

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭРИТРОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА¹

© 2004 Н.А. Кленова, О.Ю. Елистратова² Ю.Л. Полякова³

Изучено действие инициаторов окисления (Fe^{2+} + желточные липопротеиды) на фракцию чистых эритроцитов человека. Показано, что условия окислительного стресса приводят к стимуляции метгемоглобинообразования и деградации мембранных структур клетки. Рост повреждений мембран эритроцитов сопровождается активацией процессов расщепления клеточных белков и образованием биологически активных пептидов. Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии показали, что ряд идентифицированных пептидов является фрагментами цепей гемоглобина, что значительно увеличивает возможности участия эритроцитарных клеток в процессах регуляции организменного гомеостаза.

Введение

Различные экстремальные состояния сопровождаются возрастанием содержания в крови веществ, в основном пептидной природы, обладающих широким спектром биологической активности [1, 2]. В настоящее время рассматривается потенциальная возможность производства пептидных соединений внутри эритроцитарных клеток. Предполагается, что предшественником пептидных соединений может служить гемоглобин, так как известно уже более 150 биологически активных пептидов, являющихся по аминокислотной последовательности фрагментами этого белка [3]. В то же время механизмы активации процессов деградации гемоглобина в эритроцитах и секреции биологически активных пептидов еще до конца не выяснены. В частности, неизвестно как осуществляется этот процесс в условиях патологических изменений гомеостаза. Одним из наиболее общих повреждающих и в то же время регулирующих факторов развития патологических изменений в клетках и организмах, является скорость производства активных

¹Представлена доктором биологических наук профессором В.Г. Подковкиным.

²Кленова Наталья Анатольевна, Елистратова Ольга Юрьевна, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

³Полякова Юлия Львовна, Институт хроматографии (ИНХА), г. Сеул, Южная Корея.

форм кислорода (АФК) [4]. В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования стало изучение механизмов образования пептидных соединений в эритроцитах человека в условиях окислительного стресса.

1. Материалы и методы

Объектом исследований служила фракция чистых эритроцитов, полученных путем трехкратной отмывки забуференным раствором 0,154 М хлористого натрия. Режим центрифугирования и упаковки суспензии: 600g, 10 минут, 40 °С. Окислительный стресс вызывали добавлением 0,25 мМ раствора $FeSO_4 \times 7H_2O$ и желточных липопротеидов [5]. Добавка инициаторов окисления составила 100 мкл/мл. Инкубацию эритроцитов в среде Рингера—Локка (1:1) с инициаторами окисления проводили в водяном термостате при 37 °С в течение 30 минут. Для разделения эритроцитов и инкубационной среды пробы центрифугировали в режиме 1000g, 10 минут. В эритроцитах определяли соотношение форм гемоглобина [6, 7]; метгемоглобинредуктазную активность [8]; о состоянии мембраны эритроцитов судили по мембранной проницаемости [9], деформируемости [10], осмотической резистентности [11]; о метаболических процессах по скорости поглощения глюкозы эритроцитами (стандартный глюкозоксидазный метод) и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [12], об интенсивности окислительных процессов — по производству окисленных производных фосфолипидов (ФЛ) и холестерина (ХС) [13], малонового диальдегида [14]. Для изучения пептидных соединений, образованных внутри эритроцитов, суспензия эритроцитов подвергалась депротонированию 15% раствором трихлоруксусной кислоты в соотношении 0,5:1,5 (об. %). Смесь центрифугировалась в течение 15 минут (1000g) при 40 °С. Экстракты исследовались на содержание пептидов по методу Лоури [15] и уровню поглощения в УФ-области [16], а также подвергались изучению с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Waters 600S со спектрофотометрическим детектором Waters 2487 (λ -254 нм). Для приготовления подвижной фазы применяли ацетонитрил и бидистиллированную воду. Скорость элюирования составляла 1мл/мин. Объем вводимых проб — 10 мкл. В качестве стандартов использовали растворы пептидов (Aldrich, Sigma), 1 мг/л. Обработка результатов хроматографического анализа проводилась с помощью компьютерной программы Millenium (Waters).

2. Результаты исследований и их обсуждение

Добавление инициаторов окисления в инкубационную среду сопровождалось значительным ростом числа поврежденных клеток по сравнению с контролем. Так, мы отмечали рост числа эритроцитов с повышенным уровнем метгемоглобинообразования и фракцией мембраносвязанного гемо-

глобина. При этом наблюдалось снижение процента оксигемоглобина, увеличивались мембранная проницаемость клеток для мочевины и процент осмотически нестойких клеток, снижалась деформируемость эритроцитов. В мембранах отмечается активация процессов ПОЛ, так как растет уровень перекисленных продуктов фосфолипидов и холестерина, увеличивается скорость производства малонового диальдегида. В то же время наблюдаются уменьшение скорости поглощения глюкозы эритроцитами и уровень активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (табл. 1).

Таблица 1

Показатели состояния эритроцитов в условиях окислительного стресса

Показатели	Контроль	Окислительный стресс	P
Оксигемоглобин, %, $n = 22$	$48,33 \pm 0,07$	$38,43 \pm 0,09$	0,01
Метгемоглобин, %, $N = 22$	$1,46 \pm 0,14$	$2,93 \pm 0,12$	0,01
Мембраносвязанный гемоглобин, %, $n = 22$	$5,89 \pm 0,35$	$13,47 \pm 0,72$	0,01
НАДН-цитохром-b5-редуктаза, мМ/мин, $n = 24$	$4,62 \pm 0,09$	$11,44 \pm 0,21$	0,01
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, мкМ/мин, $n = 25$	$11,01 \pm 0,52$	$7,80 \pm 0,36$	0,05
Окил.продукты ФЛ, у.е. Диеновые конъюгаты Диеновые кетоны, $n = 10$	$0,473 \pm 0,006$ $0,231 \pm 0,005$	$0,6010,012$ $0,3150,008$	0,01 0,01
Окил.продукты ХС Диеновые конъюгаты Диеновые кетоны, $n = 10$	$0,4690,004$ $0,188 \pm 0,004$	$0,5230,008$ $0,244 \pm 0,006$	0,01 0,01
Мембранная проницаемость, % гемолиза, $n = 12$	$47,80 \pm 0,25$	$77,10 \pm 0,66$	0,01
Осмотическая резистентность, % гемолиза, $n = 12$	$30,41 \pm 0,71$	$62,90 \pm 0,56$	0,001
Деформируемость, у.е., $n = 15$	$0,84 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,04$	0,01

Все это свидетельствует о нарастании дезинтеграционных процессов в клетках за счет дисбаланса между скоростью производства АФК и возможностью их утилизации в системах антиоксидантной защиты. Мы предположили, что в условиях ускорения деградации фосфолипидного слоя мембран возможной становится активация высокоспецифических протеаз при мембранного комплекса протеолитических ферментов, что изменяет скорость и характер пептидов, образующихся в эритроцитах. Существование данного комплекса ферментов, а также высокая специфичность протеаз по отношению к определенным пептидным связям молекул глобина показаны в работах [3].

Изучение спектров поглощения в УФ-области спектра показало, что добавление инициаторов окисления сопровождается увеличением уровней поглощения при 250–254 нм и 274–308 нм (табл. 2). Недостоверное изменение поглощения можно отметить в области от 258 до 270 нм, что соответствует области поглощения среднемолекулярных пептидов. При этом обнаруживается и увеличение содержания пептидов, определяемых по методу Лоури (см. рисунок).

Таблица 2

**УФ-спектры поглощения среднемолекулярных соединений
ТХУ-экстрактов эритроцитов при инкубации их в условиях
окислительного стресса, $n = 26$, у.е.**

Длина волны, нм	Контроль	Окислительный стресс	P
250	$13,55 \pm 1,43$	$21,31 \pm 1,51$	0,01
254	$36,82 \pm 1,58$	$42,22 \pm 1,86$	0,05
258	$48,15 \pm 1,72$	$52,23 \pm 2,07$	0,1
264	$50,33 \pm 1,67$	$53,48 \pm 2,05$	0,1
270	$40,01 \pm 1,37$	$43,57 \pm 1,64$	0,1
274	$29,50 \pm 1,06$	$33,48 \pm 1,31$	0,05
278	$20,37 \pm 0,88$	$24,80 \pm 1,08$	0,01
282	$14,12 \pm 0,77$	$18,65 \pm 0,95$	0,01
288	$8,00 \pm 0,73$	$12,29 \pm 0,88$	0,01
292	$5,54 \pm 0,69$	$9,54 \pm 0,83$	0,01
296	$4,23 \pm 0,61$	$7,63 \pm 0,81$	0,01
300	$3,40 \pm 0,58$	$6,31 \pm 0,72$	0,01
304	$2,90 \pm 0,55$	$5,43 \pm 0,66$	0,01
308	$2,50 \pm 0,53$	$4,80 \pm 0,63$	0,01

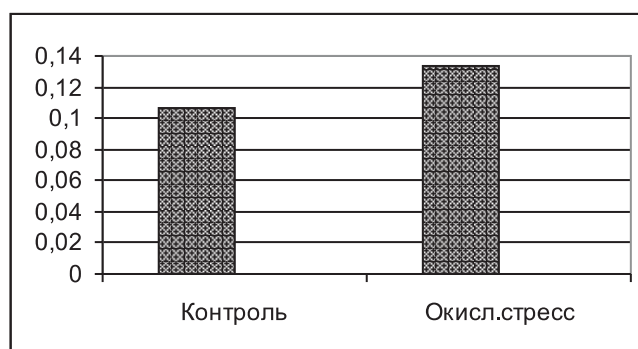


Рис. Содержание пептидных соединений в ТХУ-экстрактах эритроцитов (мг/мл) при инкубации в условиях окислительного стресса. Достоверность отличий — $P < 0,05$

Таким образом, в условиях окислительного стресса внутри эритроцитов увеличивается содержание пептидных соединений. Так как максималь-

ное увеличение УФ-поглощения экстрактами мы наблюдали при длинах волн 300–308 нм, то можно предположить ускорение производства длинных пептидных соединений, являющихся фрагментами расщепляющихся белков, преимущественно гемоглобина. Проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии с частичной идентификацией пептидов, показало, что площади пиков большинства идентифицированных пептидных фрагментов гемоглобина уменьшаются, кроме пентапептида, фрагмента альфа-цепи, биологическая активность которого не установлена (табл. 3). Возможно, снижение уровня содержания ряда идентифицированных пептидов не связано с уменьшением скорости их образования в эритроцитах (тем более, что общий уровень пептидов растет), а представляет собой результат более быстрого поступления их в окружающую среду. Это обусловлено, прежде всего, повреждением мембранных структур и ускорением потока веществ из клетки.

Таблица 3

**Площади пиков и биологическая активность пептидов,
идентифицированных с помощью высокоэффективной жидкостной
хроматографии**

Пептид	Пробы	Площадь пика	Биологическая активность
Thr-Ser-Leu-Tyr-Arg	Контроль Окис.стресс	21272 38985	Фрагмент альфа-цепи гемоглобина, неизвестна
Val-His-Leu-Thr-Arg-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala-Val	Контроль Окис.стресс	4700809 4028904	Рилизинг-фактор соматотропного гормона
Val-His-Leu-Thr-Pro-Gly-Glu-Lys-Ser-Ala-Val	Контроль Окис.стресс	5132 нет	Неизвестна
Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-His-Arg-Arg-Tyr-His	Контроль Окис. стресс	372763 180496	Фрагмент бета-цепи гемоглобина, гемопоэтическая активность?
Ala-Leu-Thr-Gly-Lys-Val-Asn-Val	Контроль Окис.стресс	1102837 381432	Бета-цепь, гемопоэтическая активность

Развитие цепных реакций перекисного окисления липидов приводит к ускорению деструкции мембран. Появление в гидрофобном слое полярных групп, принадлежащих гидроперекисям, нарушает связи между фосфолипидами и белками [17], что обуславливает нарушение целостности, проницаемости и механической прочности мембран. Усиление перекисления липидов может вызвать не только изменения в фосфолипидном слое, но и мембранных белков, приводя к их полимеризации [18]. Все вышеизложенное может служить причиной активации мембранного комплекса протеаз и усиления дегградации гемоглобина. Формирование же крупных пор в мембране за счет увеличения содержания лизофосфатидов будет способствовать ускорению их поступления в окружающую среду.

Таким образом, нарушение равновесия между скоростью производства АФК и их утилизацией в эритроцитах не только ведет к ускорению повреждения клеток, но и может сопровождаться увеличением выделения эрит-

роцитами в плазму крови биологически активных пептидных соединений. Широкий спектр регуляторных свойств пептидов, являющихся фрагментами цепей гемоглобина, открывает заманчивые перспективы на возможность управления регуляторной функцией эритроцитов. Весьма вероятно, что существует несколько механизмов активации протеаз, причем реализация их может быть непосредственно связана со специфичностью действия. Часть протеолитических ферментов, как показали наши исследования, активируется в условиях ускорения ПОЛ и деградации фосфолипидов и зависит от степени повреждения мембран эритроцитов.

Литература

- [1] Галактионов С.Г., Цейлин В.М., Леонова В.И. и др. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. №1. С. 5–17.
- [2] Гипоксия критических состояний. М.: Медицина, 1987. 288 с.
- [3] Карелин А.А., Филиппов М.М., Яцкин О.Н. Протеолитическая деградация гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию биологически активных пептидов // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. №4. С. 271–281.
- [4] Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Усп. совр. биол. 1993. Т. 113. Вып. 3. С. 286–296.
- [5] Клебанов Г.И., Бабенкова И.А., Теселкина Ю.О. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лаб. дело. 1988. №5. С. 59–60.
- [6] Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М. Жаботиновский А.М. Стационарная зависимость скорости восстановления гемоглобина от его концентрации в интактных эритроцитах человека // Биохимия. 1984. Т. 49. Вып. 2. С. 193–197.
- [7] Заводник И.Б., Лапшина Е. А. Процессы окисления гемоглобина человека // Биохимия. 1996. Т. 61. Вып. 1. С. 42–48.
- [8] Козлов Н.М., Черницкий Е.А. Зависимость активности метгемоглобин-редуктазы эритроцитов человека от температуры // Биохимия. 1994. Т. 56. Вып. 2. С. 342–345.
- [9] Кадывкина З.М., Колмаков В.М., Радченко В.Г. Проницаемость эритроцитарных мембран у больных с хроническими заболеваниями печени // Клиническая медицина. 1987. №8. С. 157–159.
- [10] Tannert T.C., Lux K. Spreading of red cell blood suspensions on paper as a simple of cell deformability // Acta biol. med. germ. 1981. V. 40. P. 739–742.
- [11] Петренко Ю.М., Владимиров Ю.А. Роль поверхностного заряда в поддержании осмотической резистентности // Гематология и трансфузиология. 1987. №10. С. 15–19.

- [12] Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency // Am. J. Clin. Pathol. and Clin. med. V. 63. No. 3. P. 203.
- [13] Костюк Б.А. Использование системы гептан-изопропанол для экстракции первичных продуктов перекисного окисления липидов // Укр. биох. журнал. 1991. Т. 63. №1. С. 98–101.
- [14] Андреева Л.И., Кожемякина Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. №11. С. 41–43.
- [15] Большой спецпрактикум по биохимии / Сост. Н.А. Кленова. Самара: Изд-во Самарского гос. ун-та, 1996. 88 с.
- [16] Горанчук В.В., Шустов Е.Б., Андреева Л.И. и др. Биохимические детерминанты и механизмы развития экстремальной гипоксической гипоксии // Физиол. человека. 1999. Т. 25. №4. С. 118–123.
- [17] Кричевская А.А., Лукаш А.И., Бронивицкая З.Г. Биохимические механизмы кислородной интоксикации. Ростов н/Д: Изд-во Рост. гос. ун-та, 1980. 120 с.
- [18] Микаелян Н.П., Князев Ю.А., Микаелян А.Е. и др. Состояние липид-белковых комплексов в мембране эритроцитов при позднем гестозе // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2001. Т. 132. №7. С. 80–83.

Поступила в редакцию 8/XII/2003;
в окончательном варианте — 8/XII/2003.

FORMATION OF PEPTIDES CONNECTIONS IN ERYTHROCYTES AFTER OXIDATIVE STRESS⁴

© 2004 N.A. Klenova, O.J. Elistratova⁵, J.L. Polyakova⁶

The operation of the initiators of an oxidizing (Fe^{2+} + lipoproteins) on a fraction of pure erythrocytes of a man is investigated. It is shown, that conditions of an oxidative stress reduce in a stimulation of methaemoglobin forming and degradation of membrane frames of a cell. The body height of damages of diaphragms of erythrocytes is accompanied by activation of processes of splitting of cell-like protein and derivation biologically of fissile peptides. The outcomes of a high performance fluid chromatography show, that the number of identified peptides are fragments of chains of haemoglobin. This is considerably enlarges possibilities of involvement erythrocytes during a regulation of homeostasis.

Paper received 8/XII/2003.

Paper accepted 8/XII/2003.

⁴Communicated by Dr. Sci. (Phys. & Math.) Prof. V.G. Podkovkin.

⁵Klenova Nataliya Anatolievna, Elistratova Olga Yuryevna, Dept. Of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁶Poljakova Julia Ljvovna, INChA, Seoul, Korea.