

BIOLOGICAL SCIENCES

DIFFERENTIAL EFFECTS OF Fe^{2+} AND Fe^{3+} IONS ON OXIDATIVE STRESS IN ERYTHROCYTES OF INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

Gulieva R.

PhD, Assoc. Prof., senior researcher, MSE Institute of Biophysics Azerbaijan, Baku

Jafarova S.

PhD, Assoc. Prof. Head of laboratory, Ministry of Science and Education, Institute of Biophysics Azerbaijan, Baku

Gasimov A.

student of Ministry of Science and Education of Baku State University, Azerbaijan, Baku

Asgarli T.

student of Ministry of Science and Education, Baku State University, Azerbaijan, Baku

Jafar N.

MD, Mediclab Hospital, Azerbaijan, Baku

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Fe^{2+} И Fe^{3+} НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ЭРИТРОЦИТАХ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Гулиева Р.Т.

к.б.н., доцент, старший научный сотрудник, институт Биофизики Министерство науки и образования, Азербайджан, Баку

Джафарова С.А.

к.б.н., доцент, заведующий лабораторией, институт Биофизики Министерство науки и образования, Азербайджан, Баку

Гасымов А.И.

студент Бакинского Государственного Университета Министерства науки и образования, Азербайджан, Баку

Аскерли Т.Г.

студент Бакинского Государственного Университета Министерства науки и образования, Азербайджан, Баку

Джафар Н.Х.

старший врач больницы Mediclab, Азербайджан, Баку

<https://doi.org/10.5281/zenodo.15397785>

Abstract

This study investigated the effect of iron ions (Fe^{2+} and Fe^{3+}) on lipid peroxidation in vitro in red blood cells from healthy individuals and patients with metabolic syndrome. It was found that Fe^{2+} increased malondialdehyde (MDA) levels in healthy donors but decreased it in patients with metabolic syndrome, demonstrating opposite effects. These results indicate different sensitivities of red blood cells to iron in metabolic disorders and highlight the importance of further studying the role of iron in the development of oxidative stress in this condition.

Аннотация

В данном исследовании изучали влияние ионов железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) на перекисное окисление липидов in vitro в эритроцитах здоровых людей и пациентов с метаболическим синдромом. Обнаружено, что Fe^{2+} увеличивал уровень малонового диальдегида (МДА) у здоровых доноров, но снижал его у пациентов с метаболическим синдромом, демонстрируя противоположные эффекты. Эти результаты указывают на различную чувствительность эритроцитов к воздействию железа при метаболических нарушениях и подчеркивают важность дальнейшего изучения роли железа в развитии оксидативного стресса при данном состоянии.

Keywords: MDA, hemolysis, iron ions, metabolic syndrome

Ключевые слова: МДА, гемолиз, ионы железа, метаболический синдром

Введение

Исследование влияния ионов железа различной степени окисления ($2+$; $3+$) на окислительные процессы в эритроцитах является актуальной задачей в связи с участием железа в большинстве редокс реакций, протекающих в организме [1]. Из-

менение баланса в этих реакциях приводит к различным патологическим состояниям, в том числе и таким как инсулин резистентность [2].

Особую актуальность эта тема приобретает из-за роста распространенности метаболических нарушений на фоне инсулинорезистентности среди подростков [4]. Инсулинорезистентность, как известно, способствует развитию оксидативного

стресса [2, 3, 5], который, в свою очередь, может усугублять повреждение клеток, вызванное избытком свободного железа [6]. Железо, являясь необходимым микроэлементом для синтеза гемоглобина [1, 6,] и обеспечения транспорта кислорода [2, 6], одновременно способно катализировать образование активных форм кислорода (АФК) посредством реакции Фентона [6, 7, 8, 9]. Повышенная продукция АФК приводит к оксидативному стрессу [1, 10], метаболиты которого повреждают клеточные компоненты, включая липиды, белки и ДНК [1]. Эритроциты, как клетки, постоянно контактирующие с кислородом [5] и содержащие большое количество железосвязанный гемоглобин [2, 5], особенно подвержены оксидативному повреждению [1, 5,]. Изучение влияния инкубации эритроцитов с различными ионами железа на окислительные процессы позволит углубить понимание механизмов развития оксидативного стресса в этих клетках при инсулинорезистентности [1, 10, 11] и оценить потенциальные риски, связанные с избытком железа на фоне данного состояния.

Цель данной работы исследование влияния инкубации эритроцитов с различными концентрациями ионов железа ($2+$, $3+$) на такие показатели оксидативного стресса, как уровень перекисного окисления липидов и гемолитическая устойчивость эритроцитов.

Материалы и методы

В работе исследовалась цельная гепаринизированная кровь здоровых доноров ($n=8$) и пациентов с метаболическими нарушениями ($n=11$) (полученная с информированного согласия и в соответствии с этическими нормами). Для отделения плазмы и лейкоцитов кровь центрифугировали 10 минут при 1500 g, затем эритроциты трижды отмывали в 0,15 М NaCl с последующим центрифугированием. Эритроцитарную суспензию инкубировали с различными концентрациями $FeCl_2$ и $FeCl_3$ (12- 50 мкМ) 0,01М Трис-HCl буфере (pH 7,4) в течение 60 минут при $37^{\circ}C$. Эритроциты без инкубации с ионами железа составляли контрольную группу. Реакцию останавливали 17% ТХУ. После добавления к супернатанту 8 г/л ТБК пробы инкубировали

на водяной бане 10 минут при $100^{\circ}C$ в течение. Затем пробы охлаждали в ледяной бане $4^{\circ}C$ и центрифугировали 6000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-2700 UV при 540 нм. Концентрацию МДА рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5$ [12]. Белок определяли спектрофотометрически [13]. Устойчивость эритроцитов к осмотическому гемолизу проводили по методу, описанному в [14]. Данные представляли, как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Сравнение между группами проводят с использованием t-теста Стьюдента Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Исследование показало, что эритроциты лиц с метаболическим синдромом (ЛМС) характеризуются меньшей устойчивостью к действию окислительного стресса, вызванного повышенными концентрациями ионов железа (на 13%) по сравнению с эритроцитами здоровых доноров (ЗД) (рис. 1). На рисунке 1 показана концентрация малонового диальдегида (МДА), маркера перекисного окисления липидов, у ЗД и ЛМС в контрольных условиях и после воздействия в течение 60 минут при $37^{\circ}C$ 12 мкМ или 50 мкМ двухвалентного железа (Fe^{2+}).

В контрольной группе исходные уровни МДА у ЗД определялись немного выше (12%) чем у ЛМС, что указывало на возможную активацию на имеющийся окислительный стресс в этой группе антиоксидантной системы защиты. У ЗД уровни МДА снижались при инкубации с Fe^{2+} на 16 % при 12 мкМ Fe^{2+} и 27% при 50 мкМ Fe^{2+} соответственно. В то время как, у ЛМС воздействие Fe^{2+} приводило к значительному повышению уровней МДА. При 12 мкМ Fe^{2+} концентрация МДА возросла на 25%, а при 50 мкМ Fe^{2+} она достигла наивысшего наблюдаемого уровня (на 36%).

Полученные данные показывают, что, хотя воздействие Fe^{2+} , по-видимому, снижало уровни МДА у ЗД в этих экспериментальных условиях, оно значительно усиливало перекисное окисление липидов у ЛМС в зависимости от дозы.

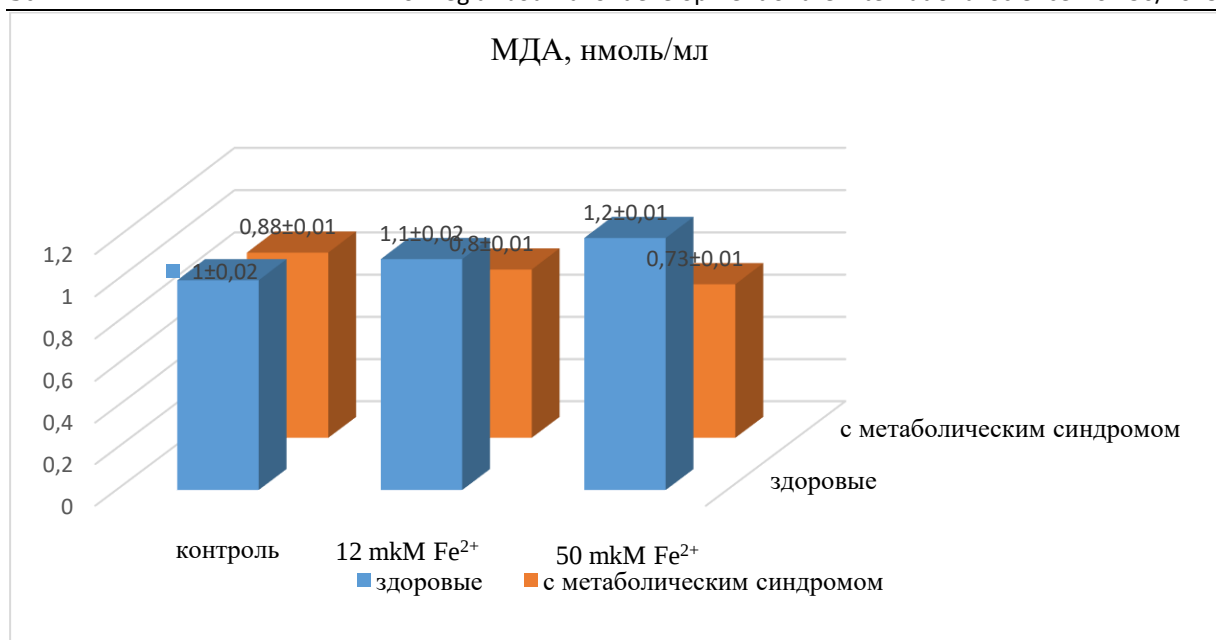


Рис.1 Накопление ТБК-активных продуктов в эритроцитах, инкубированных с 12мкМ и 50 мкМ ионами Fe²⁺ и Fe³⁺ течение 60 минут при 37°C в 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4

На рисунке 2 представлены результаты действия ионов трехвалентного железа (Fe³⁺) течение 60 минут при 37°C на изменение содержания МДА у ЗД и ЛМС в контрольных условиях и после инкубации с 12 мкмоль или 50 мкмоль. Как отмечалось выше, в контрольной группе базальный уровень МДА у ЗД был несколько выше, чем у ЛМС (12,5%).

Инкубация эритроцитов с ионами Fe³⁺ вызывала различные изменения в зависимости от группы. У ЗД добавление 12 мкмоль Fe³⁺ приводило к увеличению концентрации МДА на 9%. Однако при концентрации Fe³⁺ 50 мкмоль уровень МДА у ЗД снижался до 0,95 ± 0,01 нмоль/мл, что было сопоставимо с их контрольными значениями.

Напротив, у ЛМС инкубация с 12 мкмоль Fe³⁺ вызывала снижение уровня МДА на 20%. Тогда как при увеличении концентрации Fe³⁺ до 50 мкмоль содержание МДА у данной группы повышалось на 4%. Полученные результаты указывают на сложное взаимодействие между состоянием здоровья и воздействием различных концентраций Fe³⁺ на уровень перекисного окисления липидов. Тем не менее, внутри этой группы отмечалось увеличение концентрации МДА на 4% по сравнению с контролем (инкубация без ионов железа), что может указывать на некоторую активацию ПОЛ под воздействием Fe³⁺.

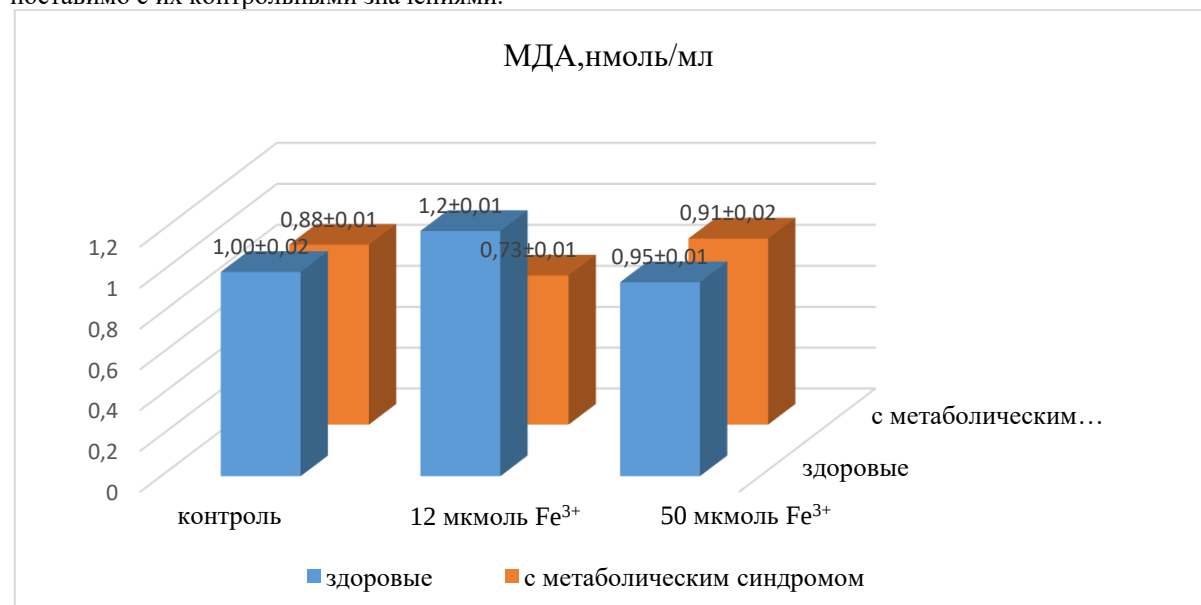


Рис.2 Накопление ТБК-активных продуктов в эритроцитах, инкубированных с 12 мкМ и 50 мкМ ионами Fe³⁺ в течение 60 мин в 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4

Представленные на рисунке 3 данные по накоплению МДА у ЗД и ЛМС в контрольных условиях, а также после инкубации с 50 мкмоль двухвалентного (Fe^{2+}) или трехвалентного (Fe^{3+}) железа, позволяют сделать следующие выводы: инкубация с 50 мкмоль Fe^{2+} приводила к разнонаправленным изменениям: у ЗД наблюдалось значительное увеличение содержания МДА до 26%, в то время как у ЛМС уровень МДА снижался до 36%. При действии 50 мкмоль Fe^{3+} уровень МДА у ЗД спускался

на 5%, что незначительно отличалось от их контрольных значений, но было ниже, чем при действии ионов Fe^{2+} . У ЛМС ионы Fe^{3+} вызывал повышение МДА на 25%, что было выше, чем при воздействии Fe^{2+} на эту группу, и приближалось к их контрольным показателям.

Таким образом, полученные данные демонстрируют различное влияние ионов железа в зависимости от их валентного состояния и исходного статуса (здоровый или метаболический синдром) на интенсивность перекисного окисления липидов.

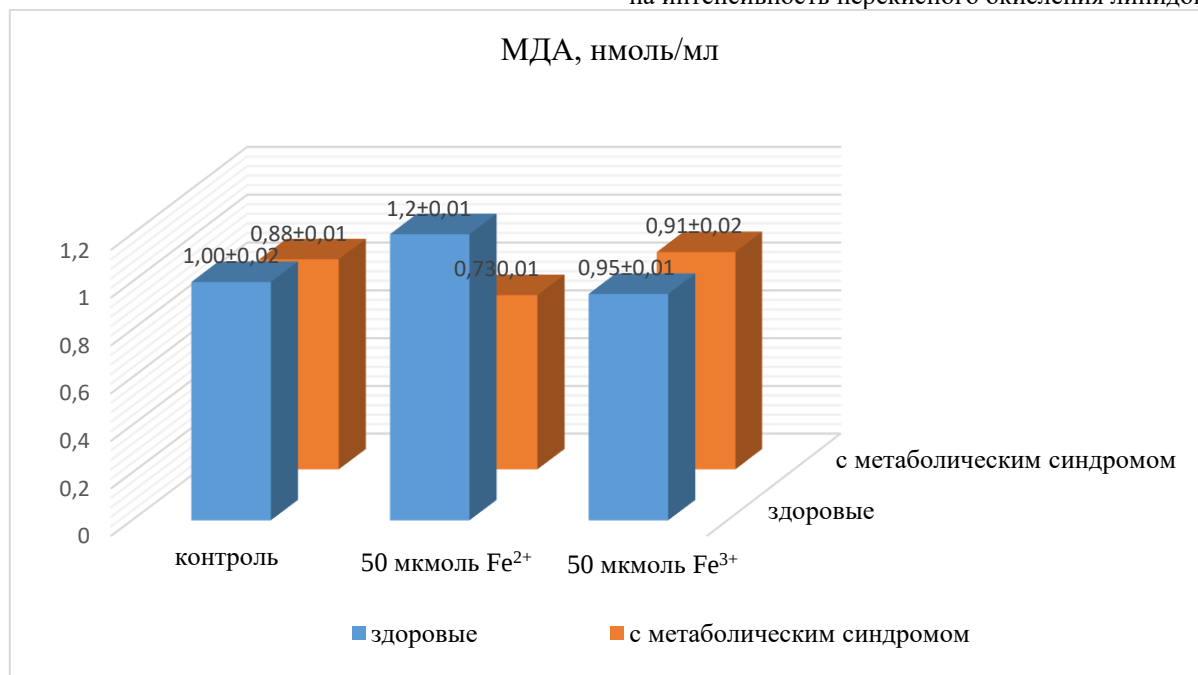


Рис.3 Сравнение содержания МДА в эритроцитах здоровых доноров и с метаболическим синдромом, инкубированных с ионами Fe^{3+} концентрацией 50 мкМ в течение 60 мин в 10 мМ Трис- HCl , pH 7,4

Представленные на рис. 4 данные по устойчивости эритроцитов ЗД и ЛМС к осмотическому гемолизу после инкубации в течение 60 минут при 37°C в 10 мМ Трис- HCl буфере (150 мМ NaCl , pH 7,4) с 50 мкМ ионами Fe^{2+} и Fe^{3+} указывают на то, что в контроле (без добавления ионов железа) в обеих группах процент осмотического гемолиза сопоставим и составляет приблизительно 1.85% для эритроцитов ЛМС и 1.93% для эритроцитов ЗД.

При инкубации с 50 мкМ Fe^{2+} наблюдалось выраженное увеличение процента гемолиза в обеих исследуемых группах. У ЛМС гемолиз составил около 3.63%, а у ЗД – около 4.08%, что демонстри-

ровало значительное снижение устойчивости мембран эритроцитов под действием двухвалентного железа.

Действие 50 мкМ Fe^{3+} также вызывало увеличение гемолиза по сравнению с контролем, однако в меньшей степени, чем Fe^{2+} . У ЛМС процент гемолиза составил около 2.77%, а у ЗД – около 3.05%.

Таким образом, ионы железа, особенно в двухвалентной форме Fe^{2+} , снижают устойчивость эритроцитов к осмотическому гемолизу как у здоровых доноров, так и у пациентов с метаболическим синдромом, причем Fe^{2+} оказывает более выраженное дестабилизирующее действие на мембраны эритроцитов.

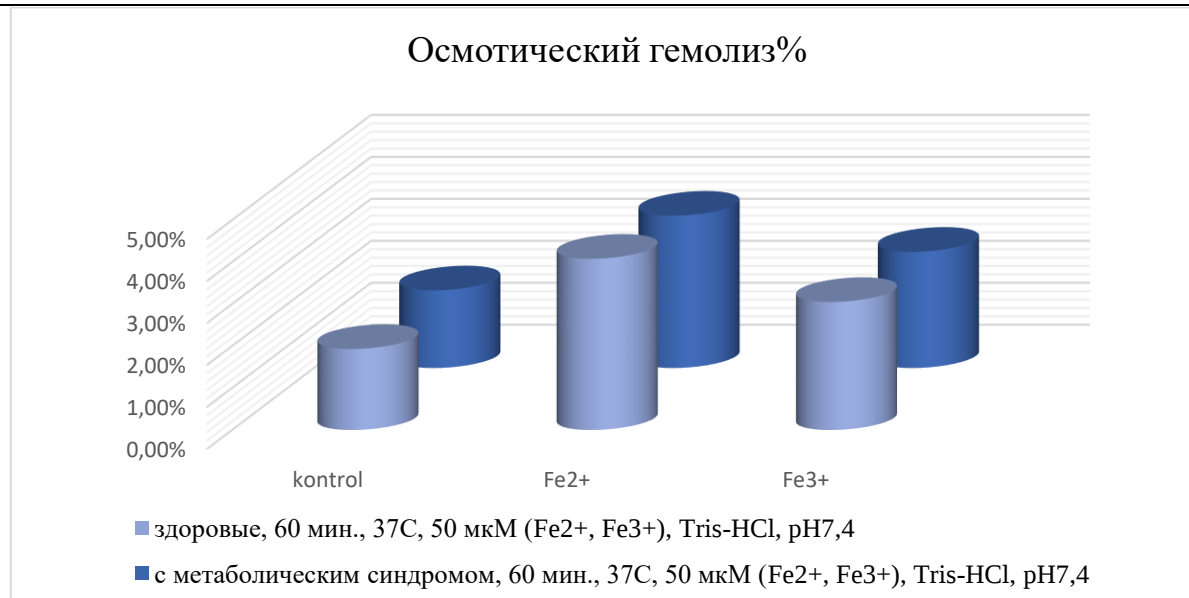


Рис 4. Устойчивость к осмотическому гемолизу при инкубации с 50 мкМ ионами Fe²⁺ и Fe³⁺ в течение 60 мин в 10 мМ трис-HCl и 150 мМ NaCl, pH 7,4.

Разнонаправленные эффекты, особенно снижение МДА в некоторых группах, требуют глубокого обсуждения возможных биохимических и физиологических механизмов. Это могут быть различия в антиоксидантных системах, особенности метаболизма железа, компенсаторные реакции.

Полученные результаты позволяют оценить вклад ионов железа в развитие оксидативного повреждения эритроцитов при инсулинорезистентности и могут быть полезны для разработки новых стратегий профилактики и лечения заболеваний, связанных с оксидативным стрессом при данном состоянии.

Список литературы:

- Chirico, E. N., Pialoux, V., & Rabier, D. (2014). Review on iron overload. *Biochimie*, 115, 230–236.
- Roberts, C. K., & Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life sciences*, 84(21–22), 705–712.
- Lang, F., Gulbins, E., & Lang, P. A. (2019). Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. *Frontiers in Physiology*, 10, (2)
- Houstis, N., Rosen, E. D., & Lander, E. S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 440(7086), 944–948.
- Folli, F., Corradi, D., Fanti, P., Davalli, A. M., Paez, A., Giaccari, A., & Perego, L. (2011). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Current diabetes reviews*, 7(5), 313–324.
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87.
- Lucesoli, F., Caligiuri, A., Roberti, M. F., Perrotta, C., & Fracasso, F. (2013). Hyperglycemia-induced oxidative stress and erythrocyte damage. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 3443–3454
- Simcox, J. A., & McClain, D. A. (2013). Iron and diabetes risk. *Cell metabolism*, 17(3), 329–341.
- Repetto, M. G., Semprine, J., Boveris, A. D. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: *Lipid Peroxidation*. Ed by Catala A. InTech, Rijeka, Croatia.
- Mohanty, J. G., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2014). Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in physiology*, 5, 84.
- Yu Luo, Dan Luo, Maojun Li, Binzhi Tang (2024) Insulin Resistance in Pediatric Obesity: From Mechanisms to Treatment Strategies, Review Article, *Pediatric Diabetes*, 2024, 2298306, 22 pages, 2024. <https://doi.org/10.1155/2024/2298306>
- Андреева Л.И., Кожемякина А.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // *Лаб. дело*. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
- Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии/М., 1980, 272 с.
- Lauren K. Goodhead and Frances M. MacMillan. Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Advances in Physiology Education* 201741:2, p. 298–305