

УДК 577. 112:612

ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭРИТРОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА IN VITRO

Коношенко С. В.¹, Кухарик О. Н.¹, Елкина Н. М.², Мирмуминова З. М.³

¹Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия

²Медицинская академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия

³ГБУЗ РК «Центр крови», Симферополь, Республика Крым, Россия

E-mail: nataleiolkina@gmail.com

Показано, что в условиях моделирования окислительного стресса in vitro (среда Фентона) в эритроцитах усиливаются реакции пероксидации липидов, что подтверждается снижением содержания общих липидов и повышением уровня первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов как в мембранах, так и в гемолизате эритроцитов. Вместе с этим, в гемолизате эритроцитов снижается активность каталазы и возрастает активность глутатионредуктазы. Рассматривается возможность развития в эритроцитах адаптивно-компенсаторных процессов в ответ на инициирование окислительных реакций с участием активных форм кислорода.

Ключевые слова: эритроциты, окислительный стресс, среда Фентона, пероксидация липидов, антиоксидантные ферменты: каталаза, глутатионредуктаза.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема окислительного стресса, сопровождающего многие заболевания внутреннего характера, является одной из наиболее важных в современной биологии и медицине [1–3]. До сих пор остается до конца нерешенным вопрос о роли окислительного стресса в развитии патологии и о тех деструктивных процессах, которые осуществляются на клеточном и молекулярном уровнях под действием активных форм кислорода (АФК) как радикальной, так и нерадикальной природы.

Мишенью действия АФК являются различные органические соединения, в частности липидные компоненты клеток [4]. Усиленное генерирование АФК – характерная особенность окислительного стресса, причина развития которого, по имеющемуся в литературе представлению, – нарушение прооксидантно-антиоксидантного равновесия [4].

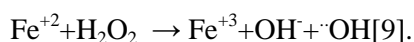
Вместе с этим накопилось достаточно много данных, свидетельствующих о вовлечении в патологический процесс эритроцитов при сердечно-сосудистых, гематологических и других заболеваниях [5–8].

Представляется важным понять, какие молекулярные механизмы реализуются в эритроцитах в ответ на окислительный стресс, могут ли они иметь адаптивный характер и быть направлены на поддержание структурного и функционального состояния эритроцитов.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение процессов перекисного окисления липидов и активности отдельных антиоксидантных ферментов в эритроцитах в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (15 человек в возрасте от 35 до 40 лет). Моделирование окислительного стресса осуществляли, используя среду Фентона, содержащую 10мМ FeSO₄ * 7H₂O и 3мМ H₂O₂. Эритроциты помещали в среду Фентона (в соотношении 1:1) и инкубировали в течение 4 часов при 4°C. Среда Фентона характеризуется способностью активно генерировать АФК радикальной природы. Реакция Фентона является пусковой в этом процессе:



Контролем служили эритроциты, которые не были инкубированы в данных условиях.

Кровь практически здоровых людей брали на базе ГБУЗ РК «Центр крови» (г. Симферополь).

Эритроциты гемолизировали, добавляя равный объем дистиллированной воды [10]. Мембраны отделяли от гемолизата последовательным центрифугированием при 3000 об/мин. В мембранах и гемолизате эритроцитов определяли содержание общих липидов [11], а также первичных [4] и вторичных (ТБК-активных) продуктов перекисаии липидов (ПОЛ) [12]. В гемолизате эритроцитов определяли также активность каталазы [13] и глутатион-редуктазы [14]. Все исследования проводили с использованием спектрофотометрических методов биохимического анализа. Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, при инкубации эритроцитов в среде Фентона, продуцирующей активные формы кислорода, в эритроцитах практически здоровых людей наблюдается снижение содержания общих липидов: на 31 % в мембранах и в 2,0 раза – в гемолизате (табл. 1). В этих условиях снижение содержания общих липидов сопровождается существенным повышением уровня как первичных, так и вторичных продуктов ПОЛ (табл. 2, 3). Так, в мембранах эритроцитов содержание первичных продуктов ПОЛ повышалось в 26,5 раза, а в гемолизате – в 12,9 раза по сравнению с контролем. Содержание вторичных (ТБК-активных) продуктов повышалось в 3,2 раза в мембранах и в 7,7 раза в гемолизате эритроцитов.

Таблица 1
Содержание общих липидов в мембранах и гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса (M±m)

Объект исследования	Мембраны	Гемолизат
	Содержание общих липидов, мг/мл	Содержание общих липидов, мг/мл
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	1,09±0,15	1,57±0,19
Эритроциты после инкубации в среде Фентона (4 часа)	0,75±0,07*	0,77±0,07*

Примечание: * – достоверность различия показателя по сравнению с контролем (p<0,05).

Таблица 2
Содержание первичных продуктов пероксидации липидов в мембранах и гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса (M±m)

Объект исследования	Мембраны	Гемолизат
	Первичные продукты ПОЛ, усл.ед/мг липидов	Первичные продукты ПОЛ, усл.ед/мг липидов
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	0,30±0,02	0,33±0,02
Эритроциты после инкубации в среде Фентона (4 часа)	7,94±1,02*	4,25±0,43*

Примечание: * – достоверность различия показателя по сравнению с контролем (p<0,05).

Таблица 3
Содержание вторичных продуктов пероксидации липидов в мембранах и гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса (M±m)

Объект исследования	Мембраны	Гемолизат
	ТБК- активне продукты ПОЛ, усл.ед/мг липидов	ТБК- активне продукты ПОЛ, усл.ед/мг липидов
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	0,19±0,05	0,043±0,003
Эритроциты после инкубации в среде Фентона (4 часа)	0,61±0,1*	0,33±0,06*

Примечание: * – достоверность различия показателя по сравнению с контролем (p<0,05).

Наиболее выраженные изменения показаны для первичных продуктов ПОЛ, что прослеживается как в мембранах, так и в гемолизате эритроцитов. Этот факт заслуживает определенного внимания и позволяет сделать предположения о возможности реализации в эритроцитах некоторого механизма, направленного на сдерживание превращения первичных продуктов ПОЛ во вторичные, которые, как известно из литературы [9], представляют гораздо большую опасность для клеток, взаимодействуя с молекулами протеинов и влияя на их структуру и функции.

Обращает на себя внимание и другой факт, связанный с изменением содержания общих липидов в мембранах и гемолизате эритроцитов. Из полученных данных следует, что изменения в содержании общих липидов и продуктов ПОЛ в мембранах и гемолизате эритроцитов имеют реципрокный характер. Это позволяет сделать предположение, что в условиях окислительного стресса в мембранах активируются процессы репаративного характера за счет липидных компонентов цитозоля, чем и можно объяснить более выраженное снижение содержания общих липидов в гемолизате по сравнению с мембранами эритроцитов. В целом в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* в мембранах эритроцитов процессы пероксидации липидов осуществляются более активно, чем в цитозоле, что объясняется непосредственным контактом мембран со средой, продуцирующей АФК.

При изменении активности ферментов антиоксидантной системы были получены данные, представленные в табл. 4. Как показали результаты исследований, при инкубации эритроцитов в среде Фентона в гемолизате эритроцитов снижается активность каталазы (в 1,7 раза по сравнению с контролем) и, вместе с этим, повышается активность глутатионредуктазы (в 1,4 раза). Уменьшение активности каталазы в эритроцитах в условиях окислительного стресса является отрицательным фактором, так как снижает возможности разложения пероксида водорода – проводника большинства реакций генерирования АФК [9].

Таблица 4

Активность каталазы и глутатионредуктазы в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса ($M \pm m$)

Объект исследования	Активность каталазы, $\text{ммоль} \times \text{с}^{-1} \times \text{л}^{-1}$	Активность глутатионредуктазы, $\text{нмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мл}^{-1}$
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	$0,065 \pm 0,006$	$0,590 \pm 0,026$
Эритроциты после инкубации в среде Фентона (4 часа)	$0,038 \pm 0,002^*$	$0,800 \pm 0,017^*$

Примечание: * – достоверность различия показателя по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Повышение активности глутатионредуктазы также представляется достаточно важным фактом, поскольку данный фермент антиоксидантной системы занимает центральное место в так называемой глутатионовой системе клеток, обеспечивая поддержание оптимального уровня восстановленного глутатиона и восстановительного потенциала в целом [14]. Повышение активности эритроцитарной глутатионредуктазы в условиях окислительного стресса можно рассматривать как проявление реализации адаптивно-компенаторных процессов, направленных на стабилизацию клеточного метаболизма и, в конечном итоге, на поддержание функциональной активности эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании результатов исследований можно сделать следующие выводы:

1. в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* (среда Фентона) в эритроцитах усиливаются процессы перекисидации липидов, о чем свидетельствуют снижение содержания общих липидов и повышение уровня первичных и вторичных продуктов ПОЛ как в мембранах, так и в гемолизате эритроцитов;
2. при инкубации эритроцитов в среде Фентона в гемолизате эритроцитов изменяется активность ферментов антиоксидантной системы: снижается активность каталазы и повышается активность глутатионредуктазы. Повышение активности глутатионредуктазы в эритроцитах в этих условиях может иметь адаптивно-компенсаторное значение.

Список литературы

1. Азизова О. А. Взаимосвязь маркеров окислительного стресса с клиническим течением хронической ишемии мозга / О. А. Азизова // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корскова. – 2013. – № 9. – С. 21–27.
2. Курашова Н. А. Особенности окислительного стресса при различных патологических состояниях у мужчин репродуктивного возраста / Н. А. Курашова // Бюлл. Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2012. – № 2 (2). – С. 31–35.
3. Луцкий М. А. Формирование окислительного стресса как одного из звеньев сложного патогенеза социально значимых заболеваний нервной системы – инсульта и рассеянного склероза / М. А. Луцкий, А. М. Земсков, М. А. Смелянец и др. // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10. – С. 27–32.
4. Гаврилов В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С. 60–64.
5. Novgorodtseva T. P. Modifications of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases / T. P. Novgorodtseva, Y. K. Denisenko, N. N. Zhukova et al. // Lipids Health Dis. – 2013. – N 12. – P. 117–121.
6. Елкина Н. М. Липидный состав и перекисидация липидов в эритроцитах при железодефицитной анемии / Н. М. Елкина, С. В. Коношенко // Уч. записки Крымского федерального ун-та им. В. И. Вернадского. – 2015. – Т. 1(67), № 1. – С. 25–29.
7. Елкина Н. М. Процессы перекисидации липидов и генерирования активных форм кислорода в эритроцитах больных кардиомиопатией / Н. М. Елкина, С. В. Коношенко // Уч. записки Крымского федерального ун-та им. В. И. Вернадского. – 2015. – Т. 1(67), № 1. – С. 30–35.

8. Елкина Н. М. Состояние антиоксидантной системы в эритроцитах при отдельных гематологических и сердечно-сосудистых заболеваниях / Н. М. Елкина, С. В. Коношенко // Уч. записки Крымского федерального ун-та им. В. И. Вернадского. – 2015. – Т. 1(67), № 3. – С. 14–20.
9. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е. Е. Дубинина, С. В. Гавровская, Е. В. Кузьмич и др. // Биохимия. – 2002 – Т. 67, вып. 3. – С. 413–421.
10. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1959. – V. 21. – P. 224–226.
11. Биохимические методы исследования в клинике / Под. ред. А. А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – С. 28–30.
12. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yogi // Analit. Biochem. – 1979. – N 2. – P. 351–358.
13. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова и др. // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
14. Агабели Р. А. Антиоксиданты и антиоксидантные ферменты / Р. А. Агабели. – Баку, 1989. – 120 с.

**PROCESSES OF LIPIDS PEROXIDATION AND ACTIVITY OF
ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN ERYTHROCYTES UNDER OXIDATIVE
STRESS IN VITRO**

Konoshenko S. V¹., Kycharik O. N¹., Yolkina N. M¹., Mirmuminova Z. M².

¹*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia*

²*GBUZ «Centre of blood», Simferopol, Crimea, Russia*

E-mail: nataleiolkina@gmail.com

It is known, that under different diseases the oxidative stress is developed [1, 2]. These processes are connected with generation of oxygen active forms [1]. Today we have much dates about that under some diseases erythrocytes are involved in pathological process as demonstrated by biochemical changes occurring in them [3, 4]. In this regard, it is interest to examine the state of processes of lipids peroxidation and antioxidative system in erythrocytes under oxidative stress in vitro.

The materials for the study were the erythrocytes of healthy subjects. Erythrocytes were incubated in Fenton system, containing 10,0 mM FeSO₄ * 7H₂O and 3,0mM H₂O₂ during 4 hours at 4°C.

Fenton system have ability for production of radical oxygen active forms, in particular, superoxideanion [5]. The control was the erythrocytes, which didn't incubated in Fenton system. The erythrocytes were hemolysated by distilled water. The membranes of erythrocytes were separated from hemolysate by centrifugation. In membranes and hemolysate of erythrocytes the content of total lipids [6] and lipids peroxidation products (LPP) [7, 8] was determined. The activity of catalase [9] and glutation-reductase [10] was determined in hemolysates. All indexes were studied by spectrophotometric methods of biochemical analyses.

It has been shown, that under oxidative stress the level of total lipids in membranes, and hemolysate of erythrocytes was lowed: at 31,0 percents and at 2,0 times, accordingly, as compared with control. The level of primary and secondary products of lipids peroxidation (LP) in membranes and hemolysates was rised. The content of primary

products of LP was risen at 26,5 times in membranes and at 12,9 times in hemolysate of erythrocytes. The content of secondary products of LP was risen at 3,2 times in membranes and at 7,7 times in hemolysate.

At the same, the activity of antioxidative enzymes in hemolysates was changed also. The activity of catalase was lowed at 1,7 times as compared with control and activity of glutation-reductase was risen at 1,4 times.

The obtained dates evidence about that under oxidative stress in vitro the intensification of lipids peroxidation reactions in erythrocytes is accompanied with mobilization of adaptative reactions that is important for stabilization of redox potencial in red cells.

Keywords: erythrocytes, oxidative stress, Fenton system, lipids peroxidation, antioxidative enzymes: catalase, glutation-reductase.

References

1. Azizova O. A., Connection of oxidative stress markers with clinical properties of chronic ischemic of brain, *S. S. Korsakov J. of nevrology and psichiatty*, **9**, 21(2013).
2. Luzki M. A., Zemskov A. M., Smeljanets M. A. et al, Formation of oxidative stress - one of the total pathogenesis of sosial deseases of nerve system, *Fundamental investigations*, **10**, 27 (2014).
3. Yolkina N. M., Processes of lipids peroxidation, methemoglobin formation and oxygen active forms generation in erythrocytes of patients with erythraemia, *Sc. notes of V. I. Vernadsky Taurida university, Biology and Chemistry*, **20 (65)**, 4, 39 (2013).
4. Konoshenko S. V., Yolkina N. M., Peculiarities of proteins oxidative modification in erythrocytes of patients with cardiomyopathies, ischemic heart desease, erythroemia and aplastic anemia, *Experimental and clinical physiology and biochemistry*, **2**, 40 (2013).
5. Dubinina E. E. Gavrovskaja S. V., Kuzmich E. V. et al, Proteins oxidative modification: oxidation of tryptofhan and formation of bityrisine in proteins with appleing of Fenton system, *Biochemistry*, **67**, **3**, 413 (2002).
6. Pokrovsky A. A. *Biochemical methods of investigation in clinic*, 28 (Moscow, Medicine, 1969).
7. Gavrilov V. B., Gavrilova A. R., Chmara N. F., The measureing of dien conjugates in blood plasma by UF-absorbtion of heptane and isopropanole extractions, *Lab. delo*, **2**, 60 (1988).
8. Ohkawa H., Yogi K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analit. Biochem.*, **2**, 351 (1979).
9. Koroljuk M. A., Ivanova A. I., Majorova I. G., et al, Method of studing of catalase activity, *Lab. delo*, **1**, 16 (1988).
10. Agabeli R. A., *Antioxidants and antioxidative enzymes*, 120 (Bacu, 1989).