

*А.А. Панарина, А.А. Пестрякова, А.В. Садыхова, Н.А. Кленова,
Е.А. Лебедева¹*

**СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОГЛОБИНА
И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭРИТРОЦИТОВ
ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ
*IN VITRO***

Проведено изучение состояние системы гемоглобина, выхода пептидных соединений и протеолитической активности эритроцитов человека в условиях гипергликемии различной степени. Увеличение уровня гипергликемии сопровождается снижением сродства гемоглобина к кислороду и ростом метгемоглобинообразования, уровень гликозилированного гемоглобина увеличивается в условиях сильной гипергликемии. Уровень образования пептидов в эритроцитах и степень выхода их из клеток определяются увеличением трипсиноподобной активности цитозоля и повышением мембранной проницаемости эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, гипергликемия, пептидные соединения, гемоглобин, калпаин, каспаза, трипсиновые протеазы.

Введение

Условия гипергликемии сопровождают различные физиологические и патологические состояния: физические нагрузки, употребление большого количества сладкой пищи, эмоциональные напряжения, сахарный диабет. Увеличение содержания глюкозы в плазме крови ускоряет вероятность протекания реакций гликозилирования белков, что приводит к повреждениям мембран клеток за счет неспецифической агрегации белковых молекул, изменения белок-белковых и белок-липидных взаимодействий. Все это, в свою очередь, будет сопровождаться нарушением функциональной активности клеток и организма.

Реакции неспецифического гликирования белков в условиях гипергликемии, согласно данным многих исследователей [1], активно протекают в эритроцитах.

¹© Панарина А.А., Пестрякова А.А., Садыхова А.В., Кленова Н.А., Лебедева Е.А., 2015

Панарина Анна Александровна, Пестрякова Анастасия Андреевна, Садыхова Анна Викторовна, Кленова Наталья Анатольевна (klenova.ssu@yandex.ru), кафедра биохимии, биотехнологии и биоинженерии, Самарский государственный университет, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Лебедева Елена Алексеевна, кафедра госпитальной терапии с курсом поликлинической терапии и трансфузиологии, Самарский государственный медицинский университет, 443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

Прежде всего, процессу гликозилирования подвергаются гемоглобин и белки мембран эритроцитов, что приводит к нарушению функционирования клеток и, возможно, ускорит переход их к апоптозной гибели.

Целью исследования стало изучение соотношения форм гемоглобина, степени гликозилированности гемоглобина и мембранных белков, активностей μ -калпаина, каспазы 3, а также уровня выхода пептидных соединений в инкубационную среду.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили на фракции чистых эритроцитов, полученной из свежезабранной с антикоагулянтом донорской крови (Самарская областная станция переливания крови). Средний возраст доноров составил $28,4 \pm 1,7$ лет. Эритроциты отмывали 4-хратно до получения чистых фракций раствором PBS в режиме 600 g, 10 минут, $t +4$ °C (центрифуга ЦРЛ-1, Россия). Инкубацию эритроцитов проводили в растворе Рингера-Локка в соотношении 1:1 при 37 °C в течение 60 минут, при осторожном перемешивании каждые 5 минут (во избежание гемолиза). Используемый раствор Рингера-Локка различался содержанием глюкозы (нормогликемия — 5 мМ/л глюкозы; гипергликемия — 10; 15 и 20 мМ/л глюкозы). Инкубационную среду отделяли центрифугированием в том же режиме, в эритроцитах определяли показатели состояния гемоглобина [2; 3], степень гликозилированности мембран эритроцитов [4], активность гидролитических ферментов: μ -калпаина [5; 6] и общей протеолитической активности [7], а также содержание пептидов в инкубационной среде и эритроцитах [8]. Содержание пептидов в эритроцитах определяли после депротеонирования 5 %-ной трихлоруксусной кислотой. Активную концентрацию каспазы-3 в эритроцитах регистрировали методом иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы Bioscians (USA) на приборе Stat Fax 3200 (USA)

Результаты исследований

Инкубация эритроцитов человека в условиях гипергликемии различной степени выраженности сопровождается изменением соотношения форм гемоглобина. Мы наблюдали снижение сродства гемоглобина к кислороду при переходе от нормогликемии к гипергликемии (табл. 1), выражающееся в прогрессивном снижении оксиформы гемоглобина до уровня гипергликемии 15 мМ/л, дальнейшее увеличение содержания глюкозы в инкубационной среде не ускоряло процесса дезоксигенации. Рост метгемоглобинообразования также имеет наибольшее выражение на уровне гипергликемии 15 мМ/л (табл. 1).

Количество мембраносвязанного гемоглобина возрастает в зависимости от степени гипергликемии и на уровне 20 мМ/л превышает содержание в условиях нормогликемии почти в 2 раза (табл. 1). Гликозилирование гемоглобина реально проявляется лишь в условиях высокой гипергликемии. Инкубация эритроцитов в среде с содержанием глюкозы 20 мМ/л сопровождается увеличением степени гликозилированности гемоглобина на 74 %. Однако степень гликозилированности мембранных белков эритроцитов возрастает постепенно в зависимости от степени гипергликемии: 10 мМ/л дает увеличение на 67 %; 15 мМ/л — 89 %; 20 мМ/л — 179 %.

Таблица 1

Соотношение форм гемоглобина (%), содержание гликозилированного гемоглобина (г/л) и степень гликозилированности мембранных белков (у. е.)

Показатель	Степень гипергликемии, мМ/л			
	5	10	15	20
ДезоксиНб, %	39,320 ± 0,337	39,927 ± 0,295	40,841 ± 0,321*Δ	40,470 ± 0,123*
ОксиНб, %	58,359 ± 0,230	57,676 ± 0,356*	56,280 ± 0,286*Δ	56,779 ± 0,251*
МетНб, %	2,321 ± 0,022	2,397 ± 0,023*	2,899 ± 0,042*Δ	2,751 ± 0,033*
Мембраносвязанный Нб %	8,172 ± 0,259	10,430 ± 0,448*	12,100 ± 0,994*Δ	15,888 ± 0,427*Δ
Гликозилированный Нб, г/л	6,220 ± 0,221	6,667 ± 0,448	7,083 ± 0,083	10,833 ± 0,397*Δ
Степень гликозилированности белков мембран, у. е.	0,109 ± 0,002	0,182 ± 0,007*	0,206 ± 0,008*	0,304 ± 0,019*

*P<0,05 по отношению к нормогликемии;

ΔP<0,05 по отношению к предыдущему уровню гипергликемии.

Усиление степени гликозилированности мембранных белков приводит к ухудшению функционирования мембраны клеток, повышению ее проницаемости для белковых соединений, что сопровождается повышением содержания пептидов в инкубационной среде, которое достоверно фиксируется на уровне гипергликемии 15 мМ/л (табл. 2).

Таблица 2

Содержание белков и пептидных соединений в инкубационной среде и пептидов в эритроцитах (условия нормо- и гипергликемии)

Показатели	Содержание глюкозы в инкубационной среде, мМ/л			
	5	10	15	20
Содержание белков и пептидов в инкубационной среде, мкм/мл	71,6 ± 4,8	84,3 ± 5,3	114,9 ± 5,7*	101,7 ± 5,1*
Содержание пептидов в эритроцитах, мкг/мл	106,5 ± 6,6	189,9 ± 6,3*	160,9 ± 5,9*	125,4 ± 6,2°

*P<0,01 по отношению к нормогликемии;

°P<0,05 по отношению к нормогликемии.

После депротеинизации эритроцитов в экстрактах определяются пептидные соединения, уровень которых сначала нарастает на 78 % (10 мМ/л) и 51 % (15 мМ/л), а затем снижается, но еще превышает количество в физиологических условиях на 18 %.

Известно, что эритроциты человека генерируют пептидные соединения, обладающие регуляторными свойствами. Исследованиями ряда ученых [9] было пока-

зано, что внутри эритроцитов человека происходит интенсивный протеолиз гемоглобина, приводящий к образованию и выделению пептидных соединений, обладающих регуляторными свойствами. Большая часть данных пептидов обладала способностью стимулировать пролиферацию клеток, регуляторные свойства других в настоящее время остаются неизвестными. Основным местом производства регуляторных пептидов в большинстве клеток является убиквитин — зависимая деградация важных функциональных белков в протеасомах. Впервые данная АТФ-зависимая система деградации белков была обнаружена в лизатах ретикулоцитов [10]. Возможно, протеолитический комплекс ферментов в каком-то виде сохранился в зрелых клетках, предполагается примембранное положение системы протеолиза [9]. Другой протеолитической системой является калпаиновая, для эритроцитов характерно проявление цитозольной активности μ -калпаина. В условиях эриптоза наблюдается активация каспаз [11].

Нами были исследованы различные виды протеолитической активности эритроцитов в условиях нормо- и гипергликемии. Трипсиноподобная активность мембранной фракции эритроцитов не менялась в зависимости от уровня глюкозы в инкубационной среде, тогда как в цитозоле данная активность нарастает и при концентрации 20 мМ/л превышает условия нормогликемии на 62 % (табл. 3).

Таблица 3

Протеолитическая активность эритроцитов в условиях нормо- и гипергликемии

Показатели	Содержание глюкозы в инкубационной среде, мМ/л			
	5	10	15	20
Активность μ -калпаина U/mg (цитозоль)	0,207 ± 0,014	0,185 ± 0,012	0,187 ± 0,013	0,178 ± 0,012
Активность каспазы-3, ng/ml	0,562 ± 0,029	0,443 ± 0,035*	0,401 ± 0,027*	0,345 ± 0,025*°
Трипсиноподобная активность, мембранная фракция, мкг/мл·час	0,159 ± 0,079	0,135 ± 0,075	0,151 ± 0,072	0, 171 ± 0,079
Трипсиноподобная активность, цитозоль, мкг/мл·час	2,15 ± 0,025	2,70 ± 0,015*	3,29 ± 0,041*°	3,48 ± 0,030*°

*P<0,01 по отношению к нормогликемии;

°P<0,01 по отношению к предыдущему уровню.

Активность μ -калпаина не изменяется, активность каспазы 3 достоверно снижается в зависимости от степени гипергликемии: 10 мМ/л — на 21 %; 15 мМ/л — на 29 %; 20 % — на 61 %. Известно, что активность каспазы 3 возрастает в эритроцитах при реализации программы эриптоза [11], также каспазная активность характерна для протеасомных частиц. Есть данные о том, что гликозилирование сопровождается ингибированием каталитической активности протеасом [10].

Выводы

Повышение содержания глюкозы в инкубационной среде сопровождается снижением сродства гемоглобина к кислороду и ускорению процессов окисления его в метформу. Прогрессивно нарастает степень гликозилированности мембранных белков, что ведет к повреждению функций мембраны и усилению выхода белков и пептидов в инкубационную среду. Гликозилированность гемоглобина достоверно нарастает в условиях сильной гипергликемии — 20 мМ/л. Полученные данные свидетельствуют о том, что повышение уровня пептидных соединений в эритроцитах в условиях гипергликемии обеспечивается в основном трипсиноподобной активностью цитозоля, генерация биологически активных пептидов, вероятно, происходит в физиологических условиях. Ранее нами было показано, что данный процесс зависит от уровня цАМФ и АТФ в клетках [12].

Литература

- [1] Васильева Е.М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомедицинская химия. 2005. Т. 51. № 2. С. 118–126.
- [2] Кленова Н.А., Кленов Р.О. Строение, метаболизм и функциональная активность эритроцитов человека в норме и патологии. Самара: Изд-во "Самарский университет", 2009. 116 с.
- [3] Данилова Л.А., Лопатина Н.И. Колориметрический метод определения гликозилированных гемоглобинов // Лабор. дело. 1986. № 5. С. 281–314.
- [4] Фельдкорен Б.И., Осипова Е.И., Коцедуб Т.П. Исследование параметров метода определения гликозилированных белков сыворотки крови // Лабор. дело. 1991. № 5. С. 56–58.
- [5] А. с. 1668950. Способ определения активности калпаинов в биологическом материале / Е.А. Строев, Е.А. Рязанова, В.Д. Тавинцев. Заявл. 7.08. 1991. № 29.
- [6] Sorimachi H.J., Croall D.E., McGrody K.S. Active Human Calpain I (μ -Calpain) // MBJ International Corporation. 2000. JM. 1134–100. 3 p.
- [7] Ландау Н.С., Егоров Н.С. Особенности накопления в среде и некоторые свойства протеолитических ферментов, образуемых *Nocardia minima* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 1. С. 42–47.
- [8] Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- [9] Говорун В.М., Иванов В.Т. Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37. № 2. С. 199–215.
- [10] Цимоха А.С. Протеосомы: участие в клеточных процессах // Цитология. 2010. Т. 52. № 4. С. 277–300.
- [11] Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death / K.S. Lang [et al.] // Cell Physiol Biochem. 2005. V. 15. P. 195–202.

References

- [1] Vasilyeva E.M. Biochemical characteristics of the erythrocyte. The influence of pathology. *Biomeditsinskaja khimiia* [Biomedical chemistry], 2005, Vol. 51, № 2, pp. 118–126 [in Russian].

- [2] Klenova N.A., Klenov R.O. Structure, metabolism and functional activity of erythrocytes in norm and pathology. Samara, Izd-vo "Samarskii universitet", 2009, 116 p. [in Russian].
- [3] Danilova L.A., Lopatina N.I. Colorimetric method for the determination of glycosylated haemoglobins. *Labor. delo* [Laboratory science], 1986, № 5, pp. 281–314 [in Russian].
- [4] Feldkoren B.I., Osipova E.I., Kotsedub T.P. Study of parameters of method for determining glycosylated proteins of blood serum. *Labor. delo* [Laboratory science], 1991, № 5, pp. 56–58 [in Russian].
- [5] Stroev E.A., Ryazanova E.A., Tavincev V.D. Method for determining the activity of kalpains in biological material. Inventor's certificate 1668950 dated 7.08. 1991, № 29 [in Russian].
- [6] Sorimachi H.J., Croall D.E., McGrody K.S. Active Human Calpain I (μ -Calpain). *MBJ International Corporation*, 2000, JM. 1134–100, 3 p. [in English]
- [7] Landau N.S., Egorov N.S. The features of accumulation in the environment and some properties of proteolytic enzymes formed by *Nocardia minima*. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 1996, Vol. 65, № 1, pp. 42–47 [in Russian].
- [8] O.H. Lowry [et al.] Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, pp. 265–275 [in English].
- [9] Govorun V.M., Ivanov V.T. Proteomics and peptidomics in basic and applied medical research. *Bioorganicheskaia khimiia* [Bioorganic chemistry], 2011, Vol. 37, № 2, pp. 199–215 [in Russian].
- [10] Tsimokha A.S. Proteasomes: their role in cellular processes. [Tsitologiya] [Cytology], 2010, Vol. 52, № 4, pp. 277–300 [in Russian].
- [11] K.S. Lang [et al.]. Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem.*, 2005, Vol. 15, pp. 195–202 [in English].

*A.A. Panarina, A.A. Pestryakova, A.V. Sadychova, N.A. Klenova,
E.A. Lebedeva²*

STATE SYSTEM OF HEMOGLOBIN
AND THE ACTIVITY OF ENZYMES OF HUMAN
ERYTHROCYTES UNDER CONDITIONS
OF HYPERGLYCEMIA *IN VITRO*

The study of condition of the system of hemoglobin, release of peptide compounds, and proteolytic activity of human erythrocytes under conditions of hyperglycemia of varying degrees is carried out. The increase in the level of hyperglycemia is accompanied by a decrease of affinity of hemoglobin to oxygen and the growth of level of metgemoglobin, the glycosylated hemoglobin level is increased in conditions of severe hyperglycemia. The level of formation of peptides in erythrocytes and the level of output of their cells is determined by the increase in trypsin-like activity in cytosol and increased membrane permeability of red blood cells.

Key words: erythrocytes, hyperglycemia, peptide compounds, hemoglobin, calpain, caspase, trypsin protease.

Статья поступила в редакцию 14/IX/2015.

The article received 14/IX/2015.

²*Panarina Anna Aleksandrovna, Pestryakova Anastasia Andreevna, Sadychova Anna Victorovna, Klenova Natalya Anatolyevna (klenova.ssu@yandex.ru), Department of Biochemistry, Biotechnology and Bioengineering, Samara State University, 1, Acad. Pavlov Street, Samara, 443011, Russian Federation.*

Lebedeva Elena Alekseevna, Department of Hospital Therapy with a Course of Outpatient Therapy and Transfusion, Samara State Medical Univesity, 89, Chapaevskaya Street, Samara, 443099, Russian Federation.