

УДК 577.112:612

## ПОКАЗАТЕЛИ ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЭРИТРОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА IN VITRO

*Коношенко С. В.<sup>1</sup>, Елкина Н. М.<sup>2</sup>, Большакова А. А.<sup>1</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 им. С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*  
*E-mail: svkonoshenko@inbox.ru*

Показано, что в условиях развития окислительного стресса *in vitro* в мембране и цитозольной фракции эритроцитов усиливаются реакции окислительной модификации протеинов и образование среднемолекулярных олигопептидов. По сравнению с цитозольной фракцией в мембране эритроцитов наблюдается хорошо выраженное преобладание образования среднемолекулярных олигопептидов. Более выраженные изменения в направлении интенсификации претерпевают процессы окислительной модификации протеинов по сравнению с образованием среднемолекулярных олигопептидов, что прослеживается как в мембране, так и в цитозольной фракции эритроцитов.

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

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема окислительного стресса является одной из наиболее актуальных в современной биологии и медицине [1–4]. Развитие окислительного стресса связано с усиленным генерированием активных форм кислорода (АФК), что обусловлено нарушением прооксидантно-антиоксидантного равновесия, которое в норме ограничивает накопление АФК и препятствует формированию цепного, лавинообразного процесса их образования.

В настоящее время хорошо известен тот факт, что многие заболевания сопровождаются развитием окислительного стресса и в этот процесс вовлекаются эритроциты [5–7]. Известно также, что под действием АФК в клетках осуществляются различного рода деструктивные процессы, связанные со структурными изменениями липидов, протеинов и нуклеиновых кислот [8, 9]. Представляется важным понять характер деструктивных изменений в эритроцитах в условиях развития окислительного стресса.

В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение окислительной модификации протеинов и образования среднемолекулярных олигопептидов в мембранах и цитозольной фракции эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro*.

## 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.

Моделирование окислительного стресса осуществляли, используя среду Фентона, содержащую 10 мМFeSO<sub>4</sub> и 3 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Эритроциты инкубировали в среде Фентона в течение 2, 4 и 6 часов при температуре 37° С. Эритроциты гемолизировали по методу Драбкина, мембраны и цитозольную фракцию отделяли методом центрифугирования [10].

В мембранах и цитозольной фракции эритроцитов определяли содержание продуктов окислительной модификации протеинов [8] и среднемолекулярных олигопептидов [11].

Продукты окислительной модификации протеинов (альдегидные и кетонные производные аминокислот нейтрального и основного характера) идентифицировали спектрофотометрически при 356 нм, 370 нм, 430 нм и 530 нм.

Спектрофотометрическую идентификацию среднемолекулярных олигопептидов осуществляли при 254 нм, 275 нм и 280 нм.

Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, в динамике инкубации эритроцитов в среде Фентона наблюдается существенное увеличение содержания продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП) как в мембранах, так и в цитозольной фракции эритроцитов.

**Таблица 1**  
**Содержание продуктов ОМП в мембранах эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro***

Объект исследования	Продукты ОМП, ед.опт.пл			
	Нейтральной природы		Основной природы	
	альдегиды	кетоны	альдегиды	кетоны
	356 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)				
	0,115±0,008	0,142±0,009	0,153±0,012	0,026±0,003
Эритроциты после инкубации в среде Фентона в течение:				
2-х ч.	0,162±0,023*	0,192±0,022*	0,192±0,023*	0,066±0,010*
4-х ч.	0,234±0,043*	0,243±0,040*	0,267±0,034*	0,073±0,010*
6-ти ч.	0,350±0,042*	0,389±0,048*	0,400±0,050*	0,109±0,013*

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

Так, в мембранах через 2 инкубации эритроцитов в среде Фентона содержание альдегидных продуктов ОМП нейтрального характера возрастало в 1,4 раза по сравнению с контролем; содержание кетонных продуктов нейтрального характера увеличивалось в 1,35 раза, альдегидных продуктов основного характера – в 1,3 раза, кетонных продуктов основного характера – в 2,5 раза.

Через 4 часа инкубации эритроцитов в среде, продуцирующей АФК, прослеживается дальнейший рост уровня продуктов ОМП: альдегидных продуктов нейтрального характера в 2,0 раза по сравнению с контролем, кетонных продуктов нейтрального характера – в 1,7 раза, содержание альдегидных и кетонных продуктов ОМП основного характера увеличивалось в 1,7 и 2,8 раза, соответственно.

Через 6 часов инкубации эритроцитов в среде Фентона уровень альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера увеличивался в 3,0 и в 2,7 раза по сравнению с контролем; содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера возрастало в 2,6 и в 4,2 раза. Наиболее выраженные изменения отмечены в содержании альдегидных продуктов ОМП нейтрального характера и кетонных продуктов основного характера.

В цитозольной фракции эритроцитов также отмечалось существенное увеличение продуктов окислительной модификации протеинов как нейтрального, так и основного характера.

**Таблица 2**

**Содержание продуктов ОМП в цитозольной фракции эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro***

Объект исследования	Продукты ОМП, ед.опт.пл			
	Нейтральной природы		Основной природы	
	альдегиды	кетоны	альдегиды	кетоны
	356 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)				
	1,03±0,15	1,07±0,14	1,33±0,14	0,37±0,07
Эритроциты после инкубации в среде Фентона в течение:				
2-х ч.	1,62±0,27*	1,63±0,23*	1,51±0,14*	0,46±0,08*
4-х ч.	2,55±0,27*	2,26±0,17*	2,63±0,33*	0,71±0,09*
6-ти ч.	1,78±0,19*	1,92±0,13*	1,98±0,16*	0,59±0,04*

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

Так, через 2 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона содержание альдегидных продуктов ОМП нейтрального характера увеличивалось в 1,6 раза по сравнению с контролем, содержание кетонных продуктов ОМП нейтрального характера – в 1,6 раза, содержание альдегидных и кетонных продуктов основного

характера – на 12,0 % и 24,0 %, соответственно. Через 4 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона наблюдалось дальнейшее увеличение содержания продуктов ОМП: альдегидных продуктов нейтрального характера в 2,5 раза по сравнению с контролем, кетонных продуктов нейтрального характера – в 2,0 раза, альдегидных и кетонных продуктов основного характера – в 2,0 и 1,9 раза.

Через 6 часов инкубации эритроцитов уровень регистрируемых продуктов ОМП несколько снижался, хотя и оставался достоверно выше контроля (в среднем в 1,7 раза). Наблюдаемое снижение содержания регистрируемых продуктов ОМП через 6 часов инкубации эритроцитов в среде Фентона может быть связано с более глубокими деструктивными процессами, ведущими к фрагментации некоторой доли белковых молекул и в дальнейшем к вымыванию белковых фрагментов этилацетатно-спиртовой смесью в процессе эксперимента.

Другим, не менее важным показателем деструктивных процессов, связанных с фрагментацией протеинов, является уровень содержания среднемoleкулярных олигопептидов (СМО). При определении содержания СМО в мембранах и цитозольной фракции эритроцитов были получены данные, представленные в табл. 3 и 4.

**Таблица 3**

**Содержание СМО в мембранах эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса in vitro**

Объект исследования	Среднемoleкулярные олигопептиды, ед.опт.пл. • мл <sup>-1</sup>		
	254 нм	275 нм	280 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)			
	0,346±0,024	0,250±0,015	0,198±0,012
Эритроциты после инкубации в среде Фентона в течение:			
2-х ч.	0,400±0,032	0,288±0,020	0,228±0,014
4-х ч.	0,467±0,037*	0,338±0,024*	0,267±0,016*
6-ти ч.	0,690±0,055*	0,505±0,040*	0,396±0,028*

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

Показано, что через 2 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона содержание СМО в мембранах увеличивалось, в среднем, на 15,0 % по сравнению с контролем (на уровне тенденции). Через 4 часа инкубации эритроцитов отмечено увеличение содержания СМО на 35,0 % по сравнению с контролем, что наблюдается при всех длинах волн регистрации.

Через 6 часов инкубации эритроцитов в среде Фентона уровень, СМО возрастал, в среднем, в 2,0 раза по сравнению с контролем.

В цитозольной фракции эритроцитов содержание СМО также возрастало с увеличением времени инкубации эритроцитов в среде Фентона. Через 2 часа инкубации эритроцитов увеличение показателей было незначительным (в среднем, на 10,0 % по сравнению с контролем, на уровне тенденции), через 4 часа инкубации отмечено достоверное увеличение показателей, в среднем, на 25,0 % по сравнению с контролем. Через 6 часов инкубации эритроцитов уровень СМО в цитозольной фракции возрастал в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Таблица 4

**Содержание СМО в цитозольной фракции эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro***

Объект исследования	Среднемолекулярные олигопептиды, ед.опт.пл • мл <sup>-1</sup>		
	254 нм	275 нм	280 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)			
	0,620±0,030	0,435±0,028	0,284±0,016
Эритроциты после инкубации в среде Фентона в течение:			
2-х ч.	0,682±0,035*	0,479±0,030*	0,312±0,020*
4-х ч.	0,775±0,054*	0,544±0,038*	0,355±0,020*
6-ти ч.	0,930±0,064*	0,650±0,040*	0,406±0,024*

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

Следует отметить, что более выраженные изменения в образовании СМО прослеживаются в мембранах эритроцитов по сравнению с их цитозольной фракцией.

Из полученных данных видно, что как в мембранах, так и в цитозольной фракции эритроцитов, более выраженные изменения в направлении интенсификации претерпевают процессы окислительной модификации протеинов по сравнению с образованием среднемолекулярных олигопептидов. Это можно объяснить тем, что окислительная модификация отдельных аминокислотных остатков в протеинах не всегда сопровождается фрагментацией их молекул. В целом, это взаимосвязанные процессы, иллюстрирующие характер деструктивных изменений, осуществляемых на уровне молекул протеинов в процессе развития окислительного стресса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Установлено, что в условиях развития окислительного стресса *in vitro* в мембранах и цитозольной фракции эритроцитов усиливаются процессы окислительной модификации протеинов и образования среднемолекулярных олигопептидов.
2. Наиболее выраженные изменения в содержании среднемолекулярных олигопептидов в условиях развития окислительного стресса наблюдаются в мембранах эритроцитов по сравнению с их цитозольной фракцией.
3. В условиях развития окислительного стресса более выраженные изменения в направлении интенсификации претерпевают процессы окислительной модификации протеинов по сравнению с образованием среднемолекулярных олигопептидов, что прослеживается как в мембранах, так и в цитозольной фракции эритроцитов.

## Список литературы

1. Азизова О. А. Взаимосвязь маркеров окислительного стресса с клиническим течением хронической ишемии мозга / О. А. Азизова // Журнал 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. 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.
5. Елкина Н. М. Липидный состав и пероксидация липидов в эритроцитах при железодефицитной анемии / Н. М. Елкина, С. В. Коношенко // Уч. записки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. – 2015. – Т. 1(67), №1. – С. 25–29.
6. Елкина Н. М. Процессы пероксидации липидов и генерирование активных форм кислорода в эритроцитах больных кардиомиопатией / Н. М. Елкина, С. В. Коношенко // Уч. записки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. – 2015. – Т. 1(67), №1. – С. 30–35.
7. Новицкий В. В. Белковый спектр мембран эритроцитов у больных раком лёгкого и с опухолями головы и шеи / В. В. Новицкий, К. Г. Корешкова, Е. А. Степовая и др. // Бюл. экспер. биол. и медицины. – 1999. – Т. 127, Прил. 1. – С. 18–20.
8. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и др. // Вопр. медицинской химии. – 1996. – Т. 41, №1. – С. 24–26.
9. Йолкіна Н. М. Стан процесів пероксидації ліпідів, розпаду білків та активність окремих антиоксидантних ферментів в еритроцитах при ішемічній хворобі серця і кардіоміопатії / Н. М. Йолкіна, С. В. Коношенко, ІліасШашуа, Е. С. Крутіков, З. М. Мірмуїнова // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2011. – №4. – С. 52–56.
10. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and hemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1959. – V. 21. – P. 224–226.
11. Габриэлян Н. И. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях. / Габриэлян Н. И., Левицкий Э. Р., Дмитриев А. А. и др. – Методические рекомендации. – М.: Медицина, 1985 г. – 34 с.

## THE INDEXES OF DESTRUCTIVE PROCESSES IN ERYTHROCYTES UNDER MODEL OXIDATIVE STRESS IN VITRO

*Konoshenko S. V., Elkina N. M., Bolshakova A. A.*

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: svkonoshenko@inbox.ru*

The problem of oxidative stress is one of more actual in biology and medicine. It is known that oxidative stress is realized when the balance in prooxidative and antioxidative processes is destroyed [1–4]. Today we have many dates about that under some diseases with oxidative stress erythrocytes are involved in pathological processes as demonstrated by biochemical changes occurring in them [5–8]. In this regard, it is interest to examine the state of the processes of protein oxidative modification and formation of oligopeptides with average mass in membranes and cytosol fraction of erythrocytes under development of oxidative stress in vitro.

The materials for the study were the erythrocytes of healthy subjects (25 persons at 35–45 years old). Erythrocytes were incubated in Fenton system (10 mM FeSO<sub>4</sub> and 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 37 °C during 2, 4 and 6 hours. Membranes of erythrocytes were separated from erythrocytes (cytosol fraction) by method of centrifugation [9]. In membranes and cytosol fraction the content of proteins oxidative modification products and the content of oligopeptides with average mass were determined [10, 11].

It has been shown, that under development of oxidative stress in vitro in cytosol fraction and membranes of erythrocytes the processes of proteins oxidative modification and formation of oligopeptides with average mass are intensified. So, in membranes of erythrocytes the level of proteins oxidative modification products was raised at 2,0 times from 4 hours of incubation of erythrocytes in Fenton system, and at 3,13 times from 6 hours of incubation (as compared with control). In cytosol fraction the level these components of proteins oxidative modification was raised at 1,63 time, from 2 hours of incubation and at 2,0 times from 4 hours of incubation of erythrocytes. From 6 hours of incubation of erythrocytes in Fenton system the level of protein oxidative modification products was lowed.

The level of oligopeptides with average mass was raised also. So, in membranes of erythrocytes the level of these components was raised: at 15 % from 2 hours of incubation, at 35 % from 4 hours and at 2,0 times from 6 hours of incubation as compared with control. In cytosol fraction the level of oligopeptides was raised: at 10 % from 2 hours of incubation, at 25 % from 4 hours of incubation and at 1,5 times 6 hours.

The abstained dates evidence about intensification destructive processes in erythrocytes under oxidative stress.

**Keywords:** erythrocytes, proteins oxidative modification, oligopeptides, destructive processes, oxidative stress.

### 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., 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. Vladimirov U. A., The active forms of oxygen and nitrogen: significance for diagnostic, prophylactic and therapeutics, *Biochemistry*, **69**, **1**, 5 (2004).
5. Yolkina N. M., Konoshenko S. V., Lipids composition and rapids peroxidation in erythrocytes under iron-deficiency anemia, *Sc. notes of V.I. Vernadsky, Crimean Federal University*, **1(67)**, №1, 25 (2015).
6. Yolkina N. M., Konoshenko S. V., Processes of lipids peroxidation and oxygen active forms formation in erythrocytes of patients with cardiomyopathy, *Sc. notes of V. I. VernadskyTaurida University, Biology and Chemistry*, **1(67)**, **1**, 30 (2015).
7. Novitsky V. V., Koreshkova K. G., Stepovaja E. A. et al, Protein spectre of erythrocytes membranes of patients with lung cancer and tumor of head and neck, *Bul. experiment. biology and medicine*, **127**, **1**, 18 (1999).
8. Yolkina N. M., Konoshenko S. V., Shashuallias, Krutikov E. S., Mirmuminova Z. M., The state of processes of lipids peroxidation, proteins destruction, and activity of antioxidative enzymes in erythrocytes of patients with ischemic heart disease and cardiomyopathy, *Experiment and clinical physiology and biochemistry*, **4**, 52 (2011).
9. Drabkin D., A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline, *Arch. Biochem.*, **21**, 224 (1959).
10. Dubinina E. E., Burmistrev S. O., Hodov D. A. et al, Oxidative modification of proteins of human blood scarum, the method of their determination, *Voprosi medical chem.*, **41**, **1**, 24 (1996).
11. Gabrieljan N. I., Levitskiy E. R., Dmitriev A. A., et al, *Skimming method of identification of molecules with average mass in biological liquids*, Methodic recommendation, 34 (Moscow, Medicine, 1985).