

**УДК 577.112:612**

## **РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА В ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕИНОВ И МЕТГЕМОГЛОБИНООБРАЗОВАНИИ В ЭРИТРОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

*Коношенко С. В.<sup>1</sup>, Большакова А. А.<sup>1</sup>, Елкина Н. М.<sup>2</sup>, Казакова В. В.<sup>2</sup>,*

*Загноенко Н. Е.<sup>2</sup>*

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

*<sup>2</sup>Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

*E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

Показано, что с повышением температуры от 4 °С до 37 °С в эритроцитах возрастает интенсивность окислительной модификации протеинов. Наблюдается смещение этих процессов в направлении большего образования альдегидных и кетонных продуктов окислительной модификации нейтрального характера. Вместе с этим, в условиях окислительного стресса повышение температуры способствует интенсификации метгемоглибинообразования.

**Ключевые слова:** эритроциты, окислительный стресс, окислительная модификация протеинов, метгемоглибинообразование.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Одной из проблем биологии и медицины является выяснение молекулярных основ развития окислительного стресса, влияние на эти процессы факторов различной природы. Развитие окислительного стресса осуществляется при многих заболеваниях, что связано с нарушением прооксидантно-антиоксидантного равновесия и усиленным генерированием активных форм кислорода (АФК). Под действием активных форм кислорода в клетках организма осуществляются различные деструктивные изменения в частности, окислительная модификация протеинов [1–3]. Ряд работ [4–7] свидетельствует о том, что при многих заболеваниях в патологический процесс вовлекаются эритроциты. Учитывая, что образование метформы гемоглобина связано с генерированием АФК, можно предположить вполне очевидную связь между процессом окислительной модификации протеинов, в частности гемоглобина, и метгемоглибинообразованием.

В настоящее время остаётся недостаточно изученным вопрос о влиянии на процессы окислительной модификации протеинов и метгемоглибинообразование такого фактора как температура.

В связи с этим, целью данной работы являлось изучение роли температурного фактора в окислительной модификации протеинов и метгемоглибинообразовании в эритроцитах в условиях развития окислительного стресса.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Материалом для исследования служили эритроциты практически здоровых людей (25 человек, средний возраст 38,0 лет). Кровь брали на базе ГБУЗ РК «Центр крови», г. Симферополь. Эритроциты гемолизировали по методу Драбкина [8]. В гемолизате эритроцитов определяли содержание продуктов окислительной модификации протеинов, используя биохимический метод, основанный на спектрофотометрической идентификации 2,4 – динитрофенилгидразонов аминокислотных остатков, представляющих собой альдегидные и кетонные производные аминокислот нейтрального и основного характера, при длинах волн 356 нм, 370 нм, 430 нм и 530 нм [9]. Содержание метгемоглобина в гемолизате эритроцитов определяли по методу, описанному в литературе [10].

В целях моделирования окислительного стресса эритроциты инкубировали в среде Фентона, содержащей 10 мМ FeSO<sub>4</sub> и 3 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в течение 2,4 и 6 часов при температуре 4 °С и 37 °С. Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Как показали результаты исследования при инкубации эритроцитов в среде Фентона при 4 °С в течение 2-х часов наблюдается тенденция к увеличению содержания в гемолизате эритроцитов альдегидных и кетонных продуктов окислительной модификации протеинов как основного, так и нейтрального характера (табл. 1).

Более длительная инкубация эритроцитов в этих условиях, в течение 4-х и 6-ти часов, приводила к существенному увеличению всех спектрофотометрически идентифицированных продуктов окислительной модификации протеинов (табл. 1). Через 4 часа инкубации эритроцитов содержание альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера увеличивалось на 31,0 % и 37,4 % по сравнению с контролем, содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера возрастало на 20,3 % и 52,6 %, соответственно. Через 6 часов инкубации эритроцитов в среде Фентона наблюдалось дальнейшее увеличение уровня содержания продуктов окислительной модификации протеинов: альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера в 1,7 раза, альдегидных и кетонных продуктов основного характера в 1,4 раза и в 1,9 раза по сравнению с контролем.

**Таблица 1**

**Содержание продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП) в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса in vitro при t 4 °С (M±m)**

| Объект исследования   | Содержание продуктов ОМП, ед.опт. пл. |                |                     |                |
|---|---------------------------------------|----------------|---------------------|----------------|
|   | Нейтрального характера                |                | Основного характера |                |
|   | Альдегиды, 356 нм                     | Кетоны, 370 нм | Альдегиды, 430 нм   | Кетоны, 530 нм |
| Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)              | 1,03 ± 0,15                           | 1,07 ± 0,14    | 1,33 ± 0,14         | 0,38 ± 0,07    |
| Эритроциты, инкубированные в среде Фентона в течение: 2-х часов | 1,09 ± 0,08                           | 1,15 ± 0,10    | 1,45 ± 0,15         | 0,42 ± 0,08    |
| 4-х часов   | 1,35 ± 0,10 *                         | 1,47 ± 0,12 *  | 1,60 ± 0,15         | 0,58 ± 0,08 *  |
| 6-ти часов  | 1,70 ± 0,15 *                         | 1,82 ± 0,14 *  | 1,84 ± 0,13 *       | 0,73 ± 0,10 *  |

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

При инкубации эритроцитов в среде Фентона при температуре 37 °С процессы окислительной модификации протеинов осуществлялись гораздо более интенсивно, о чём свидетельствуют данные, представленные в табл. 2.

Так, через 2 часа инкубации эритроцитов содержание альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера достоверно возрастало в 1,6 и в 1,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем; содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера увеличивалось на 13,5 % и 21,0 % по сравнению с контролем. Различия в содержании продуктов окислительной модификации протеинов основного характера проявлялись на уровне тенденции.

Через 4 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона содержание альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера увеличивалось в 2,5 и в 2,0 раза по сравнению с контролем; содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера возрастало в 2,0 и в 1,9 раза, соответственно. Через 6 часов инкубации эритроцитов наблюдалось некоторое снижение уровня продуктов окислительной модификации протеинов по сравнению с предыдущими значениями показателей (4 часа инкубации). Тем не менее, содержание альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера превышало уровень контроля в 1,7 и в 1,8 раза, а содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера превышало уровень контроля в 1,5 раза.

Наблюдаемое нами снижение уровня содержания продуктов окислительной модификации протеинов через 6 часов инкубации эритроцитов в среде Фентона можно объяснить глубокими деструктивными процессами, связанными с

возможным распадом белковых молекул и дальнейшим удалением их некоторой доли в процессе эксперимента (отмывание протеинового осадка этилацетатно-спиртовой смесью).

**Таблица 2**

**Содержание продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП) в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* при  $t\ 37\ ^\circ\text{C}$  ( $M\pm m$ )**

| Объект исследования   | Содержание продуктов ОМП, ед.опт. пл. |                |                     |                |
|---|---------------------------------------|----------------|---------------------|----------------|
|   | Нейтрального характера                |                | Основного характера |                |
|   | Альдегиды, 356 нм                     | Кетоны, 370 нм | Альдегиды, 430 нм   | Кетоны, 530 нм |
| Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)              | 1,03 ± 0,15                           | 1,07 ± 0,14    | 1,33 ± 0,14         | 0,38 ± 0,07    |
| Эритроциты, инкубированные в среде Фентона в течение: 2-х часов | 1,62 ± 0,27 *                         | 1,63 ± 0,23 *  | 1,51 ± 0,14         | 0,46 ± 0,08    |
| 4-х часов   | 2,55 ± 0,27 *                         | 2,26 ± 0,17 *  | 2,63 ± 0,33 *       | 0,71 ± 0,09 *  |
| 6-ти часов  | 1,78 ± 0,19 *                         | 1,92 ± 0,13 *  | 1,98 ± 0,16 *       | 0,59 ± 0,04 *  |

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

Сопоставляя данные, полученные при инкубации эритроцитов в среде Фентона при  $4\ ^\circ\text{C}$  и  $37\ ^\circ\text{C}$  можно отметить, что при более высокой температуре процессы окислительной модификации протеинов приобретает более высокий уровень интенсивности. Поскольку окислительная модификация протеинов осуществляется под действием активных форм кислорода, главным образом, радикальной природы, вполне правомерно сделать предположение о том, что температурный фактор является одним из тех, которые влияют на генерирование АФК не только в эритроцитах, но и в других биологических средах.

Определенный интерес представляет также тот факт, что при температуре  $4\ ^\circ\text{C}$  интенсивность образования альдегидных и кетонных продуктов как нейтрального, так и основного характера была практически одинакова, тогда как при  $37\ ^\circ\text{C}$  проявляется более выраженное образование продуктов окислительной модификации протеинов нейтрального характера. На основании этого можно предположить, что с повышением температуры возрастает внутримолекулярная динамика протеинов и в результате таких изменений более глубокие участки белковых молекул, в которых возрастает присутствие неполярных аминокислотных участков, становятся более уязвимыми для действия АФК.

Учитывая, что в эритроцитах из всех органических компонентов, в том числе и протеинов, основное содержание приходится на гемоглобин, представляло интерес оценить влияние температуры на процесс метгемоглибинообразования в условиях моделирования окислительного стресса. Изучение этого вопроса позволило получить данные, представленные в табл. 3.

Как видно из данных табл.3, при инкубации эритроцитов в среде Фентона при температуре 4 °С в течение 2-х, 4-х и 6-ти часов прослеживается незначительное увеличение содержания метгемоглобина в гемолизатах, что проявляется, в основном, на уровне тенденции, за исключением 6-ти часового периода инкубации (показано достоверное увеличение уровня метгемоглобина: на 41,7 % по сравнению с контролем).

При инкубации эритроцитов в среде Фентона при температуре 37 °С образование метгемоглобина было более выраженным: через 2 часа инкубации эритроцитов уровень метгемоглобина возрастал на 21,0 %, через 4 часа инкубации – на 38,0 %, а через 6 часов инкубации – на 67,0 % по сравнению с контролем.

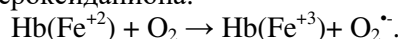
**Таблица 3**

**Содержание метгемоглобина в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса in vitro при температуре 4°С и 37°С (M±m)**

| Объект исследования                                   | Содержание метгемоглобина, % |             |
|---|------------------------------|-------------|
|   | t = 4 °С                     | t = 37 °С   |
| Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)    | 2,4 ± 0,2                    | 2,4 ± 0,2   |
| Эритроциты, инкубированные в среде Фентона в течение: |                              |             |
| 2-х часов   | 2,5 ± 0,1                    | 2,9 ± 0,1 * |
| 4-х часов   | 2,8 ± 0,2                    | 3,3 ± 0,1 * |
| 6-ти часов  | 3,4 ± 0,1 *                  | 4,0 ± 0,2 * |

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

Из литературы известно [11], что переход гемоглобина в метгемоглобин сопровождается образованием одной из наиболее реакционной формы АФК – супероксиданиона:



В условиях среды, интенсивно генерирующей АФК, процесс образования метгемоглобина может существенно стимулироваться.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На основании результатов исследований можно сделать следующие выводы:

1. С повышением температуры от 4 °С до 37 °С в эритроцитах возрастает интенсивность окислительной модификации протеинов, о чём свидетельствует

- более выраженное образование альдегидных и кетонных продуктов модификации как нейтрального, так и основного характера.
2. Повышение температуры сдвигает процессы окислительной модификации протеинов в эритроцитах в направлении большего образования альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера, что может быть связано с увеличением доступности более глубоких участков белковых молекул для действия АФК.
  3. В условиях окислительного стресса в эритроцитах усиливается метгемоглобинообразование, интенсивность которого существенно возрастает с повышением температуры.

#### **Список литературы**

1. Владимиров Ю. А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии / Ю. А. Владимиров // Биохимия. – 2004. – Т. 69, Вып.1. – С. 5–7.
2. Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Меньшикова Е. Б. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
3. 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.
4. Novgorodtseva T. P. Modifications of the fatty acids 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. – №2. – P. 117–121.
5. Коношенко С. В. Особливості окислювальної модифікації протеїнів в еритроцитах хворих на кардіоміпатію, ішемічну хворобу серця, еритремію та апластичну анемію / С. В. Коношенко, Н. М. Йолкіна // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2013. – №2. – С. 40–43.
6. Елкина Н. М. Процессы перекисидации липидов, метгемоглобинообразования и генерирования активных форм кислорода в эритроцитах больных эритремией / Н. М. Елкина // Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер.: Биология, химия. – 2013. – Т. 26 (65), №4. – С. 39–43.
7. Елкина Н. М. Состояние антиоксидантной системы в эритроцитах при активных гематологических и сердечно сосудистых заболеваниях / Н. М. Елкина, С. В. Коношенко // Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер.: Биология, химия. – 2015. – Т. 1(67), №3. – С. 14–20.
8. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and hemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1959. – №21. – P. 224–226.
9. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и др. // Вопросы мед. химии. – 1996. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
10. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – С. 28–30.
11. Дубинина Е. Е. Активность супероксиддисмутазы и содержание метгемоглобина в эритроцитах человека и животных / Е. Е. Дубинина, Л. А. Данилова, Л. Ф. Ефимова и др // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. – 1988. – Т. 24, Вып.4. – С. 532–540.

**THE ROLE OF THE TEMPERATURE FACTOR IN THE OXIDATIVE  
MODIFICATION OF PROTEINS AND METHEMOGLOBIN FORMATION IN  
ERYTHROCYTES UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS**

*Konoshenko S. V., Bolshakova A. A., Yolkina N. M., Kazakova V. V., Zagnoenko N. E.*

*V. I. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

One of the problems of biology and medicine is the elucidation of the molecular basis for the development of oxidative stress, the influence of factors of various natures on these processes. It is known that the development of oxidative stress occurs in many diseases, which is enhanced by the formation of reactive oxygen species that attack various organic compounds, including proteins [1–3]. At the same time, a number of studies indicate that in diseases characterized by the development of oxidative stress, in the pathological process involved erythrocytes [4–6].

In this regard, the aim of this work was to study the role of the temperature factor in the oxidative modification of proteins and methemoglobin formation in erythrocytes under conditions of the development of oxidative stress.

The materials for the study were erythrocytes of healthy subjects (25 persons, middle age 38.0 years).

The erythrocytes were hemolysed by distilled water. In hemolysates the content of proteins oxidative modification products was determined by spectrophotometrically recording them at 356 nm, 370 nm, 430 nm and 530 nm [7]; the content of methemoglobin was determined also [8]. Oxidative stress modeling was by using of Fenton's medium, in which erythrocytes were incubated during 2, 4, and 6 hours at the temperature of 4° C and 37 °C.

It has been shown that when erythrocytes were incubated in Fenton's medium at 4° C during 2 and 4 hours, a slight increasing of the level of proteins modification products was observed, after 6 hours the level of neutral and basic aldehyde and ketone products was raised at 1.7 times.

When the erythrocytes were incubated in Fenton's system at the temperature of 37 °C a more significant increasing of the level of proteins modification products was observed: after 2 hours of incubation – at 1.4 times; after 4 hours of incubation – at 2.0 times and after 6 hours – at 1.6 times.

At the same time, the content of methemoglobin was raised also. When the erythrocytes were incubated in Fenton's system at the temperature of 4 °C the increasing in the level of methemoglobin was noted only after 6 hours of incubation (at 1.4 times). When erythrocytes were incubated in this system at the temperature of 37 °C the increasing in methemoglobin level was more pronounced: after 2 hours – at 1.2 times, after 4 hours – at 1.4 times and after 6 hours – at 1.7 times, in middle.

These data evidence about that with increasing of temperature in erythrocytes the processes of proteins oxidative modification and methemoglobin formation are intensified.

**Keywords:** erythrocytes, oxidative stress, oxidative modification of proteins, methemoglobin formation.

### References

1. Vladimirov Y. A., The active forms of oxygen and nitrogen: their importance for diagnoses, prophylactic and therapeutics, *Biochemistry*, **69**, **1**, 5 (2004).
2. Menshikova E. B., Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants, 556 (Moscow, Firm " Word", 2006).
3. Azizova O. A., Korsakov S. S., Connection of oxidative stress markers with clinical properties of chronic ischemic of brain, *J. of neurology and psychiatry*, **9**, 21 (2013).
4. Novgorodtseva T. P., Denisenko Y. K., Zhukova N. N. et al, Modifications of fatty acids composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases, *Lipids Health Dis.*, **12**, 117 (2013).
5. Konoshenko S. V., Yolkina N. M., Peculiarities of proteins oxidative modification in erythrocytes of patients with cardiomyopathies, ischemic heart diseases, erythraemia and aplastic anemia, *Experimental and clinical physiology and biochemistry*, **2**, 40 (2013).
6. 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).
7. Yolkina N. M., Konoshenko S. V., Peculiarities of antioxidative system in erythrocytes under some hematological and heart-vascular diseases, *Sc. Notes of V. I. Vernadsky Taurida university, Biology and Chemistry*, **1** (**67**), **3**, 14 (2015).
8. Drabkin D. A., simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and hemoglobin in the crystalline, *Arch. Biochem*, **21**, 226 (1959).
9. Dubinina E. E., Burmistrov S. O., Hodov D. A. et al, Oxidative modification of proteins in human serum of blood, method of determination, *Vopr. Med. Chem.*, **41**, **1**, 24 (1996).
10. Picrovsky A. A., *Biochemical methods of investigations in clinic*, 28 (Moscow, Medicine, 1969).
11. Dubinina E. E., Activity superoxide dismutase and the content of methemoglobin in erythrocytes of humans and animals, *J. of evolutionary biochemistry and physiology*, **4** (**24**), 540 (1988).