

УДК 577.121:963

ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ И ГЕНЕРИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Елкина Н. М., Коношенко С. В.

*Таврическая академия Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского,
Симферополь, Россия
E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

Показано, что в эритроцитах больных дилатационной кардиомиопатией интенсифицируются реакции пероксидации липидов и существенно возрастает генерирование $\bullet\text{OH}$ -радикала и супероксиданиона. Предполагается, что одной из причин усиления прооксидантного статуса эритроцитов в условиях данной патологии является активизация реакций, связанных с метаболизмом оксида азота.

Ключевые слова: эритроциты, пероксидация липидов, активные формы кислорода, оксид азота, дилатационная кардиомиопатия.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биохимического состояния отдельных систем организма человека при различных заболеваниях является одной из важнейших задач современной медицины и биологии. В настоящее время имеется достаточно много работ, свидетельствующих о том, что при многих заболеваниях нарушается прооксидантно-антиоксидантное равновесие, активизируются свободно-радикальные реакции, идущие с участием активных форм кислорода (АФК), развивается окислительный стресс [1–3]. Вместе с этим в ряде работ сообщается о том, что при некоторых заболеваниях в патологический процесс вовлекаются эритроциты, изменяются их биохимические показатели [4–6].

Учитывая это, представляется важным понять, как происходит генерирование АФК и окислительное преобразование различных органических соединений в эритроцитах в условиях патологии, в частности, при сердечно-сосудистых заболеваниях.

В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение процессов генерирования АФК, а также перекисного окисления липидов в эритроцитах при кардиомиопатии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (25 доноров станции переливания крови г. Симферополя в возрасте от 45 до 55 лет) и больных дилатационной кардиомиопатией (15 человек, средний возраст –

53 года). В каждой обследованной группе соотношение мужчин и женщин было приблизительно одинаковым. Кровь больных брали на базе Крымского кардиологического центра г. Симферополя при их поступлении в стационар, перед началом лечения, придерживаясь норм и принципов биоэтики.

Гемолиз эритроцитов осуществляли в равном объеме дистиллированной воды по методу Драбкина [7]. В гемолизатах эритроцитов определяли содержание общих липидов [8], первичных продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты) [9] и вторичных продуктов ПОЛ (ТБК-активные продукты) [10], а также скорость генерирования супероксиданиона и $\bullet\text{OH}$ -радикала [11], содержание нитрит- и нитрат-анионов (NO_2^- , NO_3^-) [12] и активность индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [13]. Во всех опытах использовались спектрофотометрические методы биохимического анализа.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

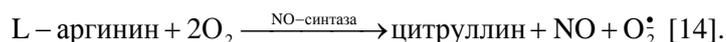
Как показали результаты исследований, в эритроцитах больных дилатационной кардиомиопатией существенно усиливаются реакции пероксидации липидов, о чем свидетельствует снижение содержания в гемолизатах общих липидов (на 27,4 %) и увеличение содержания диеновых конъюгатов (в 2,5 раза) и ТБК-активных продуктов ПОЛ (на 25 %) по сравнению с контрольной группой (таблица 1). Согласно современным представлениям, перекисное окисление липидов, связанное с образованием первичных и, в дальнейшем, вторичных продуктов ПОЛ, в основном обусловлено действием супероксиданиона и $\bullet\text{OH}$ -радикала [14].

При изучении скорости генерирования супероксиданиона и $\bullet\text{OH}$ -радикала в эритроцитах больных кардиомиопатией было выявлено, что данные показатели образования соответствующих АФК возрастают по сравнению с контрольной группой: в 1,5 раза (супероксиданион) и в 2,8 раза ($\bullet\text{OH}$ -радикал) соответственно (таблица 2). Ключевая роль в инициации реакций ПОЛ отводится $\bullet\text{OH}$ -радикалу, генерирование которого осуществляется разными путями, в частности, через образование пероксинитрита в реакции между супероксиданионом и оксидом азота: $\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONO}_2^- \rightarrow \bullet\text{NO}_2 + \bullet\text{OH}$ [15].

Возможность существенного вклада этого пути в генерирование $\bullet\text{OH}$ -радикала в эритроцитах больных кардиомиопатией подтверждается достоверным и выраженным снижением в гемолизатах уровня NO_3^- -анионов (в 2,0 раза) и некоторым снижением содержания NO_2^- -анионов (на 24,6 %) по сравнению с контрольной группой (таблица 3), способных энзиматическим путем превращаться в оксид азота [16].

Наряду с этим у больных кардиомиопатией наблюдается некоторое увеличение активности индуцибельной NO-синтазы: на 33,0% по сравнению с контрольной группой (таблица 3).

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



В свою очередь, утилизация супероксиданиона может привести к образованию как новых свободных радикалов, так и стабильных метаболитов NO, которые могут, что уже отмечалось ранее, превращаться в оксид азота [16].

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

Таблица 1

Содержание общих липидов, диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов в гемолизатах эритроцитов больных дилатационной кардиомиопатией (M±m)

Обследованные группы	Общие липиды, мг/мл	Диеновые конъюгаты, нмоль · мгHb ⁻¹	ТБК-активные продукты, нмоль · мгHb ⁻¹
Контрольная группа	5,03 ± 0,19	13,80 ± 0,85	31,75 ± 1,60
Больные кардиомиопатией	3,65 ± 0,15*	34,82 ± 2,10*	39,68 ± 2,75*

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

Таблица 2

Скорость генерирования супероксиданиона и гидроксил-радикала в гемолизатах эритроцитов больных дилатационной кардиомиопатией (M±m)

Обследованные группы	Скорость генерирования супероксиданиона, усл. ед. мин ⁻¹ · мгHb ⁻¹	Скорость генерирования гидроксил-радикала, усл. ед. мин ⁻¹ · мгHb ⁻¹
Контрольная группа	2,90 ± 0,15	16,50 ± 0,84
Больные кардиомиопатией	4,35 ± 0,21*	45,40 ± 2,70*

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

Таблица 3

Активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и содержание нитрит-анионов (NO₂⁻) и нитрат-анионов (NO₃⁻) в гемолизатах эритроцитов больных дилатационной кардиомиопатией (M±m)

Обследованные группы	Активность iNOS, пмоль · мин ⁻¹ · мгHb ⁻¹	Содержание NO ₂ ⁻ , пмоль · мгHb ⁻¹	Содержание NO ₃ ⁻ , нмоль · мгHb ⁻¹
Контрольная группа	2,10 ± 0,24	18,3 ± 2,9	1,42 ± 0,20
Больные кардиомиопатией	2,80 ± 0,30*	13,8 ± 1,9*	0,72 ± 0,08*

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

Поскольку в наших исследованиях отмечается более выраженное генерирование $\bullet\text{OH}$ -радикала по сравнению с супероксиданионом, можно предположить возможность активизации в эритроцитах больных кардиомиопатией утилизации супероксиданиона по пути генерирования $\bullet\text{OH}$ -радикала (вышеупомянутая реакция через образование пероксинитрита, а также реакции Хабера-Вайса и Фентона: $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$; $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$; $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$) [15].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенной интенсификации генерирования супероксиданиона и $\bullet\text{OH}$ -радикала в эритроцитах при дилатационной кардиомиопатии, что создает условия для усиления прооксидантного статуса эритроцитов и, в связи с этим, активизации структурного преобразования под действием АФК не только липидов, но и других органических соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В эритроцитах больных дилатационной кардиомиопатией интенсифицируются реакции пероксидации липидов. Показано преобладание количественного содержания первичных продуктов ПОЛ по сравнению со вторичными продуктами.
2. При дилатационной кардиомиопатии в эритроцитах существенно возрастает генерирование супероксиданиона и гидроксил-радикала. Отмечено более активное генерирование $\bullet\text{OH}$ -радикала.
3. Усиленное генерирование $\bullet\text{OH}$ -радикала и супероксиданиона в эритроцитах при дилатационной кардиомиопатии может быть обусловлено изменениями в метаболизме оксида азота, в частности, в реакциях синтеза NO и использования его стабильных метаболитов.

Список литературы

1. Азизова О.А. Взаимосвязь маркеров окислительного стресса с клиническим течением хронической ишемии мозга / О.А. Азизова // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013, № 9. – С. 21–27.
2. Курашова Н.А. Особенности окислительного стресса при различных патологических состояниях у мужчин репродуктивного возраста / Н.А. Курашова // Бюлл. Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2012, № 2 (2). – С. 31–35.
3. Луцкий М.А. Формирование окислительного стресса как одного из звеньев сложного патогенеза социально-значимых заболеваний нервной системы – инсульта и рассеянного склероза / М.А. Луцкий, А.М. Земсков, М.А. Смелянец и др. // Фундаментальные исследования. – 2014, № 10. – С. 27–32.
4. Елкина Н.М. Процессы пероксидации липидов, метгемоглобинообразования и генерирования активных форм кислорода в эритроцитах больных эритремией / Н.М. Елкина // Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского. – Сер.: Биология, химия. – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 39–43.
5. Коношенко С.В. Особливості окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах хворих на кардіоміопатію, ішемічну хворобу серця, еритремію та апластичну анемію / С.В. Коношенко, Н.М. Йолкіна // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2013, № 2. – С. 40–43.

6. Novgorodtseva T.P. Modifications of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases / T.P. Novgorodtseva, Y.K. Denisenko, N.N. Zhukova et al. // *Lipids Health Dis.* – 2013, N 12. – P. 117–121.
7. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // *Arch. biochem.* – 1959. – V. 21. – P. 224–226.
8. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. Покровского А.А. М.: Медицина. – 1969. – С. 287–288.
9. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.П. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // *Лаб. дело.* – 1988, № 2. – С. 60–64.
10. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yogi // *Analit. Biochem.* – 1979. – N 2. – P. 351–358.
11. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals / H.S. Basaga // *Cell. Biol.* – 1990. – V. 68, N 5. – P. 989–998.
12. Green L.L. Analysis of nitrate, nitrite and [+5N] nitrate in biological fluids / L.L. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski et al // *Anal. Biochem.* – 1982. – V. 126, N 1. – P. 131–138.
13. Jsukahara H. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats / H. Jsukahara // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – V. 270, N 5. – P. 840–845.
14. 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. Базилюк и др. // *Фізіол. журн.* – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 32–41.
15. Beckman J.S. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide / J.S. Beckman, J.W. Beckman, J. Chen et al // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V. 87, N 7. – P. 1620–1624.
16. Раваева М.Ю. Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения / М.Ю. Раваева, Е.Н. Чуян // *Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского.* – Сер.: Биология, химия. – 2011. – Т. 24 (63), № 4. – С. 201–210.

PROCESSES OF LIPIDS PEROXIDATION AND OXYGEN ACTIVE GENERATION IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY

Yolkina N.M., Konoshenko S.V.

*V.I. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

According to modern understanding the main pathogenetic factor of many diseases and pathological states involving the violation of the structural and functional characteristics of bioorganic ingredients is the activation of free radical reactions. Active changes of this processes lead to the disruption of cell functions and, as a result, to development of pathology [1-3].

Previously, it has been found that in some diseases characterized by the development of oxidative stress, in pathological process involves erythrocytes, as demonstrated by biochemical changes occurring in them [4, 5]. In this regard, it is of interest to examine the state of lipids peroxidation (LPO) and processes of oxygen active forms generation in erythrocytes of patients with pathology of cardiovascular system.

The aim of this work was to study the processes of LPO and oxygen active forms generation in erythrocytes of patients with dilated cardiomyopathy.

The materials for the study were the erythrocytes of healthy subject (control group) and patients with dilated cardiomyopathy (15 persons, middle age 53 years). The blood of healthy subject was taken at the blood transfusion centre of Simferopol, the sick person's blood – at the Crimean Cardiology Centre in Simferopol before treatment for an illness.

The erythrocytes were hemolysated by distilled water. In hemolysates of erythrocytes was determined the content of total lipids, primary and secondary products of LPO [6, 7], the generation of hydroxyl-radical and superoxide-anion radical [8], the content nitrite and nitrate-anions [9] and activity of iNOS [10].

All indexes were studied by spectrophotometric methods of biochemical analyses.

It has been shown, that in hemolysates of erythrocytes of patients with cardiomyopathy the content of total lipids was lowered and the content of primary and secondary products of LPO was risen (2,5 times and 25,0% as compared with control group). At the same time the speed of generation of hydroxyl-radical and superoxide-anion was risen at 2,8 and 1,5 times, accordingly. The activity of iNOS was more as compare to control group (at 33,0%), the level of nitrite and nitrate-anions was lowered (at 24,6% and 2,0 times as compared with control group, accordingly).

Thus, under dilated cardiomyopathy in erythrocytes the reactions of LPO and generation of oxygen active forms are intensified. that may be connected with changes of NO-metabolism, for example, of NO-synthesis and utilization of it stable metabolites.

Keywords: erythrocytes, lipids peroxidation, oxygen active forms, nitric oxide, dilated cardiomyopathy.

References

1. Azizova O.A., Interaction of markers of oxidative stress with clinic of chronic brain ischemia, J. Neurology and psychiatry, **9**, 21 (2013).
2. Kurashova N.A., Peculiarities of oxidative stress under different state of man in reproduction age, Bull. east-siberian scientific centre, **2** (2), 31 (2012).
3. Lutskij M.A., Zemskov A.M., Smeljanets M.A. et al, The formation of oxidative stress as one from links of hard pathogeny of social diseases of central nerval system, Fundamental investigations, **10**, 27 (2014).
4. Konoshenko S.V., Yolkina N.M., Peculiarities of proteins oxidative modification in erythrocytes of patients with cardiomyopathies, ischemic heart diseases, erythraemia and aplastic anemia, Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry, **2**, 40 (2013).
5. Novgorodtseva T.P., Denisenko Y.K., Zhukova N.N. et al, Modifications of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases, Lipids Health Dis., **12**, 117 (2013).
6. Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., Hmara N.F., Analysis of dien conjugates in plasma of UF-absorption of heptane and isopropanol extracts, Lab. assay, **2**, 60 (1988).
7. Ohkawa H., Ohishi N., Yogi K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Analit. Biochem., **2**, 351 (1979).
8. Basaga H.S., Biochemical aspects of free radicals, Cell. Biol., **68**, **5**, 989 (1990).
9. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. et al, Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids, Anal. Biochem., **126**, **1**, 131 (1982).
10. Jsukahara H., Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats, Amer. J. Physiol., **270**, **5**, 840 (1996).

Поступила в редакцию 29.10.2015 г.