

УДК 577.121:547

**ОБРАЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРИКИСНОГО
ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ПРОДУКТОВ РАСПАДА БЕЛКОВ В
ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ**

Коношенко С.В., Долгов М.А.

*Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: konoshenko@crimea.edu*

При инкубации эритроцитов человека в среде Фентона в гемолизатах эритроцитов увеличивается содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов и, вместе с этим, снижается содержание среднемолекулярных олигопептидов (СМО).

Повышение температуры способствует интенсификации в эритроцитах окислительных процессов с участием активных форм кислорода.

Ключевые слова: окислительный стресс, среда Фентона, активные формы кислорода, эритроциты, вторичные продукты перекисного окисления липидов, среднемолекулярные олигопептиды..

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы существенно возрос интерес исследователей к проблеме образования и действия в живых организмах активных форм кислорода (АФК), и их роли в развитии многих заболеваний и различных патологических состояний [1-4]. Несмотря на всю широту исследований в этом аспекте, многие вопросы остаются невыясненными, в частности, вопрос о влиянии температуры на процесс генерирования АФК и развитие окислительного стресса

Одной из мишеней для свободных радикалов в организме человека и животных являются эритроциты. Представляет как научный, так и практический интерес изучение метаболического и функционального состояния эритроцитов в условиях усиленного генерирования АФК, приводящего к нарушению прооксидантно – антиоксидантного равновесия и развитию "окислительного стресса" [5-7].

В свете этого, целью настоящей работы явилось изучение интенсивности образования вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-активных компонентов), а также продуктов неполного распада белков – среднемолекулярных олигопептидов (СМО), в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* с участием двухвалентного железа и перекиси водорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты доноров станции переливания крови г. Симферополя.

С целью моделирования "окислительного стресса" эритроциты инкубировали в среде Фентона, содержащей 10 мМ FeSO₄·7H₂O и 3,0 мМ H₂O₂ [5, 6] в течение 2-х часов при температуре 4°C и 37°C. Для сравнения результатов использовали два контроля: эритроциты, инкубируемые с физиологическим раствором при 4°C и 37°C.

Среду Фентона готовили на физиологическом растворе и добавляли к эритроцитарной массе в соотношении 1:1. Сущностью реакции Фентона является окисление Fe²⁺ в присутствии H₂O₂:



Образование ·OH инициирует цепные реакции генерирования других АФК, в частности, супероксиданиона – O₂⁻ [5, 6].

После инкубации эритроциты отделяли центрифугированием и подвергали гемолизу [8].

В гемолизатах эритроцитов определяли содержание ТБК-активных продуктов пероксидации липидов (ПОЛ) [9] и продуктов неполного распада белков, являющихся эндотоксинами [1].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, при инкубации эритроцитов в среде Фентона наблюдается достоверное увеличение содержания в гемолизате эритроцитов ТБК-активных продуктов: при 4°C на 42% (λ = 535) и 48% (λ = 560), при 37°C – на 54% и 40%, соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Содержание ТБК-активных компонентов в гемолизатах эритроцитов (ед. опт. пл.) в условиях инициации окислительных реакций *in vitro* ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Объект исследования	λ = 535 нм	λ = 560 нм
Контроль 1 (эритроциты, инкубируемые без среды Фентона при 4°C)	0,273 ± 0,006	0,204 ± 0,004
Контроль 2 (эритроциты, инкубируемые без среды Фентона при 37°C)	0,322 ± 0,009	0,235 ± 0,008
Эритроциты, инкубируемые в среде Фентона при 4°C	0,387 ± 0,017*	0,302 ± 0,021*
Эритроциты, инкубируемые в среде Фентона при 37°C	0,496 ± 0,029**	0,330 ± 0,019**

Примечание: * – достоверность различий показателя эритроцитов, инкубируемых в среде Фентона при 4°C, по сравнению с контролем 1 (p < 0,01), ** – достоверность различий показателя эритроцитов, инкубируемых в среде Фентона при 37°C, по сравнению с контролем 2 (p < 0,01).

Помимо этого, наблюдаются достоверные различия в содержании продуктов пероксидации липидов между контрольными образцами эритроцитов, инкубируемых в отсутствие среды Фентона при 4°C и 37°C. При температуре 37°C содержание ТБК-активных компонентов в гемолизатах эритроцитов увеличивается на 18% и 15%, соответственно.

В целом, такой характер изменения содержания ТБК-активных продуктов свидетельствует об интенсификации процессов перекисного окисления липидов в эритроцитах под воздействием среды Фентона, усиливаемых с повышением температуры.

При изучении содержания СМО в гемолизатах эритроцитов наблюдается обратная направленность изменений соответствующего показателя (табл. 2).

Таблица 2

Содержание СМО в гемолизатах эритроцитов (ед. опт. пл.) в условиях инициации окислительных реакций *in vitro* ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Объект исследования	$\lambda = 254$ нм	$\lambda = 275$ нм	$\lambda = 280$ нм
Контроль 1 (эритроциты, инкубируемые без среды Фентона при 4°C)	2,339 ± 0,035	0,883 ± 0,027	0,587 ± 0,031
Контроль 2 (эритроциты, инкубируемые без среды Фентона при 37°C)	2,204 ± 0,030	0,728 ± 0,026	0,478 ± 0,033
Эритроциты, инкубируемые в среде Фентона при 4°C	2,006 ± 0,075*	0,639 ± 0,054*	0,359 ± 0,030*
Эритроциты, инкубируемые в среде Фентона при 37°C	1,450 ± 0,051**	0,483 ± 0,044**	0,286 ± 0,042**

Примечание: * – достоверность различий показателя эритроцитов, инкубируемых в среде Фентона при 4°C, по сравнению с контролем 1 ($p < 0,01$), ** – достоверность различий показателя эритроцитов, инкубируемых в среде Фентона при 37°C, по сравнению с контролем 2 ($p < 0,01$).

В гемолизате эритроцитов, инкубируемых в среде Фентона при температуре 4°C, уровень СМО уменьшается, в среднем, на 27%, а при температуре 37°C – на 61%. При сравнении контрольных образцов отмечено достоверное снижение оптической плотности при 37°C, в среднем, на 12%. Снижение данного показателя может быть следствием агрегации СМО, или частичного разрушения ароматических колец фенилаланина, триптофана и тирозина под действием АФК.

Как и в случае ТБК-активных продуктов, с повышением температуры наблюдаются более значительные изменения уровня молекул средней массы в гемолизатах до инкубации эритроцитов в среде Фентона и после инкубации. Влияние температурного фактора также хорошо прослеживается при сравнительной оценке соотношения уровня ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов и уровня СМО (рис. 1.).

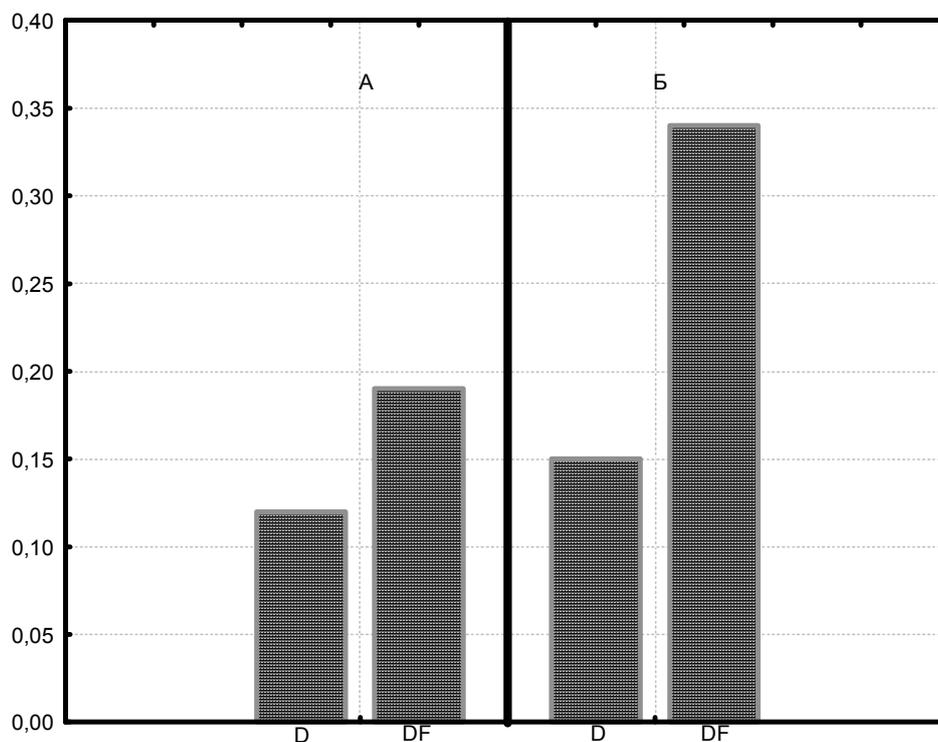


Рис.1. Соотношение содержания ТБК-активных продуктов ПОЛ и СМО в гемолизате эритроцитов доноров до (D) и после инкубации в эритроцитов в среде Фентона (DF) при 4°C (A) и 37°C (B).

Прослеживается чётко выраженная корреляция ($r = -0,98$) в изменениях содержания ТБК-активных продуктов и уровня СМО под воздействием среды Фентона, что свидетельствует о взаимосвязи деструктивных процессов, в которые вовлекаются белки и липиды, в условиях повышенного образования свободных радикалов.

ВЫВОДЫ

1. При инкубации эритроцитов практически здоровых людей в среде Фентона, генерирующей АФК, наблюдается активация процессов пероксидации липидов, о чём свидетельствует увеличение содержания ТБК-активных продуктов.
2. Изменение содержания среднемoleкулярных олигопептидов (продуктов неполного распада белков) в условиях инициации окислительных реакций в эритроцитах свидетельствует либо о разрушении ароматических колец аминокислот, являющихся хромофорами в составе продуктов распада, либо об агрегации СМО в макромолекулярные комплексы с последующим их осаждением и удалением из регистрируемой фракции.
3. Повышение температуры способствует интенсификации окислительных процессов в эритроцитах, осуществляемых с участием АФК.

Список литературы

1. Габриэлян Н.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей / Н.И. Габриэлян, В.И. Липатова // Лаб. дело. – 1984, № 3. – С. 138–400.
2. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, её роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина // Укр. биохим. журн. – 2008. – Т.80, №6 – С. 18–25.
3. Окислительная модификация белков плазмы крови у пожилых людей с сосудистой деменцией / Е.Е. Дубинина, П.В. Коновалов, И.Б. Солитернова [и др.] // Укр. биохим. журн. – 2001. – Т.73, № 1. – С. 125–132.
4. Казакова В.В. Окислительная модификация и изменения внутримолекулярной гидрофобности гемоглобина А при инкубации эритроцитов человека в среде Фентона / В.В. Казакова, Н.М. Ёлкина // Укр. биохим. журн. – 2007. – Т. 79, №4. – С. 34–38.
5. Содержание метгемоглобина и фосфоенолпирувата в эритроцитах в условиях инициации окислительных реакций с участием активных форм кислорода / Н.М. Ёлкина, В.В. Казакова, С.В. Коношенко [и др.] // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. – 2009. – вып. 19 – С. 168–172.
6. Ёлкина Н.М. Влияние активных форм кислорода на метаболическое и функциональное состояние эритроцитов / Н.М. Ёлкина // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. 2006. – вып. 16 – С. 193–196.
7. Калиман П.А. Цикл глюкоза – жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта / П.А. Калиман, С.М. Орхименко // Укр. биохим. журнал. – 2005. – Т.77, №2. – С. 154–158.
8. Drabkin D. A simplified technique for large crystallisation of haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Acad. Sci. – 1964 – Vol. 121, № 11 – P. 404–407.
9. Ohkava H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkava, N. Ohishi, K. Yagi // Analit. Biochem. – 1979. – Vol. 95, No 2. – P. 351–358.

Коношенко С.В. Утворення вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів і продуктів розпаду білків в еритроцитах людини за умов моделювання окиснюваного стресу при різній температурі / С.В. Коношенко, М.О. Долгов // Вчені записки Таврійського національного університету ім.В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 4. – С. 125-130.

При інкубації еритроцитів людини у середовищі Фентона в гемолізатах еритроцитів збільшується вміст вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів і, разом з тим, знижується вміст середньомолекулярних олігопептидів (СМО).

Підвищення температури сприяє інтенсифікації в еритроцитах окиснювальних процесів, що йдуть за участю активних форм кисню.

Ключові слова: окиснювальний стрес, середовище Фентона, активні форми кисню, еритроцити, вторинні продукти перекисного окиснення ліпідів, середньомолекулярні олігопептиди.

Konoshenko S.V. The formation of secondary products of lipids peroxidation and products of protein destruction in human erythrocytes in the conditions of oxidative stress under different temperature / S.V. Konoshenko, M.A. Dolgov // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 4. – P. 125-130.

Under incubation of human erythrocytes in the Fenton system the content of secondary products of lipids peroxidation is rised and the content of middle mass oligopeptides is lowed in the hemolysates.

The intensification of oxidative processes in erythrocytes is rised with more high temperature.

Keywords: oxidativ stress, Fenton`s system, oxygen active forms, erythrocytes, secondary products of lipids peroxidation, middle mass oligopeptides.

Поступила в редакцию 22.11.2010 г.