

Hüseynova S.Y.

NATRIUM NİTRİTİN TOKSİK DOZASININ TƏSİRİNƏ MƏRUZ QALAN ERİTROSİTLƏRİN OKSİDATİV MODİFİKASIYASI VƏ ANTIOKSİDANT FERMENTLƏRİN VƏZİYYƏTİ

Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyasının Biofizika İnstitutu, Bakı

Xülasə. Məqalədə natrium nitritin (NaNO_2) insan eritrositlərində oksidləşdirici proseslərə – methemoglobin oksidləşməsinə, əsas antioksidant fermentlərin (superoksiddismutaza, katalaza, qlutationperoksidaza) aktivliyinin dəyişməsinə və lipid peroksidləşməsinin intensivliyininə (in vitro) təsirinin nəticələri təqdim edilir.

İş fərqli inkubasiya müddətlərində (5-30 dəq) natrium nitritin subtoksik dozasına (inkubasiya mühitində son konsentrasiyası 1,0 mmol/l) məruz qalan donorlardan alınan qan nümunələrinin spektrofotometrik tədqiqatının nəticələrinə əsaslanır.

Aparılan tədqiqatların təhlili göstərdi ki, nitritlə əlaqəli oksidləşmə zamanı eritrositlərdə superoksiddismutaza, katalaza və qlutationperoksidazanın aktivliyi azalır. Katalazanın və qlutationperoksidazanın aktivliyinin azalması methemoglobin intensiv toplanması və lipid peroksidləşməsinin artması ilə müşayiət olunur.

Alınan nəticələr eritrositlərdə natrium nitritin təsiri altında bu antioksidant fermentlərinin oksidləşmə proseslərində fəal iştirakını göstərir. Qlutationperoksidazanın aktivliyinin azalması ilə lipid peroksidləşməsinin intensivliyinin artması arasındakı mənfi əlaqə, eritrositlərdə oksidativ stresin məhdudlaşdırılmasında qlutation peroksidazanın əsas rolunu göstərir.

Açar sözlər: methemoglobin, natrium nitrit, superoksiddismutaza, qlutationperoksidaza, katalaza, lipid peroksidləşməsi

Ключевые слова: метгемоглобин, нитрит натрия, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидаза, каталаза, перекисное окисление липидов

Key words: methemoglobin, sodium nitrite, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, lipid peroxidation

Гусейнова С.Я.

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ, И СОСТОЯНИЕ ANTIОКСИДАНТНЫХ ЭНЗИМОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУБТОКСИЧЕСКОЙ ДОЗЫ НИТРИТА НАТРИЯ

Институт Биофизики Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку

Рассмотрено влияние нитрита натрия (NaNO_2) на окислительные процессы в эритроцитах человека (in vitro) – окисление гемоглобина, изменение активности ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы) и интенсивности перекисного окисления липидов.

Работа основана на результатах спектрофотометрического исследования образцов донорской крови, подверженной воздействию субтоксической дозы нитрита натрия с конечной концентрацией в инкубационной среде 1,0 ммоль/л, с различными сроками инкубирования от 5 до 30 мин.

Анализ проведенных исследований показал, что при нитритиндуцированном окислении имеет место снижение активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах. Снижение активности каталазы, уровня восстановленного глутатиона и связанного с ним глутатионпероксидазы сопровождается интенсивным накоплением

метгемоглобина, и ростом перекисного окисления липидов.

Полученные результаты свидетельствуют об активном участии указанных антиоксидантных энзимов эритроцитов в окислительном метаболизме при нитритном воздействии. Выраженная связь между уменьшением активности глутатионпероксидазы и ростом интенсивности перекисного окисления липидов свидетельствует о преобладающей роли глутатионпероксидазы в лимитировании окислительного стресса в эритроцитах.

В основе системных механизмов влияния нитритов лежит реакция превращения нитрит-ионов в монооксид азота (NO), который способен как стимулировать, так и подавлять процессы окисления биомолекул. Одной из главных мишеней токсического действия нитритов является гемоглобин, который имеет повышенную окислительную аффинность к нитритам [1]. Избыток нитритов переводит железо гема из Fe^{2+} в Fe^{3+} состояние (метгемоглобин (MetHb)), с образованием NO-комплексов с гемоглобином [2]. Стимуляция нитритного окислительного процесса в эритроцитах сопровождается не только накоплением MetHb, но и других дериватов гемоглобина и образованием радикальных продуктов, включая активные формы кислорода и азота, способных служить интермедиатами для дальнейшего окислительного процесса, приводящего к изменениям активности антиоксидантных энзимов и в первую очередь супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГП), функционирующих в условиях активной генерации H_2O_2 , а также к развитию перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 3].

Цель настоящей работы состояла в изучении состояния восстановленного глутатиона (GSH), как главного цитозольного антиоксиданта, основных антиоксидантных энзимов, а так же концентрации продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) при развитии нитритной интоксикации, вызванной субтоксичной дозой нитрита натрия в изолированных эритроцитах человека в зависимости от времени инкубирования.

Материал и методы исследования. Объектом исследования являлись эритроциты и гемоглобин человека. В экспериментах *in vitro* была использована кровь доноров, взятая из локтевой вены в пробирки с гепарином (20 ед./мл крови). Путем центрифугирования (800

g/15 мин) проводилось отделение плазмы крови от эритроцитов. Для получения суспензии эритроцитов осадок эритроцитов трижды отмывался в десятикратном объеме физиологического раствора (0,15 M NaCl) натрий фосфатного буфера (10 mM (pH 7,4)), центрифугировался при 800g/15 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Гемолиз эритроцитов достигался путем разведения эритроцитарной массы дистиллированной водой в соотношении 1:9 с последующим замораживанием-оттаиванием и центрифугированием при 10000g/10 мин.

Была проведена серия опытов по изучению изменений показателей окислительных процессов в эритроцитах (накопление MetHb, содержание глутатиона, активность ГП, каталазы, интенсивность ПОЛ) под воздействием нитрита натрия. Образцы исследования содержали лизат эритроцитов (в случае с ПОЛ использовалась суспензия эритроцитов) в каждый из которых добавлялся нитрит натрия (в соотношении 100 мкл $NaNO_2$ на 1 мл лизата) с конечной концентрацией в инкубационной среде 1,0 ммоль/л, с различным временем инкубирования от 5 до 30 мин, при 37 °C. Аликвоты отбирались каждые 5 мин. Измерения проводились против контрольного образца не подверженного воздействию нитрита натрия.

В ранних работах было рассмотрено влияние нитрита натрия на эритроциты человека и на активность антиоксидантных ферментов в них в широком концентрационном диапазоне. Концентрация нитрита натрия – 1 ммоль/л была выбрана как субтоксическая концентрация, то есть та с которой начинается существенный рост накопления MetHb и развитие процесса перекисного окисления липидов [4, 5].

Накопление MetHb оценивалось по полуэмпирическим формулам, предложенным J. Szebeni et al. ($[MetHb] = 28A_{577} - 307A_{630} - 55A_{560}$) (Szebeni, et al., 1984) [6]. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) осуществляли методом, принцип которого заключается в образовании окрашенного соединения при взаимодействии GSH с 5,5-дитиобис (2-нитробензойной кислотой) (ДТНБК) [7]. Активность глутатионпероксидазы определяли по

скорости окисления восстановленного глутатиона в присутствии гидропероксида трет-бутила [8]. Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом, по изменению концентрации пероксида водорода, образующего при взаимодействии с солями молибдата стойкий окрашенный комплекс, интенсивность окраски которого регистрировалась при длине волны 410 нм [9]. О величине активности СОД в гемолизатах эритроцитов судили по степени ингибирования им скорости аутоокисления адреналина, интенсивность которой оценивали по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм, обусловленному накоплением продукта окисления, опережающему по времени образования адренохрома [10]. Интенсивность протекания процессов ПОЛ в эритроцитах оценивалась по накоплению окрашенных продуктов малонового диальдегида (МДА), реагирующих в цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой, с образованием окрашенного триметинового комплекса, имеющего характерный спектр поглощения с максимумом при $\lambda = 532$ нм [11].

Все измерения проводились на спектрофотометре СФ-46(Россия).

При статистической обработке полученных в ходе исследования результатов определяли значения среднего арифметического (M), стандартного отклонения (δ), ошибку среднего арифметического (m). Уровень значимости сравниваемых результатов определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Обработка данных выполнена с использованием пакетов прикладных программ MS Excel.

Результаты исследования и их обсуждение. В образцах крови подверженной действию нитрита натрия (конечной концентрацией в инкубационной среде – 1,0 ммоль/л) к середине инкубационного срока, наблюдается падение активности СОД более чем на 30% в сравнении с контролем и к 30 мин инкубирования достигает минимальных значений (~ на 75% относительно контроля) (рис. 1).

Активность каталазы достигает, существенно низких значений уже к 15 мин инкубационного срока: 50-60% от исходного уровня (рис. 2).

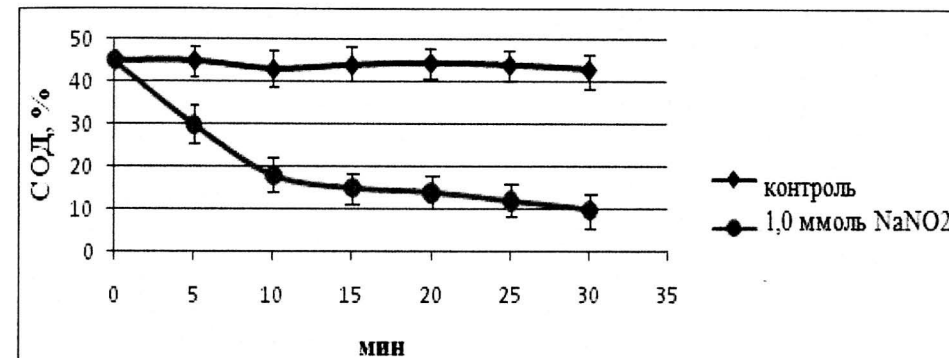


Рис. 1. Изменение активности супероксиддисмутазы в лизате эритроцитов человека, обработанных $NaNO_2$

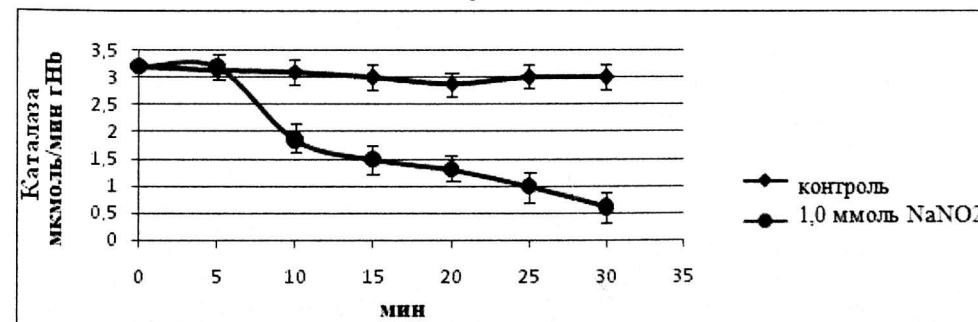


Рис. 2. Изменение активности каталазы в лизатах эритроцитов человека, обработанных $NaNO_2$

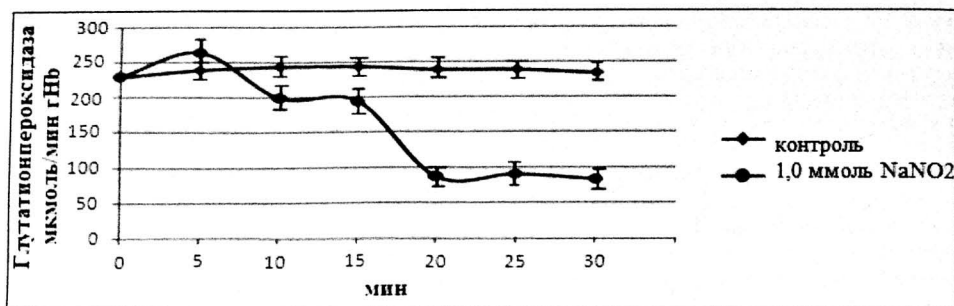
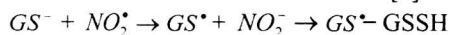


Рис. 3. Изменение активности глутатионпероксидазы в лизате эритроцитов человека, обработанных NaNO_2

В отличие от каталазы, активность ГП (рис. 3) в начальный срок инкубирования несколько растет (~10%) (против контроля) после чего устанавливается на уровне контроля (лаг-период), а далее наблюдается падение активности энзима.

Факт значительного уменьшения активности каталазы на фоне некоторых увеличений активности ГП свидетельствует о том, что в эритроцитах, обработанных нитритом, идет интенсивное гидропероксид образование, при котором исчерпываются ресурсы каталазы, в то время как ГП утилизирует уровень гидропероксидов в основном в физиологических пределах.

Окисление восстановленного глутатиона (GSH) является одним из важных последствий радикалообразования при внутриклеточном окислении гемоглобина [2].



При этом активность ключевых взаимодополняющих антипероксидных энзимов каталазы и ГП, участвующих в регуляции

уровня H_2O_2 , по разному связана с GSH, и если связь для каталазы опосредована, то ГП непосредственно связана с GSH, т.к. GSH является субстратом для ГП. В этих условиях деградация гема в большей мере зависит от GSH, учитывая то, что в эритроцитах ГП, при умеренной концентрации пероксида водорода, является главным антиокислительным протектором Hb [12].

В связи с этим было проведено изучение соотношения GSH в эритроцитах при нитритном воздействии в широком концентрационном диапазоне (таблица).

Опыты по изучению влияния нитрита натрия на содержание внутриэритроцитарного GSH показали, что нитриты даже в низких концентрациях оказывают существенное влияние на истощение внутриэритроцитарного GSH. Здесь мы нашли совпадения между уменьшением содержания GSH и падением активности ГП и каталазы. Из таблицы видно, что в первые 3-5 минут 30-ти минутного инкубирования

Таблица. Изменение содержания восстановленного глутатиона (GSH) в лизате эритроцитов человека, обработанных NaNO_2

| Концентрация NaNO_2 | время инкубирования | | | | | | |
|------------------------------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 0 мин | 5 мин | 10 мин | 15 мин | 20 мин | 25 мин | 30 мин |
| | нмоль GSH/мин гНб | | | | | | |
| контроль | 8,5±0,4 | 8,4±0,6 | 8,3±0,6 | 8,3±0,7 | 8,2±0,8 | 8,2±0,8 | 8,3±0,7 |
| 0,007 ммоль | 8,2±0,8 | 9,7±1,1 | 7,7±0,6 | 7,1±0,6 | 6,2±0,5 | 5,7±0,6 | 5,2±0,5 |
| 0,07 ммоль | 8,5±0,8 | 9,5±0,4 | 7,4±0,5 | 5,8±0,7 | 5,0±0,4 | 4,5±0,5 | 3,7±0,4 |
| 0,15 ммоль | 8,3±0,9 | 9,6±0,8 | 7,0±0,7 | 5,2±0,7 | 4,0±0,4 | 4,1±0,4 | 3,0±0,3 |
| 0,35 ммоль | 8,3±0,7 | 9,4±0,9 | 6,8±0,6 | 4,2±0,4 | 3,5±0,4 | 3,0±0,4 | 2,3±0,3 |
| 0,7 ммоль | 8,3±0,8 | 8,8±1,7 | 5,8±0,6 | 3,0±0,3 | 2,7±0,3 | 2,0±0,3 | 1,2±0,2 |
| 1,0 ммоль | 8,5±0,8 | 9,0±1,0 | 5,2±0,7 | 4,7±0,5 | 3,5±0,4 | 2,2±0,4 | 1,0±0,2 |
| 3,5 ммоль | 8,5±0,7 | 9,1±0,8 | 2,8±0,5 | 1,3±0,4 | 0,6±0,2 | 0,4±0,2 | 0,3±0,2 |

происходит незначительный «всплеск» содержания GSH, по видимому, имеющий компенсаторное значение, присущий низким концентрациям нитрита 0,007; 0,07; 0,35 ммоль и который отсутствует для 0,70; 1,0; 3,50 ммоль. Скорость истощения GSH максимальна в интервалах 5-10 минут или 5-15 минут и зависит от конечной концентрации нитрита (чем выше она, тем выше и скорость истощения GSH). За 30 минут инкубирования уровень GSH снижается до 7-25% от исходного (для 0,35; 0,70; 3,50 ммоль NaNO_2), в то время как для более низких концентраций, он составляет около ≈ 50%.

Падение активности ГП происходит из-за того, что содержание GSH превышает потребности ГП в GSH как субстрата окисления. После прохождения «красной линии», истощение уровня GSH начинает сказываться и на потере активности ГП.

Таким образом, нитритная обработка изолированных эритроцитов снижает активность СОД, каталазы и ГП (если исключить начальный рост активности ГП).

Снижение активности главных антиокислительных энзимов вызванное нитритами, сопровождается интенсивным накоплением MetHb и других окислительных радикальных продуктов, способных приводить к развитию перекисного окисления белков и липидов, и как следствие к гемолизу [13].

Наши опыты показали, что нитриты оказывают окислительный эффект на HbO_2 , достигая уже в первые 15-20 мин инкубирования 40% отметки MetHb (рис. 4).

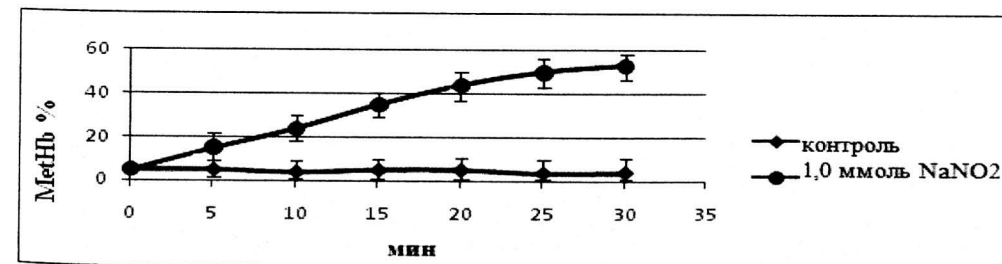


Рис. 4. Нитритиндуцированное накопление MetHb в инкубационной среде, содержащей эритроциты человека.

NO являясь активным продуцентом нитрита натрия, может проявлять в зависимости от концентрации как окислительные, так и проокислительные свойства, оказывая различные эффекты на окислительные процессы в гемоглобине и в эритроцитах при различных концентрационных пределах [14]. В частности, низкие или близкие к физиологическим нормам концентрации в среде инкубирования NO_2^- придают антиокислительные свойства гемоглобину, связавшего NO, и таким образом положительно влияет на АО статус эритроцитов. Однако, в ряде случаев при изменении диетарных условий (нитритное отравление, или дефицит азотного потребления) нитрита нормативы соотношения $\text{NO}:\text{Hb}=1:1000$ могут существенно меняться, особенно для оксида азота ввиду широкого использования нитратов/нитритов в сельскохозяйственном производстве и пищевой промышленности. В этом случае избыток NO может стимулировать окислительный стресс, как одно из проявлений нитритной токсичности.

Вопрос о том, каким образом столь низкие включения NO в гемоглобин могут оказывать значительные физиологические эффекты, остается до конца невыясненным [15], несмотря на впечатляющие успехи в этой области (признание NO как газовой молекулы и т.д.).

В то же время имеет место относительно слабая «мотивация» изменения накопления малонового диальдегида (МДА): всего 60 % увеличение уровня МДА за 30 мин времени инкубации (рис. 5) на фоне интенсивного метгемоглобинообразования.

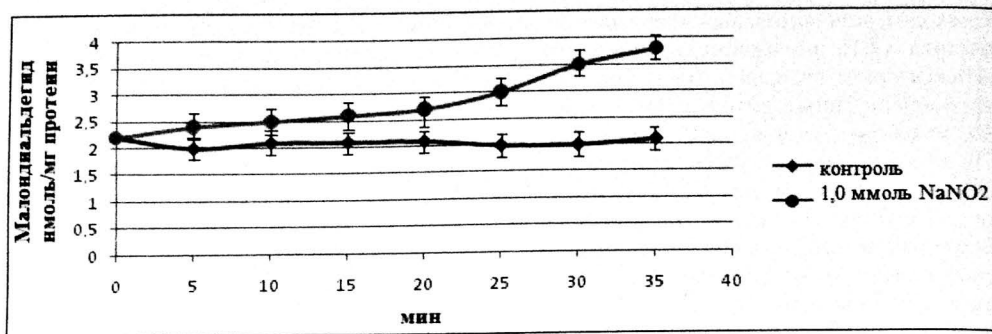


Рис. 5. Накопление МДА в суспензии эритроцитов человека, обработанных NaNO₂

Относительно малая степень интенсификации ПОЛ эритроцитов, наряду с существенным окислительным воздействием на Hb (увеличение содержания MetHb в десятки раз), указывает на то, что образовавшийся в больших количествах MetHb, а возможно и другие продукты взаимодействия нитритов (оксида азота) и гемоглобина, могут тормозить развитие реакций ПОЛ, т.е. выступать в роли АО [16].

Таким образом, результаты исследования позволяют утверждать, что индуцированный нитритом натрия окислительный стресс приводит к снижению активности главных антиокислительных ферментов эритроцитов – каталазы и ГП, СОД, при-

чем снижение ГП носит фазовый характер. Относительно малая степень интенсификации ПОЛ на фоне существенной окислительной модификации гемоглобина (накопление MetHb), свидетельствует о том, что MetHb обладает антиокислительными свойствами, препятствующими накоплению продуктов ПОЛ. Изменение активности ГП отрицательно коррелирующее с изменением ПОЛ эритроцитов, после исчерпания лаг периода фермента, что свидетельствует о главенствующей роли селенфермента ГП, как эндогенного антиокислительного фактора в регуляции окислительных процессов в эритроцитах при нитритном воздействии.

References

- Helms C., Kim-Shapiro D.B. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling // *Free Radical Biology and Medicine*, - 2013. - vol. 61. - p. 464-472.
- Lapinski R., Siergiejuk M., Worowska A., Gacko M. Oxidants and antioxidants of erythrocytes // *Progress in Health Science*, - 2014. - vol. 4(1). - p. 211-219.
- Krych-Madej J., Gebicka L. Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies // *J. Inorganic Biochemistry*, - 2017. - vol. 171. - p. 10-17.
- Huseynova S.Y., Huseynov T.M., Dadashov M.Z. Okiskitel'naya modifikatsiya eritrotsitov umerennymi dozami nitrita natriya v opytakh in vitro [Oxidative modification of erythrocytes with moderate doses of sodium nitrite in vitro experiments] // *Meditsinskaya biofizika i biokhemiceskaya khimiya* [Medical biophysics and biochemistry], - 2018. - vol. 3 (1). - p. 189-195.
- Huseynov T.M., Huseynova S.Y., Guliyeva R.T., Dadashov M.Z., Rahmanova (Maharramova) S.M., Yakhyayeva F.R., Jafarova S.A., Characteristics of oxidative stress induced by moderate doses of sodium nitrite in isolated erythrocytes in the presence of sodium selenite // *Микроэлементы в медицине* [Trace elements in medicine], - 2021. - vol. 22(2). - p. 25-35.
- Szebeni J., Winterbourn C.C., Carrell R.W. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposomemodel // *Biochemical. J.*, - 1984. - vol. 220 (3). - p. 685-692.
- Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, - 1959. - vol. 82. - p. 70-77.
- Moin V. M. Prostoj i spetsificheskij metod opredeleniya aktivnosti gltationperoksidazi v eritrotsitakh [Simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes] //

- Laboratornoe Delo, - 1986. - vol. 12. - p. 724-727.
- Korolyuk M.A. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy [A method of measurement of catalase activity] // *Laboratornoe Delo*. - 1988. - vol. 64(30). - p. 16-17.
- Sirota T.V. Novyj podkhod v issledovanii protsesa autookisleniya adrenalina i ispolzovaniye ego dlya izmereniya aktivnosti superoksidnitsmutazy [A new approach in the study of the autooxidation process of adrenaline and its use to measure the activity of superoxide dismutase] // *Вопросы медицинской химии* [Medicinal chemistry issues], - 1999. - vol. 45(3). - p. 263-272.
- Mengel C.F., Kann H.E. Effect of in vivo hyperoxid of erythrocytes, in vivo peroxidation of erythrocytes lipid // *J. Clinical Investigation*, - 1966. - vol. 45(7). - p.1150-1158.
- Rocha S., Gomes D., Lima M., Bronze da Rocha E., Santos S.A. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H₂O₂-induced oxidative stress // *Free Radical Research*, - 2015. - vol. 49(8). - p. 990-1003.
- Ansari F.A., Ali S.N., Mahmood R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes // *Toxicology in Vitro*, - 2015. - 29(7). - p.1878-1886.
- DeMartino A.W., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Gladwin M.T. Nitrite and nitrate chemical biology and signaling // *British J. of Pharmacology*, - 2019. - vol.176(2). - p. 228-245.
- Sun C., Yang J., Yang j., Kleschyov A.L., Lumbberg J.O., Zhuge Z., Carlstrom M., Pernov J., Wajih N., Isbell T.S., Oh J.,Cabralas P., Tsai A.G., Townes T., Patel R.P. Hemoglobin β-93 cysteine is not required for export of nitric oxide bioactivity from the red blood cell // *Circulation*, - 2019. - vol.139(23). - p. 2654-2663.
- Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P., Vallelian F., Schoedon G., Buehler P.W., Schaer D.J. Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase // *Antioxidants Redox Signaling*, - 2010. - vol. 12(2). - p.185-198.

Huseynova S.Y.

OXIDATIVE MODIFICATION OF ERYTHROCYTES INDUCED BY SODIUM NITRITE AS A MEASURE OF ITS TOXICITY

Institute of Biophysics, Azerbaijan National Academy of Science, Baku

Summary. The article presents the results of a study of the effect of sodium nitrite on oxidative processes in human erythrocytes (in vitro) - hemoglobin oxidation, changes in the activity of key antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) and the intensity of lipid peroxidation.

The work is based on the results of a spectrophotometric study of donor blood samples exposed to a subtoxic dose of sodium nitrite with a final concentration of 1.0 mmol in the incubation medium with different incubation times from 5 to 30 minutes.

The analysis of the conducted studies showed that nitrite-induced oxidation leads to a decrease of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activity in erythrocytes. A decrease of catalase and glutathione peroxidase activity and the level of GSH is accompanied by an intense accumulation of methemoglobin, and an increase in lipid peroxidation.

The results obtained indicate the active participation of these antioxidant enzymes of erythrocytes in oxidative metabolism under nitrite exposure. The pronounced relationship between a decrease in the activity of glutathione peroxidase and an increase in the intensity of lipid peroxidation indicates the predominant role of glutathione peroxidase in limiting oxidative stress in erythrocytes.

Автор для корреспонденции:

Гусейнова Севиндж Явус кызы – научный сотрудник лаборатории «Экологической биофизики» Института Биофизики Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

E-mail: seva.gy7@mail.ru