

УДК 577.112.4:598/599+591.1

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *IN VITRO* НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И УРОВЕНЬ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ AMPHIBIA И MAMMALIA

Никольская В. А.

Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, 060394178@mail.ru

Проведены исследования биохимических показателей сыворотки крови у *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Amphibia) и *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 (Mammalia) в условиях окислительного стресса. Установлены различия в содержании продуктов окислительной модификации белков и уровня молекул средней массы в сыворотке крови данных представителей, усиливающиеся под влиянием окислительного стресса, инициированного средой Фентона.

Ключевые слова: окислительный стресс, среда Фентона, молекулы средней массы, сыворотка крови, Amphibia, Mammalia.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что любой адаптивный процесс протекает на фоне образования активных форм кислорода и усиления свободнорадикального окисления биосубстратов [1, 2]. Конечный результат процесса адаптации – приспособление организма к новым условиям окружающей среды определяется в итоге взаимоотношением прооксидантных и антиоксидантных механизмов, иными словами, способностью организма инактивировать избыток свободных радикалов и перекисей [3, 4]. Учитывая то обстоятельство, что эволюционные изменения, могли привести к изменению реакции на различные стрессы, в том числе окислительный, весьма актуальным представляется оценка состояния процессов окислительной модификации белков и уровня молекул средней массы у представителей разных классов.

Таким образом, целью исследования явилось изучение воздействия модели окислительного стресса (среды Фентона) на показатель окислительной модификации белков и содержание молекул средней массы в сыворотке крови *Rana ridibunda* (Amphibia) и *Sus scrofa* (Mammalia).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований послужили лягушка озерная (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) и свинья (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758).

Rana ridibunda относится к классу земноводные (Amphibia), отряду бесхвостые (Anura), подотряду Diplasiocoela.

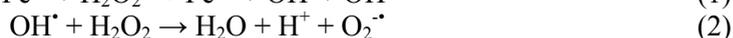
Sus scrofa относится к классу млекопитающие (Mammalia), отряду парнокопытные (Artiodactyla), подотряду нежвачные (Nonruminantia), семейству свиньи (Suidae), роду *Sus*.

Эти виды выбраны для изучения, так как являются типичными представителями класса Amphibia и Mammalia.

Материалом исследований служила сыворотка крови *Rana ridibunda* и *Sus scrofa* до (в исходном состоянии) и после 15 минутной инкубации в среде Фентона, содержащей 10 мМ FeSO₄ и 0,3 мМ H₂O₂.

Содержание продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови определяли по методу Е. Е. Дубининой и др. [5]. Уровень молекул средней массы определяли по методу Н. И. Габриэлян и др. [6]. В качестве модели воздействия окислительного стресса использовали среду Фентона, содержащую раствор 10 мМ сернистого железа и 0,3 мМ перекиси водорода [7]. Инкубацию осуществляли в течение 15 минут.

Среда Фентона является источником свободных радикалов кислорода по реакции:



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных свидетельствует о достоверных отличиях в содержании продуктов окислительной модификации белков крови у представителей разных классов в исходном состоянии (до воздействия окислительного стресса) (табл. 1).

Таблица 1

Содержание продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови *Rana ridibunda* и *Sus scrofa* до и после инкубации в среде Фентона, ед. опт. пл. (M±m)

Исследуемый материал	Длина волны, нм	<i>Rana ridibunda</i> n=18	<i>Sus scrofa</i> n=18
Сыворотка крови до инкубации	356	0,381±0,001**	0,131±0,002
	370	0,027±0,002**	0,150±0,003
	430	0,024±0,001**	0,138±0,002
	530	0,018±0,002**	0,033±0,002
Сыворотка крови после инкубации	356	0,346±0,001* **	0,146±0,003*
	370	0,022±0,001**	0,159±0,003*
	430	0,020±0,002**	0,142±0,002
	530	0,016±0,001**	0,042±0,002*

Примечание к таблице: * – достоверность различий показателя при воздействии среды Фентона по сравнению с исходным состоянием (p<0,05); ** – достоверность различий показателя у *Rana ridibunda* по сравнению с *Sus scrofa* (p<0,05).

Показано, что у *Rana ridibunda* уровень продуктов окислительной модификации изначально отличается от данного показателя у *Sus scrofa*: для λ регистрации 356 нм и 530 нм (альдегиды нейтрального характера и кетоны основного характера) отмечена исходная разница изученного показателя в 2 раза ($p < 0,05$); для λ регистрации 370 нм и 430 нм (кетоны нейтрального характера и альдегиды основного характера) – в 5,7 раз ($p < 0,05$).

Таким образом, отмечена определенная закономерность в распределении и содержании окисленных форм белков у *Rana ridibunda* и *Sus scrofa*. Возможно, разный уровень окислительных процессов белков у представителей двух классов обусловлен, прежде всего, интенсивностью метаболических процессов у *Rana ridibunda* и *Sus scrofa*, и, в определенной мере, различием аминокислотного состава белков, функционирующих в русле крови [8].

Полученные данные свидетельствуют о том, что окислительная модификация белков является нормальным биохимическим процессом, наблюдающимся как у гомойотермных, так и у пойкилотермных животных с той лишь разницей, что у первых этот процесс протекает более активно, о чем свидетельствуют достоверные различия в содержании окисленных продуктов белков. Возможно, окислительная модификация белков является одним из видов постсинтетической модификации белков, которая, как известно, может увеличивать сродство белков к определенным веществам различных структур организма [9, 10].

Воздействие окислительного стресса приводит к увеличению разницы в содержании продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови между *Rana ridibunda* и *Sus scrofa* за счет, прежде всего, повышения уровня данного показателя у представителя Mammalia на 10–20% по сравнению с исходным состоянием.

Полученные результаты интересны с той точки зрения, что у представителей двух классов Amphibia и Mammalia воздействие среды Фентона приводит к изменениям изученного показателя разного уровня интенсивности.

Выявлено, что белки сыворотки крови *Sus scrofa* в большей степени подвержены окислительной модификации. Это вызывает несомненный интерес, поскольку такая модификация может являться регуляцией координированного действия энзимов в разных тканях и органеллах на доступный белок. В литературе имеются данные о том, что окисление белков приводит к их деградации, с образованием соответствующих пептидов [11, 12], а, как известно низкомолекулярные соединения – пептиды играют важную роль в регуляции метаболических процессов, и особенно при стрессовом воздействии [13, 14].

Поэтому представляло интерес оценить степень образования молекул средней массы в сыворотке крови представителей двух классов. Уровень молекул средней массы в сыворотке крови *Rana ridibunda* в исходном состоянии достоверно ниже, чем у *Sus scrofa*, при этом соотношение данного показателя после инициации окислительных процессов имеет приблизительно тот же характер. Так, содержание молекул средней массы у *Rana ridibunda* до и после воздействия окислительного стресса, зарегистрированное при длине волны 254 нм, практически в 2,5 раза ниже, при $\lambda = 272$ – в 8,5, а при $\lambda = 280$ – в 7 раз по сравнению с *Sus scrofa*.

Вероятно, изначально значительные расхождения уровня изученного показателя у представителей Amphibia и Mammalia связаны с тем, что при переходе к более высокому уровню организации усиливается и роль молекул средней массы в регуляции метаболических процессов, а также проявлении их антиоксидантной активности [15, 16].

После инициации окислительных процессов в сыворотке крови *Sus scrofa* наблюдаются разнонаправленные изменения содержания молекул средней массы, регистрируемых на разных длинах волн (рис.1).

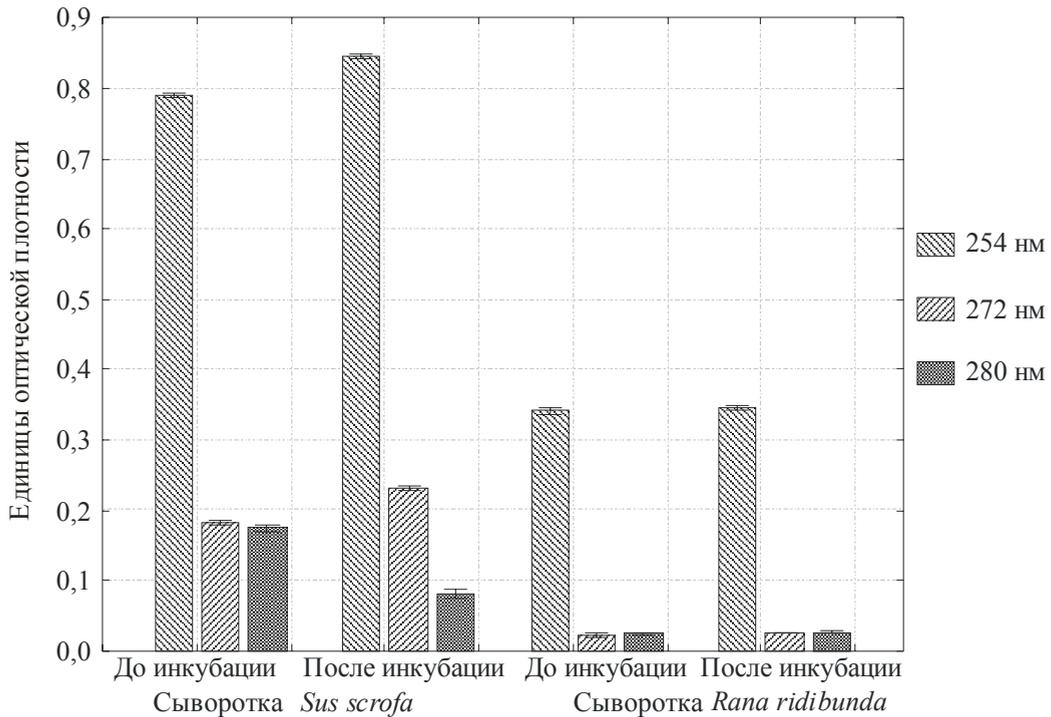


Рис. 1. Содержание молекул средней массы в сыворотке крови *Rana ridibunda* и *Sus scrofa* до и после инкубации в среде Фентона

Так уровень молекул средней массы при λ регистрации 254 и 272 нм увеличивается на 10–20% ($p < 0,05$), а при $\lambda = 280$ нм – уменьшается на 50% ($p < 0,05$). Вероятно, снижение молекул средней массы при 280 нм обусловлено уменьшением свободного триптофана и триптофансодержащих среднемолекулярных олигопептидов. При окислении олигопептидов и белков гидроксильным радикалом и синглетным кислородом происходит фрагментация белков. Одновременно происходит разрушение триптофана. Триптофан и тирозин подвергаются окислительным превращениям, которые сопровождаются модификацией аминокислотных остатков, образованием внутри- или межмолекулярных сшивок между полипептидными цепями, снижением уровня триптофана и значительной

продукцией битирозинфенола [5, 6, 17]. Не исключена вероятность влияния определенного уровня окисления белковых структур на их последующую метаболизацию с образованием молекул средней массы.

Для *Rana ridibunda* отмечена тенденция к изменению данного показателя в сыворотке крови.

Можно предположить, что такой рода изменения изученных показателей связаны с тем, что, приобретая высокую специализацию, организм с высшим уровнем организации утрачивает свойства широкой приспособляемости с последующим уменьшением устойчивости к изменению определенного фонового режима.

Возможно, выявленные изменения имеют существенное значение при переходе на другой уровень организации с высоким уровнем метаболизма, так как при повышении количества компонентов системы регуляции, в частности молекул средней массы увеличивается и потенциал коррекции метаболических изменений, происходящих в организме при различных видах воздействия, в том числе и стрессового характера.

ВЫВОДЫ

1. При инициации окислительных процессов *in vitro* наблюдается повышение содержания продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови представителя класса Mammalia.

2. Под влиянием окислительного стресса в сыворотке крови у *Sus scrofa* происходит повышение уровня молекул средней массы, зарегистрированных при длине волны 254 и 272 нм и снижение в 2,2 раза при λ регистрации 280 нм.

3. В аналогичных условиях у *Rana ridibunda* изменений уровня молекул средней массы не наблюдается.

Список литературы

1. Соколовский В.В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие / В.В. Соколовский // Вопр. мед. химии. – 1988. – № 34 (6). – С. 2–11.
2. Соколовский В.В. Тиоловые соединения и ацетилхолинэстераза эритроцитов при экспериментальном иммобилизационном стрессе / [В.В. Соколовский, Л.Л. Гончарова, Л.А. Покровская и др.] // Междунар. мед. обзоры. – 1993. – № 3. – С. 194–196.
3. Соколовский В.В. Антиоксидантная система / В.В. Соколовский, В.Г. Макаров, В.М. Тимофеева // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1988. – Т. 24. – Вып. 5. – С. 771–774.
4. Зайцев В.Г. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / В.Г. Зайцев, В.И. Закревский // Вестник Волгоградской медицинской академии. – 1998. – Вып. 3. – С. 49–53.
5. Дубинина Е. Окислительная модификация белков / Елена Дубинина, Владимир Шугалей // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 1. – С. 71–81.
6. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях. Метод. рекоменд. / [Н.И. Габриэлян, Э.Р. Левицкий, А.А. Дмитриев и др.] – М.: Медицина, 1985. – 18 с.
7. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / [Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, вып.1. – С. 24–26.

8. Соркина Д.А. Структурно-функциональные свойства белков / Д.А. Соркина, И.Н. Залевская. – К.: Вища школа. – 1990. – 216 с.
9. Кометиани З.П. Кинетика мембранных транспортных ферментов / З.П. Кометиани, М.Г. Векуа. – Москва: Высшая школа, 1988. – 111 с.
10. Введение в биомембранологию / [А.А. Болдырев, С.В. Котелевцева, М. Ланио и др.]. – Изд-во Московского ун-та, 1990. – 208 с.
11. Осипова А.П. Активные формы кислорода и их роль в организме / А.П. Осипова, О.А. Азизова, Ю.А. Владимиров // Успехи биол. химии. – 1990. – Т. 31. – С. 180–208.
12. Осипович В.К., Туликова З.А., Маркелов И.М. Сравнительная оценка экспресс-методов определения средних молекул / В.К. Осипович, З.А. Туликова, И.М. Маркелов // Лаб. дело. – 1987. – Вып. 3. – С. 221–224.
13. Фархутдинов Р.Р. Свободно-радикальные процессы в норме и при патологии / Р.Р. Фархутдинов, Н.Т. Бикбулатов // Советская медицина. – 1983. – Вып. 9 – С. 69–72.
14. Шугалей И.В. Влияние интоксикации нитритом натрия на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессы пероксидации в эритроцитах мыши / И.В. Шугалей, С.Н. Львов, И.В. Целинский, В.И. Баев // Укр. биохим. журнал. – 1992. – Т. 64. – Вып. 2. – С. 111–114.
15. Абакумова Ю.В. Свободнорадикальное окисление при атеросклерозе как патогенный фактор / Ю.В. Абакумова, Н.А. Ардаматский // Медико-биологический вестник им. Я.Д. Витебского. – 1996. – Т. 21. – Вып. 2. – С. 15–21.
16. Калуев А.В. Выполняют ли регуляторную роль в клетке взаимодействия АФК с ДНК? / Калуев А.В. // Український біохімічний журнал. – 1999. – Т. 71. – Вып. 2. – С. 104–108.
17. Гаврилов В.Б. Определение тирозин- и триптофансодержащих пептидов в плазме крови по поглощению в УФ-области спектра / В.Б. Гаврилов, Н.Ф. Лобко, С.В. Конев // Клин. лаб. диагн. – 2004. – Вып. 3. – С. 12–16.

Нікольська В. О. Вплив окислювального стресу *in vitro* на процеси окисної модифікації білків та рівень молекул середньої маси в сироватці крові представників Amphibia і Mammalia // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2010. Вип. 2. С. 158–163.

Проведено дослідження біохімічних показників сироватки крові *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Amphibia) і *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 за умов окислювального стресу. Встановлено відмінності у вмісті продуктів окисної модифікації білків та рівня молекул середньої маси в сироватці крові даних представників, що підсилюються під впливом окислювального стресу, ініційованого середовищем Фентона.

Ключові слова: окислювальний стрес, середа Фентона, молекули середньої маси, сироватка крові, Amphibia, Mammalia.

Nikolskaya V. A. Effect of oxidative stress *in vitro* on the oxidative modification of proteins and the level of molecules, the average weight in the serum of representatives Amphibia and Mammalia // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2010. Iss. 2. P. 158–163.

The investigation of biochemical parameters of blood serum of *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Amphibia) and *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 (Mammalia) under oxidative stress is conducted. The differences in the content of products of oxidative modification of proteins and the level of molecules, of the average weight in the serum is established. This effect growing under the influence of oxidative stress, initiated by the Fenton's environment.

Key words: oxidative stress, Fenton environment, a molecule of average weight, blood serum, Amphibia, Mammalia.

Поступила в редакцію 25.11.2010 г.