular reactions and the content of the free radicals of oxygen and metabolites of nitric oxide in BALB/c mice in conditions of alienation zone, *Physiol. J.*, **51**, **3**, 32 (2005).
18. Dubinina E.E. Danilova L.A., Efimova L.F., Solovijov A.P., Bein A.M., Activity of superoxidisedismutase and content of methemoglobin in erythrocytes of human and animals, *J. of Evolution Biochem. and Physiol.*, **24**, **4**, 552 (1988).

Поступила в редакцию 21.11.2013 г.