

# ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.125:576.34:615.27.014.425

## СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КЛЕТКАХ

Н.В. Канская

ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск  
E-mail: nataliya\_w\_2006@mail.ru

## THE METHOD FOR REGULATION OF LIPID PEROXIDATION IN THE CELLS

N.V. Kanskaya

Siberian State Medical University, Tomsk

Впервые разработана защита клеток от перекисления, оцениваемая после стимуляции антиоксидантной активности низкими концентрациями 1,4-дителиоэритрипола и аскорбиновой кислоты в концентрации 3,0 и 0,1 ммоль соответственно.

**Ключевые слова:** перекисное окисление липидов, прооксидантная и антиоксидантная системы клеток и их стимуляция.

Here we present the method for protecting the cells from peroxidation by simultaneous stimulation the pro- and anti-oxidant systems with 1,4-dithioerythritol 3.0 mM and ascorbic acid 0.1 mM.

**Key words:** lipid peroxidation, pro-oxidant system, anti-oxidant system, stimulation.

### Введение

В организме человека функционирует одновременно как про-, так и антиоксидантная система, нейтрализующая токсичные гидроксирадикалы.

Известен процесс активации антиоксидантной активности путем определения роста общего содержания SH-групп белков. Известен также способ косвенного определения содержания восстановленного глутатиона по активности глутатионпероксидазы, однако активность этого фермента зависит от конформации активного центра фермента. При этом его активность меняется, что не позволяет с высокой точностью оценить уровень восстановленного глутатиона.

Известен также способ определения антиоксидантной активности по содержанию восстановленного глутатиона, предложенный М.Е. Anderson (1985) в модификации S. Kojima et al. (2004), основанный на взаимодействии восстановленного глутатиона (GSH) с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ). При этом образуется окисленный глутатион (GSSG), который затем восстанавливается и вновь взаимодействует с ДТНБ (1, 2, 3).

При активации оксидантной системы возрастает образование  $\cdot\text{OH}$ , что показано в ходе микросомального окисления, окисления арахидоновой кислоты, в реакци-

ях с флавиновыми ферментами, убихиноном, пероксинитритом. В ряде исследований клеток *in vitro* получены свидетельства продукции  $\cdot\text{OH}$  данными клетками. Изучение этих реакций зачастую основывалось на использовании ингибиторов и измерении уровня вторичных продуктов. Следовательно, реакции, инициированные  $\cdot\text{OH}$ , могли быть вызваны другими оксидантами, в частности  $\text{O}_2^{\cdot-}$  или гипохлорной кислотой.

Генерация  $\cdot\text{OH}$  стимулированными клетками в очаге воспаления может существенно лимитироваться отсутствием в среде ионов железа. Исследование реакции Фентона в клетках выявило, что блокирование ионов железа лактоферрином ингибирует непосредственно саму реакцию, а утилизация  $\text{H}_2\text{O}_2$  миелопероксидазой ограничивает реакцию, даже если железо доступно. Хотя большинство биологических форм железа каталитически неактивно, показана способность клеток к продукции  $\cdot\text{OH}$  в присутствии трансферрина, подверженного протеолитической деградации.

С помощью чувствительных спиновых меток обнаружена наработка гидроксил-радикала клетки *in vitro* в результате реакции  $\text{HOCl}$  и  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , причем преобразованию в  $\cdot\text{OH}$  подверглась очень небольшая часть использованного клетками кислорода. Вопрос о том, достаточно ли такого количества  $\cdot\text{OH}$ , чтобы играть существенную роль в

цитотоксичности, до сих пор остается открытым. Здесь необходимо учитывать, что гораздо большей бактерицидной способностью  $\cdot\text{OH}$  обладает в присутствии  $\text{Cl}^-$  с последующим образованием гипохлорита.

Гидроксильный радикал представляет собой один из наиболее реакционно-способных окислителей и может взаимодействовать почти с любой молекулой клетки. Он модифицирует дезоксирибозу и азотистые основания ДНК, окисляет молекулы белков, углеводов и липидов. Особенно активно  $\cdot\text{OH}$  в ходе реакций перекисного окисления липидов атакует фосфолипиды, содержащие в жирнокислотных радикалах ненасыщенные связи, что ведет к образованию гидроперекисей.

Антиоксидантная система направлена на эффективную нейтрализацию гидроксирадикалов и снижение токсичной для организма гидроперекиси. Гидроксильный радикал ( $\cdot\text{OH}$ ) участвует в микробицидном и цитотоксическом действии нейтрофилов, моноцитов и Т-лимфоцитов. Есть два основных механизма синтеза  $\cdot\text{OH}$  нейтрофилами: первый – образование из пероксида водорода в присутствии металлов переменной валентности в так называемой “реакции Фентона”:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ , второй – в ходе ряда реакций с участием гипохлоридов:  $\text{HOCl} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{Cl}^- + \text{O}_2$  или взаимодействие гипохлорита с ионами  $\text{Fe}^{2+}$ . Следовательно, если в клетке нет металлов переменной валентности в свободном состоянии, для нее реакция Фентона и подобные реакции не будут опасными.

В клетках предусмотрен ряд защитных реакций по блокированию свободных ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Cu}^+$ . Например, активированные клетки синтезируют лактоферрин, связывающий свободное железо и переводящий его в каталитически неактивную форму, а также продуцируют высокие концентрации таурина, конъюгирующего с гипохлоритом и защищающего клетку от его токсичных эффектов [1–4, 6].

Основным компонентом антиоксидантной системы является восстановленная форма глутатиона. Глутатион – трипептид (L- $\gamma$ -глутамил-L-цистеилглицин) с молекулярной массой 307 Da занимает особое место среди SH-содержащих соединений. Наличие  $\gamma$ -глутамильной связи защищает трипептид от ферментативной деградации. В организме глутатион присутствует в двух формах: окисленной – GSSG и восстановленной – GSH, причем содержание GSH в клетках на несколько порядков выше, чем GSSG. По данным P. Pietarinen-Runtti et al. (2000), концентрация GSH в нейтрофилах составляет около 5 нмоль/мг белка. Содержание глутатиона в сыворотке крови здоровых людей незначительно, поэтому клетки основную потребность в GSH обеспечивают путем нематричного синтеза в ходе двух последовательных реакций, катализируемых  $\gamma$ -глутамилцистеин-синтетазой (КФ 6.3.2.2) и глутатион-синтетазой (КФ 6.3.2.3). Лимитирующим звеном синтеза является образование  $\gamma$ -глутамилцистеина, зависящее от наличия L-цистеина и его способности окисляться в L-. В то же время недостаточность глутатион-синтетазы способствует развитию окислительных повреждений в нейтрофилах [4, 5, 7].

Глутатион при физиологических значениях pH имеет две анионные карбокси-группы, положительно заря-

женную аминогруппу и SH-группу цистеинового остатка, которая придает GSH свойства восстановителя и способность быстро обезвреживать свободные радикалы и АФК. Глутатион является типичным тиолом и, участвуя в одноэлектронных восстановительных реакциях, становится  $\text{GS}^\cdot$ , который димеризуется до GSSG, легко реагирующего со свободными SH-группами. Второй тип окислительно-восстановительных превращений с участием GSH – это реакции тиолдисульфидного обмена, которые известны как основной путь образования смешанных дисульфидов глутатиона с белками (белок-SGS), и играют роль в регуляции биологических процессов. В реакциях третьего типа происходит двухэлектронное окисление глутатиона с образованием интермедиата, который реагирует со второй молекулой GSH (получение GSSG) или иной молекулой (синтез смешанного дисульфида).

GSH является стабилизатором мембран. Он защищает клеточные структуры клеток от высокотоксичного  $\text{OCI}^-$ , при этом GSH превращается в глутатион-сульфонамид и дегидроглутатион. Связывая NO, глутатион образует токсичные для клетки нитрозильные комплексы [5–7].

К природным антиоксидантам относят также аскорбиновую кислоту, которая играет важную роль в развитии окислительного стресса в организме.

Аскорбиновая кислота реализует свое антиоксидантное действие в плазме, межклеточной жидкости и на внеклеточном уровне. В организме человека аскорбиновая кислота преимущественно представлена в L-форме. Стрессовые ситуации увеличивают количество метаболитов витамина C в виде дегидроаскорбиновой кислоты.

Аскорбиновая кислота и дегидроаскорбиновая кислота играют активную роль в нескольких процессах, включая защиту от инфекции, повышении иммунитета, в процессах заживления ран, а также принимая участие в образовании антистрессовых гормонов. Аскорбат является кофактором дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, которая катализирует синтез норадреналина и других катехоламинов. Аскорбиновая кислота является восстановителем для L-пролингидроксилазы, которая необходима для синтеза коллагена и соединительной ткани в целом. В организме с участием аскорбиновой кислоты происходит регенерация  $\alpha$ -токоферола из токофероксильного радикала. Окислительный стресс коррелирует с ухудшением секреции инсулина, а терапия аскорбиновой кислотой прерывает повреждающее действие свободных радикалов, уменьшает степень проявления инсулиновой резистентности. Ионы аскорбата являются одним из активных элементов системы антиоксидантной защиты, предохраняя липиды от окисления их пероксидными радикалами. Антиоксидантный эффект аскорбата проявляется при достаточном количестве других антиоксидантов, таких как  $\alpha$ -токоферол и глутатион. Глутатион восстанавливает дегидроаскорбиновую кислоту прямым и неферментативным путем до аскорбиновой кислоты. Эта реакция является одним из основных механизмов антиоксидантной системы, часто описываемых как восстановительные циклы – глутатион/глутатиондисульфид и аскорбиновая/дегидроаскорбиновая кислота. При этом клетки периферических тканей поглощают экзогенную дегидроаскорбиновую кислоту и в присутствии глутатиона конвертиру-

ют ее в цитоплазме в аскорбиновую кислоту. Восстановление глутатиондисульфида в глутатион катализируется глутатион редуктазой и требует участия NADPH в качестве кофактора. Недостаточность глутатиона снижает содержание аскорбиновой кислоты в тканях и одновременно повышает концентрацию дегидроаскорбиновой кислоты.

При недостатке  $\alpha$ -токоферола и глутатиона может превалировать прооксидантный эффект аскорбата и его метаболитов. Прооксидантный эффект аскорбиновой кислоты может наблюдаться не только при недостатке  $\alpha$ -токоферола и глутатиона, но и при применении высоких доз аскорбиновой кислоты. Избежать прооксидантного эффекта аскорбиновой кислоты можно в случае создания адекватного внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона.

При этом роль антиоксидантной системы клетки заключается в снижении токсического эффекта свободных радикалов, в том числе и гидроперекисей липидов [1–4].

Антиоксидантную защиту обеспечивает широкий круг веществ, различных по происхождению, физико-химической природе и механизмам действия. Общим их свойством, по определению J.M. Gutteridge (1992), является способность, присутствуя в низких по сравнению с окисляемым субстратом концентрациях, существенно задерживать или ингибировать его окисление. Постоянное образование прооксидантов должно быть уравновешено их инактивацией, поэтому для поддержания гомеостаза необходима адекватная ситуации непрерывная регенерация антиоксидантной способности клеток.

Исходя из вышесказанного, предложено использовать в эксперименте комплексное применение аскорбата с протектором SH-групп – а именно, 1,4-дитиоэритритолом. Для проникновения внутрь клетки пассивным транспортом происходит превращение аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту, затем последняя подвергается обратимому превращению в аскорбиновую кислоту при участии восстановленного глутатиона.

Общепринятой номенклатуры антиоксидантов в настоящее время не существует, хотя ряд авторов выделяют два класса: превентивные, снижающие скорость инициации цепной реакции окисления, и гасящие (прерывающие цепь), препятствующие развитию цепной реакции. К превентивным относят каталазу и пероксидазы, разрушающие ROOH, а также агенты, образующие хелатные комплексы с металлами переменной валентности, к прерывающим цепь – фенолы, ароматические амины. В условиях *in vivo* главными гасящими антиоксидантами являются: витамин E, нейтрализующий ROO<sup>•</sup> в липидной фазе мембран.

Более известно деление антиоксидантов на ферменты и соединения неферментативной природы. Последние в определенных концентрациях всегда присутствуют в липидной фазе мембран и водных средах организма и расходуются первыми при устранении проявлений окислительного стресса. Ферменты наиболее активно присоединяются к антиоксидантной защите (АОЗ) после включения механизмов индукции. При возникновении окислительного стресса (ОС) расход антиоксидантов возрастает, меняется экспрессия генов, кодирующих бел-

ковые компоненты АОЗ. Между ферментами и неферментативными элементами АОЗ существует равновесие, причем последние при ряде патологических состояний организма могут выступать в качестве прооксидантов.

Главную роль среди неферментативных антиоксидантных систем защиты отводят глутатиону.

Функционирование клеток связано с уровнем белоксвязанного глутатиона. Определение белоксвязанного глутатиона основано на способности боргидрата натрия (NaBH<sub>4</sub>) высвобождать из связи с белками глутатион, который при взаимодействии с ДТНБ образует окрашенное соединение, а именно тио-2-нитробензойную кислоту, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм.

В настоящее время крайне важно для защиты клеток от переокисления оценить концентрацию различных форм глутатиона после стимуляции антиоксидантной активности низкими концентрациями 1,4-дитиоэритритола и аскорбиновой кислоты. Для решения этой задачи впервые предложен новый способ защиты клеток после дополнительного добавления в инкубационную среду 1,4-дитиоэритритола и аскорбиновой кислоты в конечной концентрации 3,0 мМ и 0,1 мМ соответственно.

Все сказанное свидетельствует о крайней важности разработки способа одновременной активации переокисления и защиты клеток от продуктов активации перекисного окисления липидов и токсического действия активных форм кислорода.

Популярность указанного выше способа обоснована его высокой чувствительностью, простотой осуществления и достаточной адекватностью получаемых результатов, лежащих в основе определения концентрации гидроксильных радикалов в среде инкубации клеток.

Идентичности совокупности признаков комплексной оценки функции про- и антиоксидантной активности не обнаружено при изучении патентной и научной медицинской литературы.

## Материал и методы

Метод основан на определении концентрации белоксвязанного окисленного и восстановленного глутатиона общепринятым методом.

Сотрудниками Сибирского государственного медицинского университета (Томск) профессором Е.А. Степовой и доцентом О.Л. Носаревой разработан способ исследования окисленного глутатиона в клеточном лизате после предварительной инкубации пробы в течение 30 мин с 10 мМ 2-винилпиридином. Расчет содержания общего и окисленного глутатиона производили с помощью калибровочных графиков, для построения которых использовали растворы GSH и GSSG (“MP”, США) в концентрации от 3 до 100 мкМ, обработанные аналогично опытным пробам. Концентрацию GSH рассчитывают как разницу между концентрацией общего глутатиона и GSSG, выражая результат в нмоль/мг белка. Далее определяли белоксвязанный глутатион.

Результаты исследования обработаны статистически с использованием пакета программ Stat Soft Statistica 6.0.

**Результаты и обсуждение**

Установлено, что при эффективной защите клеток от перекисления значительно возрастает уровень восстановленного и белоксвязанного глутатиона. Так, при эффективной защите клеток от перекисления уровень восстановленного глутатиона возрастает на 25% и более, а белоксвязанного глутатиона – на 18% и более. Следовательно, эффективность защиты клеток от перекисления можно оценить только после одновременной стимуляции процессов перекисного окисления и активации возможных механизмов естественной антиоксидантной активности клеток.

**Литература**

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты – СПб. : Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
2. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М. : Слово, 2006. – 556 с.
3. Медицинские лабораторные технологии: в 2 томах / под ред. А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика. – 1999. – Т. 2. – 656 с.

4. Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 5. – С. 592–609.
5. Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing // Blood. – 1998. – Vol. 92, No. 9. – P. 3007–3017.
6. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth // J. Radiat. Res. – 2004. – Vol. 45, No. 1. – P. 33–39.
7. Rosen G.M., Pou S., Ramos C.L. Free radicals and phagocytic cells // FASEB J. – 1995. – Vol. 9. – P. 200–211.

*Статья написана с правом на открытие.*

*Поступила 10.06.2015*

**Сведения об авторе**

**Канская Наталья Викторовна**, докт. мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.  
Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.  
E-mail: nataliya\_w\_2006@mail.ru.

УДК 616.12-008.331.1:616-008.81-008.852]-092.4-092.9]-616-008.853]-616-018.74

## **ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРОМБОЦИТОВ, ЛЕЙКОЦИТОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ У МОЛОДЫХ КРЫС ЛИНИИ SHR**

**А.В. Сидехменова, О.И. Алиев, А.М. Анищенко, А.Ю. Шаманаев, Е.П. Федорова, М.Б. Плотников**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга", Томск  
E-mail: sidehmenova@yandex.ru

## **DYNAMICS OF INDICATORS OF PLATELETS, WHITE BLOOD CELLS, AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE ENDOTHELIUM IN YOUNG SHR RATS**

**A.V. Sidekhmenova, O.I. Aliev, A.M. Anishchenko, A.Yu. Shamanaev, E.P. Fedorova, M.B. Plotnikov**

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n.a. E.D. Goldberg", Tomsk

Исследована динамика состава, количественных показателей и морфологических параметров лейкоцитов и тромбоцитов и вазодилаторной функции эндотелия у крыс линии SHR в период с 5-й по 12-ю недели жизни. Выявлена последовательность формирования сдвигов исследуемых показателей. У животных линии SHR повышалось относительное количество лимфоцитов и увеличивался показатель анизоцитоза тромбоцитов по сравнению с крысами линии WKY на 6-й неделе жизни одновременно с возрастанием артериального давления (АД). Нарушение вазодилаторной функции эндотелия крыс линии SHR развивалось на 8-й неделе жизни после формирования стойкой артериальной гипертензии (АГ) и сдвигов ряда лейкоцитарных и тромбоцитарных показателей. Вероятно, изменение свойств лейкоцитов и тромбоцитов является одним из факторов формирования эндотелиальной дисфункции при АГ.

**Ключевые слова:** артериальная гипертензия, лейкоциты, тромбоциты, эндотелиальная дисфункция.

The dynamics of composition, quantitative parameters and morphological characteristics of white blood cells and platelets, and endothelial vasodilatory function was studied in spontaneously hypertensive rats (SHR) from 5<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> week of life.