

УДК 577.112:612

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПРОТЕИНОВ И МЕТГЕМОГЛОБИНОБРАЗОВАНИЕ В ЭРИТРОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА IN VITRO

Коношенко С. В.¹, Мартоян М. М.¹, Елкина Н. М.², Мирмунинова 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, Россия, Республика Крым, Россия

E-mail: nataleiolkina@gmail.com

Показано, что в условиях моделирования окислительного стресса in vitro (среда Фентона) в мембранах и гемолизате эритроцитов интенсифицируются процессы окислительной модификации протеинов, что подтверждается увеличением содержания продуктов окислительной модификации нейтрального и основного характера. Прослеживается преобладание уровня продуктов окислительной модификации основного характера. Вместе с этим в мембранах и гемолизате эритроцитов снижается содержание среднемолекулярных олигопептидов. Отмеченные изменения сопровождаются увеличением содержания метгемоглобина.

Ключевые слова: эритроциты, окислительный стресс, среда Фентона, окислительная модификация протеинов, среднемолекулярные олигопептиды, метгемоглобин.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема окислительного стресса является одной из наиболее актуальных в современной биологии и медицине [1–3]. В настоящее время известно, что развитие окислительного стресса сопровождается многими заболеваниями и связано с усиленным генерированием активных форм кислорода (АФК) как радикальной, так и нерадикальной природы [4]. Вместе с этим накопилось достаточно большое количество данных, свидетельствующих о вовлечении в патологический процесс эритроцитов при гематологических, сердечно-сосудистых и других заболеваниях [4–7].

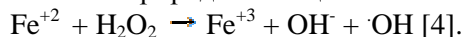
Учитывая данное обстоятельство, представляется важным понять, какие молекулярные механизмы реализуются в эритроцитах в ответ на окислительный стресс, могут ли они иметь адаптивный характер или осуществляются биохимические изменения, имеющие необратимый деструктивный характер.

Поскольку мишенью действия АФК являются не только липиды, но и белковые компоненты клеток [4], целью настоящей работы было изучение окислительной модификации протеинов и метгемоглобинообразования в эритроцитах в условиях моделирования окислительного стресса in vitro.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили эритроциты практически здоровых людей (15 человек в возрасте от 35 до 40 лет).

Моделирование окислительного стресса осуществляли, используя среду Фентона, содержащую 10mM FeSO₄ · 7H₂O и 3mM H₂O₂. Эритроциты помещали в среду Фентона (в соотношении 1:1) и инкубировали в течение 4 часов при 4□. 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 «Центр крови» (г. Симферополь).

Эритроциты гемолизировали, добавляя равный объём дистиллированной воды [9]. Мембраны отделяли от гемолизата центрифугированием при 3000 об/мин. В мембранах и гемолизате эритроцитов определяли содержание продуктов окислительной модификации протеинов, используя спектрофотометрический метод [10]. Альдегидные и кетонные продукты нейтральной природы идентифицировали при 356 нм и 370 нм, альдегидные и кетонные продукты основной природы – при 430 нм и 530 нм соответственно. Содержание среднемолекулярных олигопептидов в мембранах и гемолизате эритроцитов определяли спектрофотометрически при 254 нм, 272 нм и 280 нм [11]. В гемолизате эритроцитов определяли также содержание метгемоглобина [12].

Полученные данные обрабатывали статистическим методом с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении содержания продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП) в мембранах и гемолизате эритроцитов до и после инкубации в среде Фентона были получены данные, представленные в табл. 1 и 2.

Из полученных данных следует, что при инкубации эритроцитов в среде Фентона, продуцирующей АФК, в мембранах эритроцитов достоверно изменяется содержание альдегидных продуктов основного характера (430 нм). Показано увеличение содержания альдегидных продуктов основного характера на 26,9 % по сравнению с контролем и вместе с этим прослеживается тенденция к увеличению содержания альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера и к снижению содержания кетонных продуктов основного характера.

В гемолизате эритроцитов наблюдается достоверное увеличение содержания альдегидных продуктов нейтрального характера (на 19,0 % по сравнению с контролем), а также альдегидных и кетонных продуктов основного характера (на 16 % и в 1,8 раза соответственно). В целом в этих условиях в эритроцитах преобладает образование продуктов окислительной модификации основной природы.

Таблица 1

Содержание продуктов окислительной модификации протеинов в мембранах эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса (M±m)

Объект исследования	Продукты нейтрального характера, ед. опт. пл.		Продукты основного характера ед. опт. пл.	
	Альдегидные 356 нм	Кетонные 370 нм	Альдегидные 430нм	Кетонные 530 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	0,220±0,060	0,222±0,060	0,206±0,03	0,151±0,04
Эритроциты после инкубации в среде Фентона (4 часа)	0,232±0,021	0,277±0,010	0,267±0,026*	0,127±0,040

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

Таблица 2

Содержание продуктов окислительной модификации протеинов в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса (M±m)

Объект исследования	Продукты нейтрального характера, ед. опт. пл.		Продукты основного характера, ед. опт. пл.	
	Альдегидные 356 нм	Кетонные 370 нм	Альдегидные 430 нм	Кетонные 530 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	1,373±0,114	1,574±0,18	1,408±0,06	0,347±0,018
Эритроциты после инкубации в среде Фентона (4 часа)	1,63±0,10*	1,71±0,07	1,634±0,105*	0,650±0,04*

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

Полученные данные позволяют предположить, что не все участки белковых молекул доступны для АФК. Вероятно, что окислительная модификация протеинов в эритроцитах осуществляется в основном на периферических участках белковых

глобул и в этот процесс вовлекаются преимущественно полярные аминокислотные остатки, образуя под действием АФК альдегидные и кетонные производные основной природы.

Одним из показателей деструктивных процессов, направленных, в частности, на белковые компоненты клеток, является уровень содержания среднемолекулярных олигопептидов (СМО). Как свидетельствуют результаты наших исследований, при инкубации эритроцитов в среде Фентона наблюдается достоверное снижение содержания СМО по сравнению с контролем, что прослеживается как в мембранах, так и в гемолизате эритроцитов (табл. 3 и 4). Так, в мембранах эритроцитов отмечено снижение данного показателя в среднем в 1,7 раза по сравнению с контролем (при идентификации СМО при 254 нм, 272 нм и 280 нм). В гемолизате эритроцитов снижение содержания СМО по сравнению с контролем было более выраженным (в среднем в 3,0 раза).

Таблица 3

Содержание среднемолекулярных олигопептидов (СМО) в мембранах эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса ($M \pm m$)

Объект исследования	Содержание СМО, ед. опт. пл.		
	254 нм	272 нм	280 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	0,645±0,033	0,159±0,011	0,124±0,01
Эритроциты после инкубации в среде Фентона (4 часа)	0,385±0,019*	0,079±0,009*	0,089±0,012*

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

Таблица 4

Содержание среднемолекулярных олигопептидов (СМО) в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса ($M \pm m$)

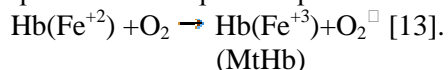
Объект исследования	Содержание СМО, ед. опт. пл.		
	254 нм	272 нм	280 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	0,886±0,068	0,245±0,018	0,185±0,019
Эритроциты после инкубации в среде Фентона (4 часа)	0,380±0,015*	0,052±0,006*	0,079±0,005*

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

Снижение содержания СМО в эритроцитах в условиях окислительного стресса может быть обусловлено значительными деструктивными процессами,

связанными, в частности, с окислительной модификацией протеинов. Возможно, что часть белковых молекул, претерпевших наиболее существенные структурные изменения, или их фрагменты при достижении определенной критической массы начинают агрегировать и в дальнейшем удаляются в процессе центрифугирования, предусмотренного методикой по изучению СМО, что делает затруднительным их полную идентификацию.

Поскольку основным белковым компонентом эритроцитов является гемоглобин, вполне очевидно, что именно этот белок представляет собой наиболее вероятную мишень для действия АФК. Как известно из литературы, одним из путей генерирования АФК рассматривается метгемоглобинообразование:



При этом двухвалентное железо гема окисляется (образуется метгемоглобин), а молекула кислорода, приняв электрон, превращается в супероксиданион.

Учитывая это, представляло интерес оценить уровень метгемоглобина в эритроцитах в условиях интенсификации процессов окислительной модификации протеинов.

Как показали результаты исследований, при инкубации эритроцитов в среде Фентона содержание в гемолизате эритроцитов метгемоглобина увеличивается по сравнению с контролем на 34 % (в контроле – $2,5 \pm 0,03$ %, после инкубации в среде Фентона – $3,35 \pm 0,04$ %).

Вполне вероятно, что генерирование супероксиданиона при переходе гемоглобина в метгемоглобин способствует окислительной модификации белковой компоненты гемоглобина и в целом метгемоглобинообразование можно рассматривать как один из факторов, стимулирующих окислительную модификацию протеинов, усиливая тем самым деструктивные процессы в клетке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

1. В условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* (среда Фентона) в эритроцитах интенсифицируются процессы окислительной модификации протеинов, о чем свидетельствует достоверное увеличение содержания продуктов окислительной модификации протеинов нейтрального и основного характера. Показано преобладание образования продуктов окислительной модификации основной природы.
2. Усиление процессов окислительной модификации протеинов в эритроцитах сопровождается снижением уровня среднемолекулярных олигопептидов, что может быть связано с агрегацией некоторой части этих компонентов с последующим их извлечением из регистрации.
3. В условиях окислительного стресса *in vitro* в эритроцитах усиливается метгемоглобинообразование, что может быть одним из факторов,

стимулирующих генерирование АФК и деструктивные процессы, связанные со структурными изменениями протеинов.

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. Корсакова. – 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. 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.
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 пероксидация 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 пероксидации 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. 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.
10. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и др. // Вопросы медицинской химии. – 1996. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
11. 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. 138–140.
12. Кушаковский М. С. Метгемоглобинемии. Справочник по функциональной диагностике / М. С. Кушаковский. – М.: Медицина, 1970. – С. 423–427.
13. Дубинина Е. Е. Активность супероксиддисмугазы и содержание метгемоглобина в эритроцитах человека и животных / Е. Е. Дубинина, Л. А. Данилова, Л. Ф. Ефимова, А. П. Соловьев, А. М. Бейн // Журн. эволюционной биохим. и физиол. – 1988. – Т. 24, вып. 4. – С. 548–562.

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND METHEMOGLOBIN FORMATION IN ERYTHROCYTES UNDER OXIDATIVE STRESS IN VITRO

Konoshenko S. V.¹, Martojan M. M.¹, Yolkina N. M.¹, Mirmuminova Z. M.²

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

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

E-mail: nataleiolkina@gmail.com

It is known, that under different diseases the balance in prooxidative and antioxidative processes is destroyed and oxidative stress is realized. These processes are connected with productive of oxygen active forms, that leads to changed of molecular and cellular structures [1–3]. Today we have much dates about that under some diseases with oxidative stress erythrocytes are involved in pathological process as demonstrated by biochemical changes occurring in them [4–6]. In this regard, it is interest to examine the state of the processes of proteins oxidative modification and methemoglobin formation in erythrocytes under oxidative stress in vitro.

The materials for the study were the erythrocytes of healthy subjects. Erythrocytes were incubated in the Fenton system [7] (10mM FeSO₄ · 7H₂O and 3,0 mM H₂O) during 4 hours at 4°C. The control were erythrocytes didn't incubated in Fenton system. The erythrocytes were hemolysated by distilled water. Membranes of erythrocytes were separated from hemolysate by method of centrifugation. In membranes and hemolysates of erythrocytes the contents of proteins oxidative modification products [8] and oligopeptides [9] were determined. All indexes were studied by spectrophotometric methods of biochemical analyses.

It has been shown, that under oxidative stress in vitro in membranes and hemolysate of erythrocytes the content of proteins oxidative modification products is changed. So, the content of basic aldehyde productes in membranes was rised at 26,9 % as compared with control. The contents of neutral aldehyde products and basic aldehyde and cetons products in hemolysates were rised at 19,0 % and 16,0 %, and at 1,8 times , accordingly as compared with control. In total, under oxidative stress in vitro the formation of basic proteins oxidative modification products in erythrocytes is more prevailed.

At the same time, the content of oligopeptides in membranes and hemolysates of erythrocytes was lowed: in middle, at 1,7% times in membranes and at 3,0 times in hemolysates. These dates maybe connected with considerable destructive processes, formation of a agrigative complexes of structure-changed protein molecules and their removing by centrifugation.

Also, it has been shown, that under oxidative stress the content of methemoglobin in hemolysates of erythrocytes was rised (at 34 % as compared with control).

The obtained dates evidence about intensification of destructive processes in erythrocytes under oxidative stress in vitro that connected with oxidative modification of proteins by oxygen active forms and with activization of methemoglobin formation.

Keywords: erythrocytes, oxidative stress, Fenton system, proteins oxidative modification, oligopeptides, methemoglobin.

References

1. Azizova O. A., Interaction of markers of oxidative stress with clinical proceed of chronic brain ischemia, *J. Neurology and psychiatry*, **9**, 21 (2013).
2. Kurashova N. A., Peculiarities of oxidative stress under different state of man in reproductive age, *Bull. East-Siberian scientific centre SD RAMN*, **2(2)**, 31 (2012).
3. Lutskij M. A., Zemskov A. M., Smeljanets M. A., Formation of oxidative stress as one from links of difficult pathogenesis of social diseases of nervous system-insult and diffuse cerebral sclerosis, *Fundam.researches*, **10**, 27 (2014).
4. 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*, **26(65), 4**, 39 (2013).
5. Konoshenko S. V., Yolkina N. M., Peculiarities of proteins oxidative modification in erythrocytes of patients with cardiomyopathy, ischemic heart disease, erythraemia and aplastic anemia, *Experimental and clinical physiology and biochemisrty*, **2**, 40 (2013).
6. Novgorotseva T. P., Denisenko Y. K., Zhukova N. N., Modifications of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases, *Lipids Health Dis.*, **12**, 117 (2013).
7. Dubinina E. E., Govrovskaja S. V., Kuzmich E. V. et al, Oxidative modification of proteins : oxidative of tryptophane and formation bityrosine in purified proteins with using Fenton system, *Biochemistry*, **67, 3**, 413 (2002).
8. Dubinina E. E., Burmistro S. O., Hodov D. A. et al, Oxidative modification of proteins of human blood searum, the method of their determined, *Voprosi medical chem.*, **41, 1**, 24 (1996).
9. Gabrieljan N. I., Lipatova V. I., Experience of using of blood middle molecules index for diagnose of children nephrology deseases, *Lab.delo*, **3**, 138 (1984).