

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА IN VITRO НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ И СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА ПТИЦ И КЛАССА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Никольская В.А., Черет аев И.В.

Проведены исследования эритроцитов и сыворотки крови представителей класса птиц и класса млекопитающих в условиях окислительного стресса. Установлены различия в содержании продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови данных представителей, имеющие разнонаправленный характер и усиливающиеся под влиянием среды Фентона. Отмечено повышение содержания молекул средней массы в гемолизате эритроцитов и сыворотке крови в условиях инициации окислительных реакций *in vitro*.

Ключевые слова: окислительный стресс, эритроциты, сыворотка, млекопитающие, птицы, среда Фентона.

ВВЕДЕНИЕ

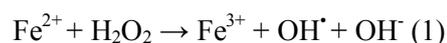
В настоящее время большое внимание уделяется проблеме влияния окислительного стресса [1], характеризующемся повышенным содержанием свободных радикалов кислорода [1 – 4]. Однако, комплексного исследования показателей, отражающих изменения в организме различных представителей позвоночных при данном процессе, не проводилось. Общеизвестно, что зрелые эритроциты млекопитающих, являющиеся постклеточными структурами, не содержат ядро [5]. Эволюционные изменения, обусловленные потерей ядра, могли привести к изменению реакции на различные стрессы, в том числе окислительный.

Таким образом, целью исследования явилось изучение воздействия модели окислительного стресса (среды Фентона) на отдельные биохимические показатели эритроцитов и сыворотки крови представителей *Galus galus* и *Sus scrofa*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили сыворотка крови и гемолизат эритроцитов курицы (*Galus galus*) и свиньи (*Sus scrofa*). Гемолизат эритроцитов получали по методу Д. Драбкина [5]. Содержание продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови и гемолизате эритроцитов определяли по методу Е. Е. Дубининой и др. [7]. Содержание молекул средней массы в сыворотке крови определяли по методу Н. И. Габриэлян и др. [8, 9] В качестве модели воздействия окислительного стресса использовали среду Фентона, содержащую раствор 10 мМ сернокислого железа и 3 мМ перекиси водорода. Инкубацию осуществляли в течение 15 минут при 37 °С.

Среда Фентона является источником свободных радикалов кислорода по реакции:





РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исходном состоянии (до воздействия окислительного стресса) в сыворотке крови показаны достоверные различия ($p < 0,01$) в содержании продуктов окислительной модификации белков крови (табл. 1) у *Sus scrofa* и *Galus galus*: уровень продуктов окислительной модификации, регистрируемых при длинах волн 356 и 370 нм, ниже, а при 430 и 530 нм – выше.

Таблица 1.

Содержание продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови (ед. опт. плотности) *Sus scrofa* и *Galus galus* ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Исследуемый материал	Длина волны, нм	<i>Sus scrofa</i> n=9	<i>Galus galus</i> n=9
сыворотка до инкубации	356	0,131 ± 0,002	0,149 ± 0,003
	370	0,154 ± 0,003	0,181 ± 0,006
сыворотка после инкубации	356	0,103 ± 0,003*	0,151 ± 0,004
	370	0,126 ± 0,005*	0,189 ± 0,005
сыворотка до инкубации	430	0,138 ± 0,002	0,091 ± 0,002
	530	0,033 ± 0,002	0,027 ± 0,002
сыворотка после инкубации	430	0,162 ± 0,005*	0,072 ± 0,001*
	530	0,034 ± 0,002	0,030 ± 0,002*

Примечание: * – достоверное изменение продуктов окислительной модификации в сыворотке при воздействии среды Фентона по сравнению с исходным состоянием ($p < 0,01$)

После инициации окислительных реакций *in vitro* в сыворотке *Sus scrofa* (λ регистрации 356 и 370 нм) содержание продуктов окислительной модификации снижается по сравнению с исходным состоянием, при 430 нм – повышается. При длине волны 530 нм наблюдается тенденция к увеличению данного показателя. У *Galus galus* в сыворотке крови после инкубации показана тенденция к увеличению содержания продуктов окислительной модификации белков, определяемых при длинах волн 356 и 370 нм. При длинах волн регистрации 430 и 530 нм наблюдаются достоверные изменения – уменьшение и увеличение, соответственно. Таким образом, существующие различия данного показателя в сыворотке крови *Sus scrofa* и *Galus galus* усиливаются после инкубации. Отличия в изменении продуктов окислительной модификации белков при длине 430 нм у *Sus scrofa* и *Galus galus*, могут быть связаны с взаимным переходом основных альдегидных форм динитрофенилгидразонов в кетонные, и наоборот. Исходно высокий показатель у *Galus galus* продуктов окислительной модификации, определяемых при других длинах волн, возможно, обусловлен более интенсивным метаболизмом, как результирующей процесса адаптации. Одним из механизмов приспособления к условиям среды обитания является усиление обновления пула белков. Различные уровни окисления в среде Фентона белков сыворотки крови у двух представителей

разных классов могут являться подтверждением данного предположения. Так у *Sus scrofa* при длинах волн 356 и 370 нм уровень продуктов окислительной модификации после инкубации повышается на 31,3 и 18,2%, соответственно, в то время как у *Galus galus* изменения данного показателя не превышают 5%.

После инкубации в среде Фентона наблюдается увеличение содержания молекул средней массы (МСМ) в сыворотке и гемолизате эритроцитов *Sus scrofa* и *Galus galus* при всех длинах волн на разных уровнях значимости (табл. 2), за исключением данного показателя в сыворотке крови *Sus scrofa* при 280 нм. С учётом биохимического состава плазмы основной вклад в оптическое поглощение при 280 нм вносят только ароматические аминокислоты, находящиеся в свободном виде и в составе пептидов.

Таблица 2.

Содержание молекул средней массы в сыворотке крови и гемолизате эритроцитов (ед. опт. плотности) *Sus scrofa* и *Galus galus* до и после инкубации в среде Фентона ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Исследуемый материал	Длина волны, нм	До инкубации в среде Фентона	После инкубации в среде Фентона
сыворотка <i>Sus scrofa</i> n=9	254	0,790 ± 0,002	0,920 ± 0,003*
	272	0,195 ± 0,004	0,251 ± 0,002**
	280	0,167 ± 0,004	0,153 ± 0,008
сыворотка <i>Galus galus</i> n=9	254	0,384 ± 0,007	0,851 ± 0,005**
	272	0,415 ± 0,004	0,881 ± 0,002**
	280	0,458 ± 0,003	0,885 ± 0,003**
гемолизат эритроцитов <i>Sus scrofa</i> n=11	254	0,604 ± 0,002	0,703 ± 0,001**
	272	0,171 ± 0,001	0,203 ± 0,001**
	280	0,078 ± 0,001	0,092 ± 0,002**
гемолизат эритроцитов <i>Galus galus</i> n=11	254	0,743 ± 0,005	0,905 ± 0,002**
	272	0,690 ± 0,004	0,811 ± 0,001**
	280	0,185 ± 0,003	0,189 ± 0,002

Примечание: * – достоверные изменения показателя после воздействия среды Фентона по сравнению с исходным состоянием ($p < 0,05$), ** – достоверные изменения показателя после воздействия среды Фентона по сравнению с исходным состоянием ($p < 0,01$)

Кроме того, интенсивность поглощения при 280 нм падает в ряду триптофан – тирозин – фенилаланин соответственно в 4 и 28 раз. Таким образом, показатель поглощения при 280 нм в основном определяется суммарным содержанием только двух хромофоров – триптофана и тирозина. Из крови наблюдается быстрая элиминация свободного тирозина, высвобождающегося при протеолизе пептидов, что, очевидно, объясняется жёстким контролем над его концентрацией, которая обеспечивается активной работой тирозинаминотрансферазы [10]. В литературе показано антиоксидантное действие среднемолекулярных олигопептидов [11]. Следует предположить, что тенденция к снижению молекул средней массы при 280 нм обусловлена уменьшением свободного триптофана и триптофансодержащих

среднемолекулярных олигопептидов. При окислении олигопептидов и белков гидроксильным радикалом и синглетным кислородом происходит фрагментация белков. Одновременно происходит разрушение триптофана. Триптофан и тирозин подвергаются окислительным превращениям, которые сопровождаются модификацией аминокислотных остатков, образованием внутри- или межмолекулярных сшивок между полипептидными цепями, снижением уровня триптофана и значительной продукцией битирозинфенола [11].

В исходном состоянии отмечено более высокое содержание аденозинтрифосфата (АТФ) в гемолизате эритроцитов *Galus galus* (на 36,5%) по сравнению с *Sus scrofa*. После инкубации наблюдается достоверное снижение данного показателя в гемолизате эритроцитов обоих представителей (табл. 3).

Таблица 3.

Содержание АТФ в гемолизате эритроцитов (мг%) *Sus scrofa* и *Galus galus* ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Исследуемый материал	До инкубации в среде Фентона	После инкубации в среде Фентона
гемолизат эритроцитов <i>Sus scrofa</i> n =20	0,74 ± 0,04	0,61 ± 0,05*
гемолизат эритроцитов <i>Galus galus</i> n =14	1,01 ± 0,05	0,79 ± 0,07*

Примечание: * – достоверные изменения содержания АТФ в гемолизате эритроцитов при воздействии среды Фентона по сравнению с исходным состоянием (p<0,05)

ВЫВОДЫ

1. Выявлены различия в реакции белков сыворотки крови на окислительный стресс у представителей млекопитающих и птиц. У *Sus scrofa* в сыворотке крови после инициации окислительных реакций *in vitro* достоверно увеличивается содержание продуктов окислительной модификации белков, регистрируемых при длине волны 430 нм, а у *Galus galus*, наоборот, – достоверно уменьшается. Отмечено снижение продуктов окислительной модификации окисления белков, определяемых при длине волны 370 нм, в сыворотке крови *Sus scrofa*.
2. Наблюдается однонаправленный характер воздействия окислительного стресса на уровень молекул средней массы в сыворотке крови и эритроцитах *Sus scrofa* и *Galus galus*, выражающийся их достоверным увеличением. Более значительные изменения данного показателя (в 2–2,5 раза) выявлены в сыворотке крови *Galus galus*.
3. Отмечено более высокое содержание АТФ в гемолизате эритроцитов у *Galus galus* в исходном состоянии и под влиянием окислительного стресса по сравнению с *Sus scrofa*, что может быть обусловлено интенсивно протекающими в эритроцитах процессами окислительного фосфорилирования.

Список литературы

1. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т.113. – Вып.1. – С. 71-81.

2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Вып. 12. – С. 13-19.
3. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Вып. 4. – С. 21-28.
4. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т. 113. – Вып. 1. – С. 107-122.
5. Биологический энциклопедический словарь // Под ред. Гилярова М.С. – М.: Советская энциклопедия, 1981. – 831 с.
6. Drabkin D. Asimplified technique for large crystallisation of haemoglobin in the enistalline // Fnn N. S. Acad. Sci. – 1964 – Vol. 121. – № 11 – P. 404-407
7. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41. – Вып. 1. – С. 24-25.
8. Габриэлян Н.И., Левицкий Э.Р., Дмитриев А.А. и др. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях // Метод. рекоменд. – М., 1985. – 18 с.
9. Габриэлян Н.И., Левицкий Э.Р., Щербанева О.И. и др. // Тер. арх. – 1983. – Вып. 6. – С. 76-78.
10. Гаврилов В.Б., Лобко Н.Ф., Конев С.В. Определение тирозин- и триптофансодержащих пептидов в плазме крови по поглощению в УФ-области спектра // Клин. лаб. диагн. – 2004. – Вып. 3. – С. 12-16.
11. Аксёнова В.М., Старкова А.В. Диагностическая ценность определения уровня веществ средней молекулярной массы в плазме новорождённых детей, перенёсших внутриутробную гипоксию // Перм. мед. журнал. – 1998. Т. 15. – С. 25-28.
12. Дубинина Е.Е., Шугалай И.В. Окислительная модификация белков // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т. 113. – Вып. 1. – С. 71-81.

Нікольська В.О., Черет аєв І.В. Вплив окислювального стресу *in vitro* на біохімічні показники еритроцитів і сироватки крові представників класу птахів та класу ссавців // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2008. – Т. 21 (60). – № 2. – С. 92-96.

Проведено дослідження змін показників еритроцитів і сироватки крові представників класу птахів (*Galus galus*) та класу ссавців (*Sus scrofa*) в умовах окислювального стресу. Установлено розходження в змісті продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові даних представників, які мають різносторонній характер і підсилюються під впливом середовища Фентона. Відзначене підвищення молекул середньої маси в гемолізаті еритроцитів і сироватці крові, а також аденозинтрифосфата у гемолізаті еритроцитів в умовах інкубації окислювальних процесів *in vitro*.

Ключові слова: окислювальний стрес, аденозинтрифосфат, еритроцити, сироватка, ссавці, птахи, середовище Фентона.

Nikolskaya V.A., Cheretayev I.V. Influence of oxidizing stress *in vitro* on biochemical parameters of erythrocytes and whey of blood of representatives of classes of birds and mammals // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2008. – V. 21 (60). – № 2. – P. 92-96.

The investigations erythrocytes and whey indexes of blood by the influence oxidizing stress of representatives birds (*Galus galus*) and mammals (*Sus scrofa*) have been carried out. Distinctions in contents of oxidizing modification of proteins in the blood's whey of these representatives are determined. They have different directed character increasing under the influence of Fenton solution. The increase middle mass molecules is found out in gemolizate erythrocytes and the whey after the incubation period in the Fenton's solution.

Keywords: oxidizing stress, erythrocytes, whey, birds, mammals.

Пост упила в редакцію 26.03.2008 г.
