

УДК 616.153.915-039+612.014.464:612.111.11/.13

В. Н. КОРНЕЙЧИК, М. В. БОРИСЮК, В. В. ЗИНЧУК

**ЗАВИСИМОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ
И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ
В ЭРИТРОЦИТАХ ОТ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ**

При консервации цельной крови наблюдается повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и истощение антиоксидантного потенциала. Хранение эритроцитов *in vitro* сопровождается их гемолизом, повышением уровня малонового диальдегида и деградацией оксигемоглобина в дезоксиформу и метгемоглобин [1]. Феномены постперфузионного синдрома и «кислородного эффекта» демонстрируют сложный характер кислородзависимой природы ПОЛ [2]. Традиционные представления об организации антиоксидантной защиты предполагают, что ее факторы «не предотвращают зло, а лишь борются с ее последствиями», вследствие чего «снижение внутриклеточной концентрации кислорода могло бы стать более кардинальным решением проблемы кислородной токсичности» [3]. Известно, что сродство гемоглобина к кислороду (СГК) влияет на активность свободнорадикальных процессов [4]. В связи с этим представляет определенный интерес изучение активности процессов ПОЛ и факторов антиоксидантной защиты (АЗ) в эритроцитах в условиях целенаправленного повышения цианатом натрия СГК в опытах *in vitro*.

Материалы и методы исследования. В эксперименте использовали образцы эритроцитарной массы (100% по объему) от 48 крыс-самцов массой 200—220 г. Исследуемые пробы крови, взятые из правого отдела сердца животного в условиях быстрого эфирного наркоза, повторно отмывали с последующим серийным центрифугированием в изотоническом растворе хлорида натрия (NaCl). К полученной эритроцитарной массе добавляли 0,9%-ный раствор NaCl (контрольная группа, $n = 19$), либо раствор цианата натрия (NaOCN, Донецкий химзавод) в концентрации 2,5 ($n = 10$) и 5% ($n = 19$) в объеме 0,1 мл раствора на 3 мл отмывтых эритроцитов (опытная группа). Контрольные и опытные эритроциты затем инкубировались при $T = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 12 ч для проведения необратимой реакции карбамилзации гемоглобина [5]. После чего в проинкубированных образцах исследовали СГК и определяли концентрацию гемоглобина гемоглобинцианидным методом. Затем эритроциты подвергали гемолизу бидистиллированной водой в соотношении 1:5 по объему и в полученных гемолизатах определяли уровень продуктов ПОЛ и параметры АЗ.

СГК оценивали по показателю $p50$ (pO_2 крови, соответствующее 50%-ному насыщению ее кислородом), который измеряли методом «смешивания» в нашей модификации [6] на микрогазоанализаторе ABL-330 Radiometer (Дания). $p50_{\text{станд}}$ измеряли при стандартных условиях ($pH = 7,4$, $pCO_2 = 40$ мм рт. ст. и $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), а $p50_{\text{реальн}}$ — при реальных значениях pH , pCO_2 и температуры. На основании полученных значений $p50$ по уравнению Хилла рассчитывали положение кривой диссоциации оксигемоглобина.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли по интенсивности характерного для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов УФ-поглощения в области 232—234 нм [7]. Количество ТБК-реагирующих продуктов (ТБКРП) исследовали по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [7] и рассчитывали по разнице оптической плотности при двух длинах волн $\lambda_1 = 532$ и $\lambda_2 = 580$ нм с целью внесения поправки на дополнительную окраску других соединений, не являющихся собственно вторичным продуктом ПОЛ [7]. Измерения содержания ДК и ТБКРП производились на спектрофотометре СФ-46 (Россия). Уровень оснований Шиффа (ОШ) оценивали по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длине волны возбуждения $\lambda = 340$ нм и длине волны флюоресценции $\lambda = 440$ нм на спектрофлюориметре F-4010 Hitachi (Япония) [7]. Активность каталазы

(КАТ) измеряли модифицированным методом, основанным на способности молибдата аммония образовывать стойкий окрашенный комплекс с H_2O_2 [7]. Концентрацию α -токоферола (α -Т) оценивали по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения $\lambda = 295$ нм и длине волны флуоресценции $\lambda = 326$ нм [7] на спектрофлуориметре F-4010 Hitachi (Япония). В качестве стандарта использовался α -Т фирмы Sigma (США).

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с применением критерия Стьюдента и коэффициента достоверности для разностных вариационных рядов на персональном компьютере с помощью корреляционно-регрессионного анализа с использованием прикладного статистического пакета Winstat (версия 6.0). Построение рисунков выполнялось с помощью прикладного пакета Coreldraw (версия 6.0).

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 приведены данные изменения $p50$ в эритроцитарной массе, инкубированной с различной концентрацией цианата натрия. Наблюдалось уменьшение показателя $p50_{\text{станд}}$ при инкубации с 2,5%-ной концентрацией NaOCN ($p50_{\text{станд}} = 26,44 \pm 0,24$ мм рт. ст. ($P < 0,001$) по сравнению с исходным $p50_{\text{станд}} = 34,49 \pm 0,67$ мм рт. ст.). При дальнейшем увеличении концентрации NaOCN его значение уменьшалось еще более — при инкубации с 5%-ной концентрацией равнялось $21,61 \pm 0,45$ мм рт. ст. ($P < 0,001$). Данный характер изменений сохранялся и для показателя $p50_{\text{реальн}}$ — разница между контролем и опытом при концентрациях 2,5 и 5% составляла $13,98 \pm 1,32$ мм рт. ст. ($P < 0,001$) и $19,33 \pm 1,08$ мм рт. ст. ($P < 0,001$) соответственно. С повышением концентрации цианата в инкубируемых эритроцитах сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево был более выраженным (рис. 1).

Таблица 1. Показатель сродства гемоглобина к кислороду ($p50$) в образцах эритроцитарной массы, инкубированных с различной концентрацией цианата натрия в опытах *in vitro* ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Образцы эритроцитарной массы, инкубированные с цианатом натрия в концентрации	
		2,5%	5%
Число исследований	$n = 19$	$n = 10$	$n = 19$
$p50_{\text{станд}}$, мм рт. ст.	$34,49 \pm 0,67^*$	$26,44 \pm 0,24^*$	$21,61 \pm 0,45^*$
$p50_{\text{реальн}}$, мм рт. ст.	$40,42 \pm 0,84^*$	$27,95 \pm 0,29^*$	$21,09 \pm 0,52^*$
Hb, г/л	$263,00 \pm 3,86$	$263,89 \pm 4,26$	$261,44 \pm 3,08$

* $P < 0,001$ по отношению к контролю.

Таблица 2. Уравнения линейной регрессии и соответствующие им коэффициенты корреляции, отражающие зависимость между показателями сродства гемоглобина к кислороду ($p50$), продуктами ПОЛ и факторами АЗ в эритроцитах ($n = 48$)

Уравнения линейной регрессии, по типу $Y = a + b \cdot X$	Коэффициенты корреляции, r
$p50_{\text{станд}} = 12,95 + 4,10 \cdot \text{ДК}^{***}$	$+ 0,81^{***}$
$p50_{\text{станд}} = 9,33 + 2,46 \cdot \text{ТБКРП}^{***}$	$+ 0,77^{***}$
$p50_{\text{станд}} = 24,53 + 0,10 \cdot \text{ОШ}^*$	$+ 0,29^*$
$p50_{\text{станд}} = 33,42 - 0,11 \cdot \alpha\text{-Т}^*$	$- 0,35^*$
$p50_{\text{станд}} = 70,40 - 28,75 \cdot \text{КАТ}^{***}$	$- 0,77^{***}$
$p50_{\text{реальн}} = 8,04 + 6,15 \cdot \text{ДК}^{***}$	$+ 0,83^{***}$
$p50_{\text{реальн}} = 3,75 + 3,53 \cdot \text{ТБКРП}^{***}$	$+ 0,75^{***}$
$p50_{\text{реальн}} = 24,54 + 0,18 \cdot \text{ОШ}^*$	$+ 0,35$
$p50_{\text{реальн}} = 39,46 - 0,18 \cdot \alpha\text{-Т}^{**}$	$- 0,39^{**}$
$p50_{\text{реальн}} = 96,32 - 44,55 \cdot \text{КАТ}^{***}$	$- 0,66^{***}$

* $P < 0,05$.

** $P < 0,01$.

*** $P < 0,001$.

Динамика изменений продуктов ПОЛ и параметров АЗ показана на рис. 2. Уменьшалось содержание ДК в эритроцитах, инкубированных с цианатом натрия: при 2,5%-ной концентрации — на 24% ($P < 0,001$), а при 5%-ной — на 50% ($P < 0,001$) по сравнению с исходными данными. Концентрация ТБКРП также снижалась с $9,33 \pm 0,37$ мкмоль/л в контроле до $6,93 \pm 0,13$ ($P < 0,001$) и $5,91 \pm 0,21$ ($P < 0,001$) при инкубации с 2,5 и 5% NaOCN соответственно. Содержание ОШ было ниже на 45% ($P < 0,01$) только в эритроцитах, инкубированных с 5% NaOCN . Концентрация α -Т повышалась в опытной группе (5%-ная концентрация NaOCN) в 1,5 раза ($P < 0,001$) по сравнению с контролем. Увеличивалась активность каталазы в эритроцитах, инкубированных с 2,5 и 5% NaOCN , до $1,48 \pm 0,01$ ($P < 0,001$) и $1,64 \pm 0,02$ ($P < 0,001$) при исходном значении $1,33 \pm 0,02$ Моль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{г}$ Hb/с.

Корреляционно-регрессионный анализ показателей СГК и ПОЛ (табл. 2) выявил наличие положительной корреляционной связи между $p50$ и ДК, ТБКРП, ОШ и отрицательной с α -Т и КАТ в исследуемом биоматериале. Коэффициенты кор-

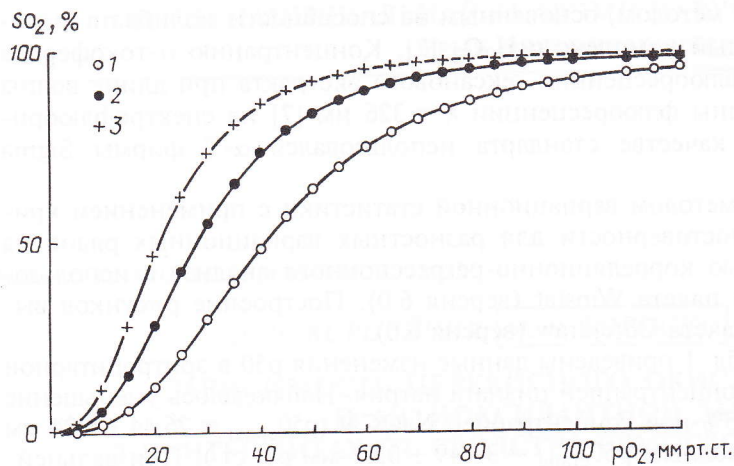


Рис. 1. Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, $p\text{CO}_2$ и температуры после инкубации с 0,9%-ным раствором NaCl (1) и цианатом натрия в концентрации 2,5 (2) и 5% (3)

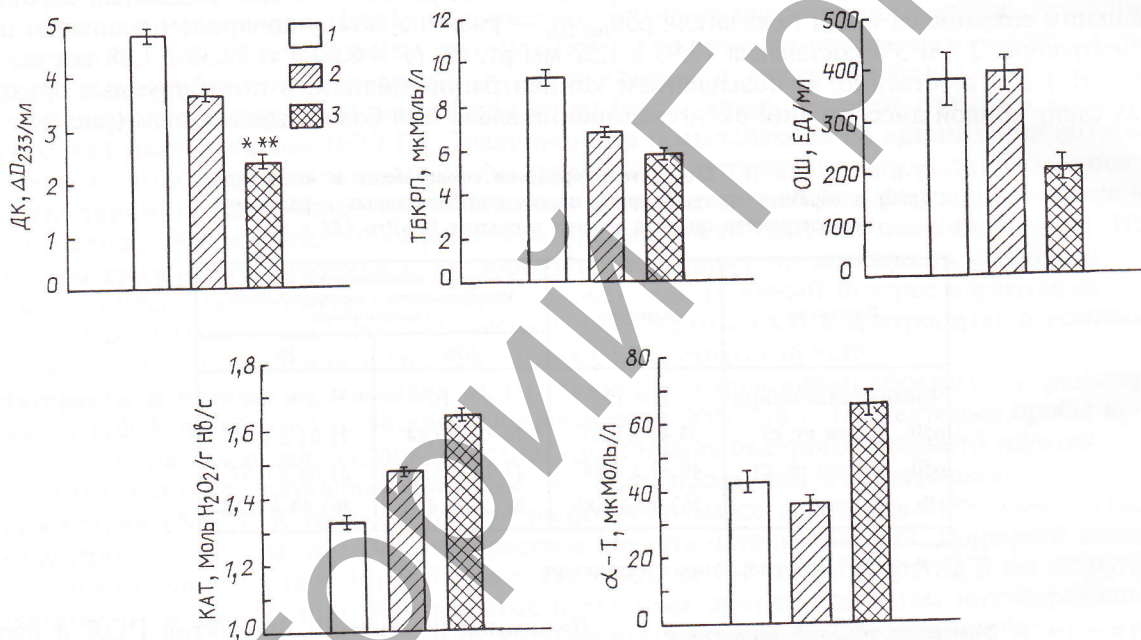


Рис. 2. Динамика изменений продуктов ПОЛ и факторов АЗ в эритроцитах, инкубированных с 0,9%-ным раствором NaCl и цианатом натрия в концентрации 2,5 и 5%: 1 — контроль ($n = 19$), 2 и 3 — эритроциты, инкубированные с 2,5%-ным ($n = 10$) и 5%-ным цианатом натрия ($n = 19$); звездочка — $P < 0,01$, две звездочки — $P < 0,001$

реляции при этом колебались от + 0,29 до + 0,83 и от - 0,35 до - 0,77. Коэффициенты, отражающие связь процессов ПОЛ с $p50$, практически не отличались между его реальным и стандартным значениями. Слабые связи были обнаружены с ОШ и α -Т, где r составлял + 0,35 ($P < 0,05$) и - 0,39 ($P < 0,01$). Более высокие значения наблюдались с ДК, ТБКРП и КАТ, где r соответственно равнялся + 0,83 ($P < 0,001$), + 0,77 ($P < 0,001$) и - 0,77 ($P < 0,001$), что отражает существование тесных взаимоотношений между ними.

Карбамиллизация гемоглобина сопровождается уменьшением показателя $p50$, причем с повышением инкубируемой концентрации цианата натрия значимо возрастает SGK. При этом наблюдается снижение ДК, ТБКРП, ОШ и повышение активности КАТ и концентрации α -Т в эритроцитах, инкубированных с 2,5%-ным и 5%-ным раствором NaOCN, с выраженной дозозависимой динамикой изменений.

Цианат необратимо взаимодействует с NH_2 -концевым валином молекулы гемоглобина, образуя карбаминные связи. Это соединение карбамиллирует многие протеины необратимо на N-концевых α -аминогруппах внутренних лизинов, а также обратимо на SH-группах [8]. Карбамиллирование аномального гемоглобина предупреждает серповидноклеточную трансформацию эритроцитов и продлевает их срок жизни *in vivo*, что с успехом применялось для лечения соответствующей анемии у людей [5].

Известно, что составной частью защитных механизмов при инициируемом гидроперекисями окислительном стрессе является оксигемоглобин, про- либо антиоксидантные качества которого зависят как от его кислородсвязывающих свойств, так и от состояния самой молекулы гемоглобина. С повышением СГК уменьшается скорость аутоокисления оксигемоглобина в метгемоглобин и, наоборот, уменьшение сродства способствует образованию метформы [9]. В то же время гемоглобин может проявлять и прооксидантное действие — путем образования гидроксильных радикалов. Показано, что оксигемоглобин оказывает прооксидантный эффект в культурах эндотелиальных клеток, причем при H_2O_2 -индуцированном окислении его в метформу [10]. Инкубация оксигемоглобина с H_2O_2 в присутствии диметилсульфоксида сопровождается превращением последнего в формальдегид и увеличением образования свободных радикалов, однако с повышением СГК уменьшается генерация супероксидного аниона и в конечном итоге — накопление конечного продукта [11].

Активность процессов ПОЛ в эритроцитарной массе, инициированная гидроперекисью третбутила, зависит от состояния гемоглобина, так как в содержащих метгемоглобин эритроцитах образование малонового диальдегида и интенсивность хемилюминесценции значимо выше, чем в клетках, содержащих оксигемоглобин [12]. Степень инактивации эритроцитарной глутатионпероксидазы коррелирует со скоростью окисления оксигемоглобина и во многом зависит от формирования гемихрома, а низкая активность КАТ соответствует более высокой концентрации метгемоглобина [13]. Скорость окисления глутатиона нитритом натрия в присутствии оксигемоглобина снижается, и только после перехода значительной части оксигемоглобина в метформу наблюдается прирост концентрации окисленного глутатиона [10]. Гемоглобин, обладая пероксидазными свойствами, участвует в окислении липопротеидов низкой плотности. Показано, что активной формой, вызывающей свободнорадикальные процессы в эритроцитах и ковалентное перекрестное сшивание мембранных белков, является глобиновый радикал, образующийся в окисленном до метформы гемоглобине [14].

Гемоглобин, проявляя аффинные свойства, выступает как буферная емкость кислорода между средой и тканью, поддерживая в ней определенный оптимальный уровень pO_2 , при котором скорость процессов ПОЛ имеет некий физиологически необходимый уровень. Предполагается, что на ранних этапах эволюции дыхательные пигменты выполняли преимущественно антиоксидантную функцию, которая сохранилась еще у некоторых видов микроорганизмов и в настоящее время [15]. Возможность участия СГК в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия наблюдалась при целенаправленном повышении сродства в условиях окислительного стресса, инициируемого липополисахаридом [4].

Таким образом, полученные данные о снижении уровня ДК, ТБКРП, ОШ и увеличении концентрации α -Т, активности КАТ в эритроцитарной массе, тесно коррелирующие с СГК, отражают участие кислородсвязывающих свойств гемоглобина в механизмах поддержания прооксидантно-антиоксидантного баланса и позволяют предположить возможность их коррекции для усиления антиоксидантного потенциала.

Работа поддержана Фондом фундаментальных исследований Республики Беларусь, грант МП-12.

Summary

The hemoglobin-oxygen affinity (HOA) was increased by sodium cyanate in the experiments in vitro, and the index of the blood oxygen transport ($p50$), contents of conjugated dienes, thiobarbituric acid-reactive substances and Schiff bases, catalase activity and α -tocopherol concentration in red blood cells were investigated. The regression analysis of these parameters indicated that the increase of HOA promote the shift of oxyhemoglobin dissociation curve leftwards, the lowering in the main lipid peroxidation products, and the rise in antioxidant defense factors. The involvement of hemoglobin oxygen-binding properties in the mechanisms of antioxidant protection is discussed.

Литература

1. Record I. R., MacQueen S. E., Dreosti I. E. // Biol. Trace. Elem. Res. 1990. Vol. 23. P. 89—96.
2. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). М., 1989. С. 11—37.
3. Скулачев В. П. // Молекулярная биология. 1995. Т. 29, вып. 6. С. 1199—1209.
4. Zinchuk V. V., Borisuk M. V. // J. Physiol. & Pharmacol. 1997. Vol. 48, N 1. P. 113—119.
5. Rivera Ch. M., Leon-Velarde F., Huicho L., Monge C. C. // J. Comp. Physiol. B. 1995. Vol. 164, N 8. P. 659—662.
6. Борисюк М. В., Добродей М. А., Дремза И. К. и др. // Методы исследования массопереноса в системе микроциркуляции. Новосибирск, 1991. С. 156—162.

7. Rice - Evans C. A., Diplock A. T., Symons M. C. R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. Elsevier, 1991.

8. Allison T. B., Pieper G. M., Clayton F. C., Eliot R. S. // Am. J. Physiol. 1976. Vol. 230, N 6. P. 1751—1754.

9. Stepuro I., Chaikovskaya N., Piletskaya T., Solodunov A. // Pol. J. Pharmacol. 1994. Vol. 46, N 6. P. 601—607.

10. Balla J., Jacob H. S., Balla G. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90, N 20. P. 9285—9289.

11. Alayash A. I., Fratanoni J. C., Bonaventura C. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 1992. Vol. 298, N 1. P. 114—120.

12. Lissi E., Franz R., Cabezas J. et al. // Cell. Biochem. Funct. 1986. Vol. 4, N 1. P. 61—68.

13. Masana O., Kobayashi H., Ioku N., Ishii K. // Proc. Jap. Acad. 1986. Vol. B62, N 9. P. 367—371.

14. Miller Y. I., Altamentova S. M., Shaklai N. // J. Biochemistry. 1997. Vol. 36, N 40. P. 12189—12198.

15. Коваленко Е. А., Березовский В. А., Эпштейн Н. М. Полярографическое определение кислорода в организме. М., 1975. С. 153—186.

Гродненский государственный медицинский
институт

Поступила в редакцию
20.03.98