

УДК 577.112:612

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПРОТЕИНОВ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

Коношенко С. В.¹, Елкина Н. М.², Варданян А. Г.¹, Большакова А. А.¹

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*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 при циррозе печени в эритроцитах существенно возрастает интенсивность процессов окислительной модификации протеинов. Более выраженное образование продуктов окислительной модификации протеинов наблюдается в мембранах эритроцитов по сравнению с их цитозольной фракцией. Интенсификация окислительной модификации протеинов в эритроцитах больных сочетается с изменениями активности отдельных антиоксидантных ферментов. В цитозольной фракции эритроцитов наблюдается снижение активности глутатионредуктазы и существенное повышение активности каталазы.

Ключевые слова: эритроциты, окислительная модификация протеинов, антиоксидантная активность, глутатионредуктаза, каталаза, патология, цирроз печени.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно, что при многих заболеваниях нарушается прооксидантно-антиоксидантное равновесие, усиливается генерирование активных форм кислорода (АФК), развивается т.н. окислительный стресс [1–4]. Под действием АФК усиливаются деструктивные процессы, о чём свидетельствует интенсификация перекисного окисления липидов к окислительной модификации протеинов [5–7].

Как правило, эти процессы приобретают цепной, лавинообразный характер и ведут к ещё большему генерированию АФК. Интересным является тот факт, что независимо от локализации патологического процесса в него вовлекаются эритроциты, отвечая изменениями своего метаболического состояния [6–9]. Представляется важным понять характер и направленность изменений в клетках разного типа, в частности, в эритроцитах, в условиях патологии и окислительного стресса; выяснить какие из происходящих изменений имеют деструктивный характер и какие из них могут иметь компенсаторно-адаптивное значение.

В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение окислительной модификации протеинов и антиоксидантной активности в эритроцитах при циррозе печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (20 человек в возрасте от 35 до 45 лет) и больных циррозом печени (15 человек в возрасте от 45 до 60 лет). Кровь здоровых людей брали на базе ГБУЗ РК «Центр крови», г. Симферополь, кровь больных – на базе ГБУЗ РК «Клиническая больница № 7», г. Симферополь. Кровь больных брали при поступлении в стационар, перед началом лечения.

Эритроциты гемолизировали по методу, описанному в литературе [10]. Мембраны отделяли от гемолизата последовательным отмыванием суспензии физраствором и дистиллированной водой.

В мембранах и гемолизате эритроцитов определяли содержание продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП), используя спектрофотометрический метод [11]. Альдегидные и кетонные продукты модификации протеинов нейтрального характера идентифицировали при 356 нм и 370 нм, альдегидные и кетонные продукты основного характера идентифицировали при 430 нм и 530 нм. В гемолизате эритроцитов определяли также активность глутатионредуктазы [12] и каталазы [13].

Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, в эритроцитах больных циррозом печени наблюдается существенная интенсификация процессов окислительной модификации протеинов. Так, в гемолизате эритроцитов больных (табл. 1) содержание продуктов окислительной модификации протеинов нейтрального характера возрастало в 4,2 раза (альдегиды) и в 4,5 раза (кетоны); содержание продуктов модификации основного характера увеличивалось в 3,6 раза (альдегиды) и в 5,9 раза (кетоны) по сравнению с контрольной группой. При этом заметно более выраженное преобладание содержания кетонных продуктов окислительной модификации протеинов, как основного, так и нейтрального характера.

В мембранах эритроцитов больных также отмечено увеличение уровня продуктов ОМП по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Содержание альдегидных продуктов ОМП нейтрального характера увеличивалось в 11,7 раза, содержание кетонных продуктов нейтрального характера возрастало в 7,4 раза; содержание продуктов ОМП основного характера увеличивалось в 3,0 и в 1,7 раза (альдегиды и кетоны, соответственно). Прослеживается существенное увеличение содержания в мембранах эритроцитов больных продуктов ОМП нейтрального характера.

В целом, в мембранах эритроцитов больных отмечена более выраженная интенсификация процессов окислительной модификации протеинов по сравнению с

гемолизатом. Как известно из литературы [4], клеточные мембраны являются одной из первых мишеней для АФК, осуществляющих, в частности, процессы перекисного окисления липидов. Очевидно, что мембранные протеины, наряду с липидами, вовлекаются в окислительные процессы, ведущие к модификации отдельных аминокислотных остатков и в дальнейшем к более глубоким структурным изменениям белковых молекул.

Усиление процессов окислительной модификации протеинов в эритроцитах больных циррозом печени сочеталось с изменениями в активности двух антиоксидантных ферментов – каталазы и глутатионредуктазы (табл. 3). Так, активность глутатионредуктазы в гемолизате эритроцитов больных была в 1,6 раза ниже уровня контрольной группы, что может быть неблагоприятным фактором в процессах поддержания оптимального уровня, восстановленного глутатиона.

Таблица 1
Содержание продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП) в гемолизате эритроцитов больных циррозом печени (M±m)

Обследованные группы	Содержание продуктов ОМП, ед. опт.пл. • мл ⁻¹			
	продукты нейтрального характера		продукты основного характера	
	альдегиды, 356 нм	кетоны, 370 нм	альдегиды, 430 нм	кетоны, 530 нм
Контрольная группа	0,208 ± 0,007	0,235 ± 0,009	0,260 ± 0,01	0,058 ± 0,004
Больные циррозом печени	0,868 ± 0,140 *	1,054 ± 0,170 *	0,927 ± 0,176 *	0,344 ± 0,063 *

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

Таблица 2
Содержание продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП) в мембранах эритроцитов больных циррозом печени (M±m)

Обследованные группы	Содержание продуктов ОМП, ед. опт.пл. • мл ⁻¹			
	продукты нейтрального характера		продукты основного характера	
	альдегиды, 356 нм	кетоны, 370 нм	альдегиды, 430 нм	кетоны, 530 нм
Контрольная группа	0,115 ± 0,008	0,142 ± 0,009	0,153 ± 0,012	0,026 ± 0,003
Больные циррозом печени	1,340 ± 0,176 *	1,050 ± 0,094 *	0,464 ± 0,063 *	0,045 ± 0,007 *

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

Таблица 3

**Активность глутатионредуктазы и каталазы в гемолизате эритроцитов
больных циррозом печени (M±m)**

Обследованные группы	Активность каталазы, ммоль. с ⁻¹ . л ⁻¹	Активность глутатионредуктазы, нмоль. мин ⁻¹ . мл ⁻¹ .
Контрольная группа	0,065 ± 0,006	0,590 ± 0,026
Больные циррозом печени	0,228 ± 0,015 *	0,360 ± 0,022 *

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

Вместе с этим, наблюдается увеличение активности каталазы: в 3,5 раза по сравнению с контрольной группой. Вполне вероятно, что увеличение активности каталазы в эритроцитах больных циррозом печени может иметь компенсаторное значение.

Этот факт представляет определенный интерес, так как пероксид водорода является ключевым «проводником» основных путей генерирования активных форм кислорода [5] и его бесконтрольное накопление в эритроцитах может привести к «взрыву» окислительных реакций, ведущих к деструктивным изменениям не только белков и липидов, но и других органических соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов исследований можно сделать следующие выводы:

1. В эритроцитах больных циррозом печени возрастает интенсивность окислительной модификации протеинов, о чём свидетельствует более выраженное образование альдегидных и кетонных продуктов модификации как нейтрального, так и основного характера.
2. По сравнению с цитозольной фракцией в мембранах эритроцитов больных прослеживается более интенсивное образование альдегидных и кетонных продуктов окислительной модификации протеинов нейтрального характера.
3. В цитозольной фракции эритроцитов больных циррозом печени изменяется активность антиоксидантных ферментов: снижается активность глутатионредуктазы и возрастает активность каталазы.
4. Повышение активности каталазы в эритроцитах в условиях интенсификации окислительных реакций деструктивного характера может иметь компенсаторное значение.

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. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е. Е. Дубинина, С. В. Гавровская, Е. В. Кузьмич и др. // Биохимия. – 2002. – Т. 67, Вып. 3. – С. 413–421.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
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, Іліас Шашуа, 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. 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.
12. Агабели Р. А. Антиоксиданты и антиоксидантные ферменты / Р. А. Агабели // Баку. – 1989. – 120 с.
13. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY IN ERYTHROCYTES WHEN CIRRHOSIS OF LIVER

Konoshenko S. V., Elkina N. M., Vardanjan A. G., Bolshakova A. A.

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

It is known, that under different diseases the balance in prooxidative and antioxidative processes is destroyed and oxidative stress is realized. These processes are connected with productive of oxygen active forms that leads to change of molecular and cellular structures [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 [5–9]. In this regard, it is interest to examine the

state of the processes of protein oxidative modification and antioxidative activity in erythrocytes when cirrhosis of liver.

The materials for the study were the erythrocytes of healthy subjects (20 persons at 35–45 years old) and erythrocytes of 15 persons with cirrhosis of liver (at 45–60 years old). The erythrocytes were hemolysated by distilled water. Membranes of erythrocytes were separated from hemolysate (cytosol fraction) by method of centrifugation [10]. In membranes and hemolysate of erythrocytes the content of proteins oxidative modification products was determined [11]. In hemolysates of erythrocytes the activity of glutathione-reductase [12] and catalase [13] were determined. It has been shown that under cirrhosis of liver in cytosol fraction and membranes of erythrocytes the processes of proteins oxidative modification are intensified. So, in hemolysate of erythrocyte of patients the content of neutral products was raised at 4,2 times (aldehydes) and at 4,5 times (ketons); the content of basic products was raised at 3,6 time and 5,9 time (aldehydes and ketons, accordingly) as compared with control group.

In membranes of erythrocytes of patients the content of basic products was raised at 3,0 and 1,7 time (aldehydes and ketons), the content of neutral products was raised at 11,7 time (aldehydes) and at 7,4 time (ketons).

At the same time, the activity of antioxidative enzymes was changed also: the activity of glutathione-reductase was lowered at 1,6 time as compared with the control group and the activity of catalase was raised at 3,5 time.

The obtained data evidence about intensification of destructive processes in erythrocytes when cirrhosis of liver and about possibility of development of compensatory processes in erythrocytes under this pathology.

Keywords: erythrocytes, proteins oxidative modification, antioxidative activity, glutathione-reductase, catalase, pathology, cirrhosis of liver.

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. Dubinina E. E., Govrovskaja S. V., Kuzmich E. V. et al., Oxidative modification of proteins: oxidative of tryptophane and bityrosine in purified proteins with using Fenton system, *Biochemistry*, **67**, **3**, 413 (2002).
6. Yolkina N. M., Konoshenko S. V., Lipids composition and lipids peroxidation in erythrocytes under iron-deficiency anemia, *Sc. notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University*, **1(67)**, **1**, 25 (2015).
7. 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).
8. 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).

9. Yolkina N. M., Konoshenko S. V., Shashua Ilias, 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).
10. Drabkin D., A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline, *Arch. Biochem.*, **21**, 224 (1959).
11. Dubinina E. E., Burmistrev S. O., Hodov D. A. et al, Oxidative modification of proteins of human blood serum, the method of their determination, *Voprosi medical chem.*, **41**, **1**, 24 (1996).
12. Agabeli R. A., Antioxidants and antioxidative enzymes, 120 (Bacu, 1989).
13. Koroljuk M. A., Jvanova L. I., Majorova I. G. et al, Method of studing of catalase activity, *Lab. delo*, **1**, 16 (1988).