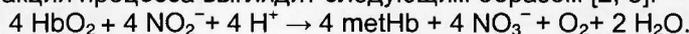


**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА ПРОЦЕССЫ  
МЕТГЕМОГЛОБИНОБРАЗОВАНИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ И ИХ ЛИЗАТАХ\***

Protective effect of various flavonoids (rutin, quercetin, dihydroquercetin, ECG) on methemoglobin formation in erythrocytes and their lysates caused by  $\text{NaNO}_2$  was studied. It was found that all flavonoids were effective in the protection of hemoglobin against  $\text{NaNO}_2$ -induced oxidation (quercetin < ECG < rutin < dihydroquercetin) but they did not possess the methemoglobin reductase activity. It was shown that incubation of red blood cells with quercetin, but not with other flavonoids, resulted in methemoglobin formation.

Известно, что нитросоединения, в частности нитрит натрия, обладают метгемоглобинообразующей способностью и, попадая в организм, вызывают нарушение кислородтранспортной функции крови. Показано, что процесс метгемоглобинообразования, инициируемый нитритами, протекает по ион-радикальному механизму с вырожденным разветвлением цепей [1]. Суммарная реакция процесса выглядит следующим образом [2, 3]:



Механизм нитритного окисления гемоглобина до метгемоглобина полностью не выяснен до настоящего времени, тем не менее непрямыми методами установлено участие в этом процессе активных форм кислорода (АФК)  $\text{NO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2 \cdot$  [1, 2, 4, 5]. В связи с этим определен интерес представляет исследование способности антиоксидантов защищать гемоглобин от метгемоглобинообразующего действия  $\text{NO}_x$ -соединений.

Известно, что растительные флавоноиды, производные бензо-γ-пирона, являются эффективными ловушками АФК – анион-радикала кислорода [6], монооксида азота [7], гидроксильных и пероксильных радикалов [6, 8], пероксинитрита [9]. Как было показано нами ранее [10–12], флавоноиды обладают высокой антирадикальной и антиокислительной активностью в условиях развития окислительного стресса, и эффективность их цитопротекторного действия находится в прямой корреляционной зависимости от их антирадикальной активности в отношении  $\text{O}_2 \cdot$ . Вместе с тем флавоноиды не являются однородной группой соединений со сходными химическими свойствами и некоторые из них, в частности кверцетин, могут окисляться молекулярным кислородом с образованием АФК, что является причиной их прооксидантного действия в биологических системах [13].

В связи с этим в данной работе было изучено защитное действие ряда флавоноидов (рутин, кверцетин, дигидрокверцетин, эпикатехин галлат) при  $\text{NaNO}_2$ -инициируемом образовании метгемоглобина в суспензии эритроцитов и их лизатах, а также исследована способность самих флавоноидов инициировать эти процессы.

**Материал и методика**

В работе использовали эпикатехин галлат (ЭКГ), рутин, кверцетин, дигидрокверцетин фирмы «Sigma» (США), нитрит натрия (марки «ч. д. а.», «Реахим»).

Исследования выполнены с использованием суспензии и лизатов эритроцитов крыс. Эритроциты отделяли центрифугированием при 1500 g в течение 5 мин и трижды отмывали в 0,9 % растворе хлорида натрия. При  $\text{NaNO}_2$ -инициируемом метгемоглобинообразовании в эритроцитах среда инкубации содержала 0,3 % суспензию эритроцитов в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, 17 мМ  $\text{NaNO}_2$ . При  $\text{NaNO}_2$ -инициируемом метгемоглобинообразовании в лизатах эритроцитов среда инкубации содержала 0,3 % лизат

\* Авторы статьи – сотрудники НИЛ проблем терморегуляции БГУ.

эритроцитов в дистиллированной воде и 4,5 мМ NaNO<sub>2</sub>. Исследуемые флавоноиды вносили в среду инкубации в виде растворов в ДМСО при концентрациях, позволяющих определить их защитное действие. Контрольная проба содержала аналогичный объем растворителя. При исследовании способности флавоноидов к метгемоглобинообразованию среда инкубации содержала 0,3 % суспензию эритроцитов в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4 и различные концентрации исследуемых флавоноидов (в диапазоне 40–320 мкМ). Реакции метгемоглобинообразования проводили при комнатной температуре. Степень metHb-образования определяли спектрофотометрически по поглощению при 620 нм. При расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{620}=3,35 \text{ л} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [14]. За 100 % метгемоглобинообразования принимали количество metHb, образующееся при максимальном окислении гемоглобина NaNO<sub>2</sub>. Содержание оксигемоглобина рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{577}=15,37 \text{ л} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [14].

### Результаты и их обсуждение

В данной работе была изучена способность флавоноидов рутин, кверцетин, дигидрокверцетин и эпикатехин галлата предотвращать иницируемый нитритом натрия процесс образования метгемоглобина в суспензии эритроцитов и их лизатах.

На рис. 1 представлены спектры поглощения гемоглобина до и после инкубации с 17 мМ NaNO<sub>2</sub> (5 мин) без и в присутствии флавоноидов. Спектры поглощения оксигемоглобина (спектр 1) и метгемоглобина (спектр 2) соответствуют описанным в литературе [14, 15]. Для видимой области электронного спектра поглощения оксигемоглобина характерны две Q-полосы в длинноволновой части спектра, имеющие в случае физиологических условий среды максимумы при 541 и 577 нм. По сравнению с оксигемоглобином спектр электронного поглощения метгемоглобина в видимой области характеризуется деформацией Q-полос и появлением полосы поглощения при 620–630 нм. На основании полученных спектров

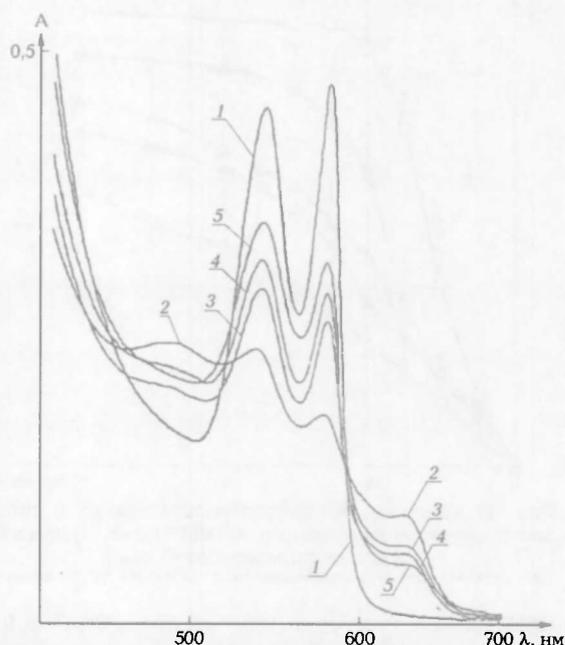


Рис. 1. Спектры поглощения гемоглобина до (1) и после инкубации с 17 мМ нитритом натрия (5 мин) без (2) и в присутствии 160 мкМ дигидрокверцетина (3), рутина (4) и кверцетина (5)

были рассчитаны исходная концентрация оксигемоглобина ( $36,7 \pm 0,7 \text{ мкМ}$ ) в среде инкубации и концентрация метгемоглобина ( $27,5 \pm 1,2 \text{ мкМ}$ ), образующегося через 5 мин инкубации суспензии эритроцитов с нитритом натрия. Как следует из анализа спектров, приведенных на рис. 1, флавоноиды рутин, кверцетин и дигидрокверцетин в концентрации 160 мкМ ингибируют иницируемый нитритом натрия процесс образования metHb в эритроцитах. Чтобы выяснить, не является ли эффект флавоноидов на NaNO<sub>2</sub>-иницируемое образование метгемоглобина следствием прямого восстановления ими трехвалентного железа metHb, была проведена следующая серия экспериментов. Эритроциты инкубировали в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, в присутствии 10 мМ NaNO<sub>2</sub> в течение 5 мин, затем эритроциты оса-

ждали и подвергали гемолизу. К гемолизатам добавляли исследуемые флавоноиды в концентрации 160 мкМ и инкубировали 60 мин. По полученным данным (табл. 1), в момент добавления флавоноидов в среду инкубации гемолизат содержал  $10,8 \pm 1,8$  мкМ метгемоглобина, количество которого практически не изменилось после инкубации с флавоноидами. Следовательно, рутин, кверцетин и дигидрокверцетин не обладают метгемоглобин-редуктазной активностью и влияют непосредственно на процесс  $\text{NaNO}_2$ -иницируемого метгемоглобинообразования.

Таблица 1

Влияние флавоноидов на процесс восстановления метгемоглобина, образующегося в эритроцитах при действии нитрита натрия

Условия эксперимента	Концентрация метгемоглобина, мкМ	
	сразу после добавления флавоноидов	через 60 мин после добавления флавоноидов
$\text{NaNO}_2$	$10,8 \pm 1,8$	$11,6 \pm 2,1$
+ рутин (160 мкМ)	$11,0 \pm 0,6$	$11,0 \pm 0,3$
+ кверцетин (160 мкМ)	$12,5 \pm 0,3$	$11,9 \pm 1,5$
+ дигидрокверцетин (160 мкМ)	$10,2 \pm 1,5$	$11,3 \pm 1,5$

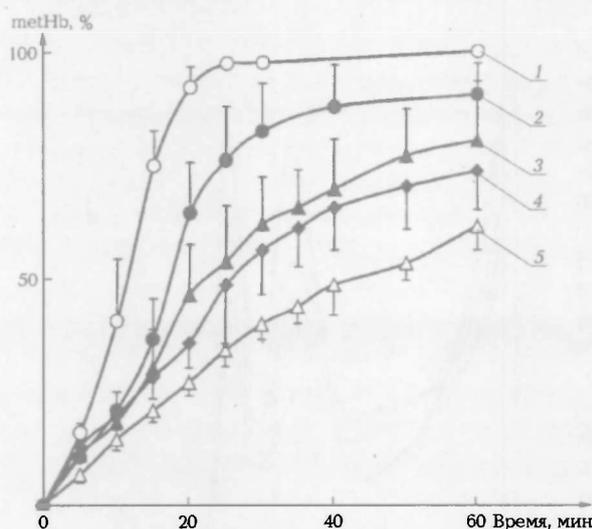


Рис. 2. Кинетика метгемоглобинообразования в лизатах эритроцитов, инициируемого 4,5 мМ  $\text{NaNO}_2$ , без и в присутствии флавоноидов (1 мкМ): 1 – нитрита натрия, 2 – дигидрокверцетина, 3 – рутина, 4 – ЭКГ, 5 – кверцетина

Чтобы количественно оценить способность флавоноидов предотвращать  $\text{NaNO}_2$ -иницируемое образование метгемоглобина и избежать влияния на этот процесс фактора проницаемости флавоноидов через мембрану эритроцитов, дальнейшие исследования были выполнены на лизатах эритроцитов. В этом случае процесс метгемоглобинообразования протекает при значительно более низких концентрациях нитрита натрия (4,5 мМ). На рис. 2 представлены кинетические кривые, характеризующие процесс образования metHb, инициируемого  $\text{NaNO}_2$  в лизатах эритроцитов в течение 60 мин без и в присутствии флавоноидов. Начальный период образования metHb (15 мин) характеризуется линейной зависимостью от времени инкубации, затем скорость реакции снижается и через 25 мин реакция выходит на плато. Полученные данные (см. рис. 2) свидетельствуют о том, что все исследованные флавоноиды оказывают ингибирующее действие на  $\text{NaNO}_2$ -иницируемый процесс метгемоглобинообразования в лизатах эритроцитов. Чтобы количественно оценить эффективность флавоноидов, используя зависимость доза-эффект, графически были определены концентрации флавоноидов (значения  $I_{50}$ ), предотвращающие процесс metHb-образования на 50 % (табл. 2). Согласно полученным данным, по эффективности ингибирования процесса  $\text{NaNO}_2$ -иницируемого образования метгемоглобина в лизатах эритроцитов флавоноиды располагаются следующим образом: кверцетин > ЭКГ > рутин > дигидрокверцетин (см. табл. 2). Тот факт, что флавоноиды, являющиеся эффективными ловушками активных форм кислорода [6–8], способны предотвращать  $\text{NaNO}_2$ -иницируемый процесс метгемоглобинообразования, можно

расценивать как доказательство участия АФК в нитритном окислении ферроформ гемоглобина.

В последующих экспериментах была исследована способность флавоноидов рутина, кверцетина, дигидрокверцетина и эпикатехин галлата инициировать процессы образования метгемоглобина в эритроцитах. Полученные результаты свидетельствуют, что из всех исследованных флавоноидов только кверцетин инициирует этот процесс (табл. 3). Установлено, что при концентрации кверцетина 40 мкМ через 3 ч инкубации окисляется 5,5 % гемоглобина эритроцитов. С увеличением концентрации флавоноида количество образующегося метгемоглобина увеличивается и при концентрации кверцетина 320 мкМ за 3 ч окисляется 42,2 % гемоглобина. По-видимому, инициирование образования метгемоглобина, как и другие проявления прооксидантного действия кверцетина (канцерогенное, цитотоксическое) [16, 17], связано с наличием подвижного атома водорода в положении 3 хромонового фрагмента. Следует обратить внимание на тот факт, что в отношении процессов метгемоглобинообразования антиоксидантные свойства кверцетина проявляются при значительно более низких концентрациях, чем его прооксидантное действие.

Таблица 2

**Эффективность ингибирования ( $I_{50}$ ) флавоноидами  $\text{NaNO}_2$ -инициируемого процесса метгемоглобинообразования в лизатах эритроцитов**

Флавоноиды	Значения $I_{50}$ , мкМ
Кверцетин	0,25 ± 0,11
Эпикатехин галлат	0,43 ± 0,06
Рутин	0,78 ± 0,27
Дигидрокверцетин	1,60 ± 0,61

Таблица 3

**Концентрация метгемоглобина, образующегося при инкубации суспензии эритроцитов с кверцетином\*, мкМ**

Кверцетин, мкМ	Время инкубации, мин		
	60	120	180
40	0,9 ± 0,9	1,2 ± 1,3	2,0 ± 1,4
80	2,0 ± 1,3	2,7 ± 1,4	3,5 ± 1,5
160	5,1 ± 0,5	6,3 ± 0,6	8,4 ± 0,5
320	9,7 ± 0,4	14,7 ± 0,2	15,5 ± 0,6

Примечание. \* Исходная концентрация оксигемоглобина в среде инкубации составила 36,7 ± 0,7 мкМ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что исследованные флавоноиды обладают выраженным антиоксидантным действием при  $\text{NaNO}_2$ -инициируемом образовании метгемоглобина как в эритроцитах, так и гемолизатах. Установлено, что один из исследованных флавоноидов – кверцетин – наряду с антиоксидантным обладает и прооксидантным действием, инициируя процессы окисления гемоглобина в эритроцитах крыс.

1. Шугалей И. В., Лопатина Н. И., Целинский И. В. // Журн. общ. химии. 1986. Т. 56. № 1. С. 192.
2. Kosaka H., Tyuma I. // Biochem. Biophys. Acta. 1982. Vol. 709. № 2. P. 187.
3. Salerno J. C., Martasek P., Roman L. J., Masters B. S. S. // Biochimistry. 1996. Vol. 35. № 24. P. 7626.
4. Tomoda A., Tsujin A., Yoneyama Y. // Biochem. J. 1981. Vol. 193. № 1. P. 169.
5. Ажипа Я. И., Реутов В.П., Каюшин Л. П. // Физиология человека. 1990. Т. 16. № 3. С. 131.
6. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. // Methods Enzymol. 1990. Vol. 186. P. 343.
7. Krol W., Czuba Z. P., Threadgill M. D. et al. // Biochem. Pharmacol. 1995. Vol. 50. P. 1031.
8. Torel J., Cillard J., Cillard P. // Phytochemistry. 1986. Vol. 25. P. 383.
9. Ohshima H., Yoshie Y., Auriol S., Gilibert I. // Free Radic. Biol. Med. 1998. Vol. 25. P. 1057.
10. Костюк В. А., Потапович А. И., Терещенко С. М., Афанасьев И. Б. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 8. С. 1365.

11. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Speransky S. D., Maslova G. T. // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 21. № 4. P. 487.
12. Kostyuk V., Potapovich A. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. Vol. 355. P. 43.
13. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. // Biochem. Int. 1989. Vol. 19. P. 1117.
14. Kampen E. J., Zijlstra W. G. // Advan. Clin. Chem. 1983. Vol. 23. P. 199.
15. Runzel U., Dreybrodt W., Schwitzer-Stenner R. // Biophys. J. 1986. Vol. 49. P. 1069.
16. Jose R., Laires A., Borba H. et al. // Mutagenesis. 1986. Vol. 1. P. 179.
17. Rastogi P.B., Levin R.E. // Environmental Mutagenesis. 1987. Vol. 9. P. 79.

Поступила в редакцию 10.09.2002.

**Алла Ивановна Потапович** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник.  
**Елена Николаевна Стригунова** – младший научный сотрудник.  
**Владимир Андреевич Костюк** – доктор химических наук, заведующий лабораторией.

УДК 611-018.5:576.3.4+576.8.097.3:632.954

А.И. ПОТАПОВИЧ, Е.Н. СТРИГУНОВА, И.К. МАРЧИК, В.А. КОСТЮК

### ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СИММ-ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ НА КЛЕТКИ КРОВИ И ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

The *in vitro* cytotoxic action of s triazine herbicides prometryn and simazine on erythrocytes and cells of immune system (peritoneal macrophages) was studied. These herbicides were found to produce hemolysis of erythrocytes, and prometryn was more strong hemolytical agent than simazine. It was shown that incubation of red blood cells with prometryn as well as simazine does not result in methemoglobin formation. The results of this study demonstrate that peritoneal macrophages more sensitivity to the injury action of s triazine herbicides prometryn and simazine than erythrocytes.

Интенсивная технология выращивания зерновых и овощных продовольственных культур включает применение химических средств защиты растений, среди которых ведущее место занимают гербициды, в частности производные симм-триазина (симазин, прометрин, атразин, пропазин и др.) [1, 2]. Перспективность использования симм-триазиновых гербицидов обусловлена их высокой эффективностью против сорняков, относительно малой токсичностью, слабо выраженными кумулятивными свойствами, незначительными раздражающим и кожно-резорбтивным действием [2, 3]. Вместе с тем вследствие высокой устойчивости в окружающей среде создаются условия для поступления и депонирования гербицидов в организме человека. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется около 500 тыс. случаев отравлений пестицидами, из них около 5 тыс. со смертельным исходом [4]. Известно, что симм-триазиновые гербициды способны вызывать функциональные нарушения нервной системы, печени, почек, изменение морфологического состава крови, оказывать эмбриотоксическое действие, стимулировать развитие аутоиммунных реакций [5, 6]. Поскольку клетки крови и иммунной системы являются одними из первых мишеней действия негативных факторов внешней среды на организм, в данной работе было изучено цитотоксическое действие симм-триазиновых гербицидов прометрина и симазина на эритроциты и перитонеальные макрофаги.

#### Материал и методика

Были использованы симм-триазиновые гербициды: прометрин (50 % смачивающий порошок), действующее вещество 2-метилтио-4,6-бис-(изопропиламино)-симм-триазин; симазин (80 % смачивающий порошок), действующее вещество 2-хлоро-4,6-бис-(этиламино)-симм-триазин.

Эритроциты отделяли центрифугированием при 1500 g в течение 5 мин и трижды отмывали в 0,9 % растворе хлорида натрия. Для оценки гемолитического действия гербицидов использовали 0,3 % суспензию эритроцитов в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4. Исследуемые гербициды вносили в среду инкубации в виде суспензии в дистиллированной воде или этиловом

