

## ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННОГО АЛЬБУМИНА НА ПЕРЕКИСНУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН У ПАЦИЕНТОВ С ОЖОГАМИ

Егорихина М.Н.<sup>1</sup>, Левин Г.Я.<sup>1</sup>, Костина О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: egorihina@rambler.ru

Активация свободнорадикального окисления является неотъемлемой частью патогенеза ожоговой болезни, приводящей к развитию оксидативного стресса. В результате в организме пострадавших появляются активные формы кислорода, обладающие выраженным деструктивным действием по отношению к тканям организма. В настоящее время известно, что атаке активными формами кислорода подвергаются не только липиды, но и белки. Появились работы, свидетельствующие о том, что окисленные белки могут сами продуцировать свободные радикалы. Цель исследования – выявление способности белков окислительной модификации вызывать перекисную трансформацию липидов мембран эритроцитов и изучение изменения уровня окисленных белков в сыворотке крови при ожогах. С применением метода железо-индуцированной хемилюминесценции показано, что окисленный альбумин способен сам продуцировать свободные радикалы. Установлено, что инкубация эритроцитов с окисленным альбумином вызывает увеличение содержания малонового диальдегида на их мембранах. Усиление перекисного окисления липидов мембран эритроцитов под действием окисленного альбумина подтверждено результатами хемилюминесцентного метода. Доказано, что действие окисленного альбумина на перекисную трансформацию мембран эритроцитов может быть скорректировано  $\alpha$ -токоферолом. Установлено, что после термической травмы значительно увеличивается концентрация в крови окисленных белков. Высказывается предположение, что это может служить одной из причин нарушения реологических свойств эритроцитов при ожоговой болезни.

Ключевые слова: альбумин, эритроциты, ожоги, свободнорадикальное окисление, перекисное окисление липидов, микроциркуляция.

## THE ROLE OF OXIDIZED ALBUMIN IN PEROXIDIZED TRANSFORMATION OF CELL MEMBRANES DURING BURN INJURY

<sup>1</sup>Egorihina M.N., <sup>1</sup>Levin G.Ya., <sup>1</sup>Kostina O.V.

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution "Privolzhsky Federal Research Medical Centre" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, e-mail: egorihina@rambler.ru

Activation of free radical oxidation is an inherited part of pathogenesis of burn disease and it leads to oxidative stress. As a result active forms of oxygen appear, which cause destructive changes in body tissues. Nowadays it is known that active forms of oxygen attack not only lipids, but proteins as well. There is new research which proves that oxidized proteins can themselves produce free radicals. We studied the possibility of increasing erythrocyte membranes lipid peroxidation using oxidized proteins and to research the change in the level of oxidized proteins in blood of burn patients. Using iron-induced chemiluminescence method it was shown that oxidized albumin produces free radicals. It was found that storage of erythrocytes together with oxidized albumin causes the increase of malondialdehyde on their membranes. The growing lipid peroxidation under the influence of oxidized albumin is proved by the results of chemiluminescence method. It was proved that the influence of oxidized albumin on peroxidized transformation of erythrocyte membranes can be corrected by  $\alpha$ -tocopherol. It was showed that thermal trauma significantly increases the level of oxidized proteins in blood. It is possible that this can be one of the reasons of disturbance of rheological properties of erythrocytes during burn disease.

Keywords: albumin, erythrocytes, burn disease, free radical oxidation, lipid peroxidation, microcirculation.

Достаточно долго основным объектом исследования повреждающего действия свободнорадикального окисления (СРО) являлись липиды. Известно, что активные формы кислорода вызывают усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ), сопровождающегося образованием лизофракций фосфолипидов, малонового диальдегида, диеновых конъюгатов ненасыщенных жирных кислот, что приводит к повреждению клеточных мембран,

образованию тромбоксанов, являющихся мощными индукторами агрегации тромбоцитов, оснований Шиффа, резко ухудшающих вязкоэластические свойства мембран эритроцитов [1; 4,5].

В настоящее время общепризнанно, что при окислительном стрессе критическими элементами повреждающего действия активированных кислородных метаболитов становятся не только липиды, но и нуклеиновые кислоты, белки. Последние являются одной из основных мишеней окислительной модификации [6]. Практически нет работ, посвященных изучению влияния окисленных сывороточных белков на функциональные свойства клеток крови.

Цель исследования – выявление способности белков окислительной модификации вызывать перекисную трансформацию липидов мембран эритроцитов и изучение изменения уровня окисленных белков в сыворотке крови при ожогах.

### **Материалы и методы**

Исследование проведено на образцах крови больных в острый период ожоговой болезни (ожог II-III степени более 20% поверхности тела) и на образцах крови здоровых доноров.

Сравнительное исследование уровня белков окислительной модификации в сыворотке крови проведено в группе ожоговых больных (n=10) и здоровых доноров (n=10). Для получения сыворотки кровь забирали в вакуумные пробирки (BD Vacutainer®SST™II), спустя 30 мин. кровь центрифугировали 10 мин. при 3000 об./мин.

Для исследования влияния альбумина окислительной модификации на перекисную трансформацию мембран эритроцитов кровь здоровых доноров (n=10) забирали в вакуумные пробирки (BD Vacutainer®) с раствором цитрата натрия. Затем кровь центрифугировали 20 мин. при 3000 об./мин., отбирали бестромбоцитарную плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку и выделяли эритроцитарную массу, которую дважды отмывали в физиологическом растворе. Отмытые эритроциты ресуспендировали с физиологическим раствором (серия 1 – контроль), с 7%-ным раствором альбумина (серия 2), с раствором окисленного альбумина (серия 3), с раствором 7%-ного альбумина, обработанного  $\alpha$ -токоферола ацетатом (серия 4), с раствором окисленного альбумина, обработанного  $\alpha$ -токоферола ацетатом (серия 5). Соотношение отмытых эритроцитов с физиологическим раствором и растворами альбумина – 1:3. Полученные суспензии эритроцитов в течение 30 мин. инкубировали на водяной бане при 37 °С. После инкубации суспензию эритроцитов центрифугировали 15 мин. при 3000 об./мин., удаляли супернатант, а полученную эритроцитарную массу трижды отмывали в физиологическом растворе. Затем в отмытых эритроцитах определяли количество малонового диальдегида (МДА) и интенсивность

процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Каждая серия экспериментов проводилась на крови одного донора.

В экспериментальных сериях с использованием  $\alpha$ -токоферола ацетата раствор альбумина (окисленного и неокисленного) смешивали с масляным раствором  $\alpha$ -токоферола ацетата в соотношении 4:1, перемешивали, инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем  $\alpha$ -токоферола ацетат, находящийся в верхнем слое суспензии, полностью удаляли, захватывая верхний слой альбумина. После этого обработанные  $\alpha$ -токоферола ацетатом растворы альбумина (окисленного и неокисленного) добавляли к отмытым эритроцитам, как описано выше.

Для окислительной модификации раствор альбумина (7%) подвергали УФ-облучению светом газоразрядной лампы (ДРТ - 240) в течение 40 мин. с охлаждением кюветы струей воздуха. Степень окисления альбумина в эксперименте составляла  $71,18 \pm 6,68$  ЕД/1 мг альбумина/1 мл раствора ( $n=10$ ,  $p<0,05$ ), степень окисления нативного альбумина (контроль) –  $36,45 \pm 2,61$  ЕД/1 мг альбумина/1 мл раствора.

Определение уровня окисленно-модифицированных белков в сыворотке крови и контроль за степенью окислительной модификации раствора альбумина проводили по методике Levine R.L. et al. [8] в модификации Дубининой Е.Е. и соавт. [2]. Каждая серия экспериментов с альбумином различной окисленности проводилась на крови одного донора.

Количество МДА в эритроцитах определяли по реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой.

Интенсивность процессов ПОЛ в эритроцитах оценивали с помощью метода индуцированной сульфатом железа и перекисью водорода биохемиллюминесценции на биохемиллюминометре БХЛ-07 (ООО «Медозонс», Н. Новгород) по показателю светосуммы хемиллюминесценции (S) за 30 с [3].

Оценку окисленного альбумина как источника свободных радикалов проводили с использованием метода железо-индуцированной хемиллюминесценции (0,05 мМ сульфата железа) на хемиллюминометре Lum-5773 (ООО «ДИСофт», Москва), где светосумма характеризует общее количество радикалов, образовавшихся в течение времени измерения.

Результаты исследований обработаны методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона и критерия Манна-Уитни, при помощи пакета программ STATISTICA 6.0.

### **Результаты и обсуждение**

В литературе высказывается мнение о том, что окисленные белки сами могут выступать в качестве стимуляторов перекисного окисления липидов [11; 12]. В пользу этого утверждения свидетельствуют результаты исследования T. Miyata et al. [9], при инкубации

арахидоновой кислоты с окисленно-модифицированным белком *in vitro* наблюдалось образование малонового диальдегида и 4-гидроксиноненаля, что характеризует модифицированный белок в качестве потенциального стимулятора перекисного окисления липидов.

Выбор альбумина в качестве окисляемого белка был не случаен – альбумин составляет примерно 60% от общего количества белков плазмы крови. Также известно, что среди белков сыворотки крови альбумин является наиболее чувствительным к окислительной модификации [10].

Используя метод железо-индуцированной хемилюминесценции, мы показали, что окисленно-модифицированный альбумин способен сам продуцировать свободные радикалы. Светосумма железо-индуцированной хемилюминесценции окисленного альбумина была в 2 раза ( $p < 0,05$ ) выше, чем нативного ( $0,148 \pm 0,01$  отн. ед. – нативный;  $0,310 \pm 0,03$  отн. ед. – окисленный альбумин). Чтобы выяснить, насколько свободные радикалы, продуцируемые окисленным альбумином, активны в отношении мембран эритроцитов, прежде всего липидов, мы инкубировали эритроциты здоровых доноров с окисленным альбумином.

Установлено, что инкубация эритроцитов с окисленным альбумином вызывает активацию перекисного окисления липидов их мембран, о чем свидетельствует значительное повышение уровня малонового диальдегида в мембранах эритроцитов (табл. 1).

Таблица 1

Изменение показателей перекисной трансформации мембран эритроцитов под влиянием окисленного альбумина

№ Серии	Эритроциты, проинкубированные с	ПОЛ (отн. ед.)	МДА (ед. опт. пл.)
1	физиологическим раствором (контроль)	$1279,60 \pm 70,36$	$8,98 \pm 0,91$
2	альбумином	$1689,80 \pm 84,35^*$	$7,77 \pm 1,17$
3	окисленным альбумином	$1368,80 \pm 73,19^{\bullet}$	$16,08 \pm 1,12^{\bullet}$
4	альбумином, обработанным $\alpha$ - токоферола ацетатом	$1510,90 \pm 133,19^*$	$9,60 \pm 1,26^{\blacksquare}$
5	окисленным альбумином, обработанным $\alpha$ -токоферола ацетатом	$1567,26 \pm 110,75^{\blacksquare}$	$6,26 \pm 0,76^{\blacksquare} \blacktriangledown$

Примечание: \* –  $p < 0,05$ , сравнение с серией 1;  $\bullet$  –  $p < 0,05$ , сравнение с серией 2;  $\blacksquare$  –  $p < 0,05$ , сравнение с серией 3;  $\blacktriangledown$  –  $p < 0,05$ , сравнение с серией 4; критерий Вилкоксона.

Концентрация МДА в эритроцитах, обработанных окисленным альбумином, увеличивалась практически в 2 раза как по сравнению с его концентрацией в нативных клетках, так и в эритроцитах, инкубированных с неокисленным альбумином.

Интересные данные получены при исследовании хемилюминесценции эритроцитов с использованием в качестве индуктора раствора перекиси водорода и сульфата железа. В этих условиях при инкубации эритроцитов здоровых доноров с неокисленным альбумином светосумма их хемилюминесценции возрастала на 32% по сравнению с нативными эритроцитами (табл. 1). В то же время после инкубации эритроцитов с окисленным альбумином светосумма их хемилюминесценции была значительно ниже и статистически не отличалась от хемилюминесценции нативных эритроцитов.

В качестве объяснений полученных результатов можно высказать следующее. Известно, что альбумин обладает антиоксидантными свойствами и уменьшает на мембранах эритроцитов концентрацию окисленных фосфолипидов, что сопровождается увеличением количества субстрата для окисления в реакции с перекисью водорода и сульфатом железа, приводя к повышению хемилюминесценции. В то же время окисленный альбумин не дает подобного эффекта. Инкубация эритроцитов с окисленным альбумином сопровождается увеличением концентрации окисленных фосфолипидов на мембранах эритроцитов и, таким образом, уменьшением количества субстрата для дальнейшего окисления индукторами хемилюминесценции.

В подтверждение гипотезы об увеличении количества доступного для окисления субстрата на мембранах эритроцитов после их инкубации с альбумином свидетельствуют данные, полученные нами при исследовании хемилюминесценции, индуцированной перекисью водорода и раствором сульфата железа, самого альбумина. При этом светосумма хемилюминесценции неокисленного альбумина была на 14% ( $p < 0,05$ ) больше, чем окисленного ( $5948,25 \pm 560$  отн. ед. – нативный;  $5095,25 \pm 498$  отн. ед. – окисленный).

Для исследования возможности снижения влияния окисленного альбумина на перекисную трансформацию мембран эритроцитов окисленный альбумин инкубировали с  $\alpha$ -токоферолом. Известно, что  $\alpha$ -токоферол является наиболее распространенным и достаточно мощным антиоксидантом.

Показано, что предварительная инкубация окисленного альбумина с  $\alpha$ -токоферолом значительно снижает его способность вызывать активацию перекисного окисления липидов мембран эритроцитов (табл. 1). Уровень малонового диальдегида не повышался в мембранах эритроцитов под действием окисленного альбумина, предварительно инкубированного с  $\alpha$ -токоферолом. Не исключено, что  $\alpha$ -токоферол не только выводит из сферы реакции активные свободные радикалы, продуцируемые окисленным альбумином, но и может

способствовать восстановлению свойств самого окисленного альбумина. Это подтверждается в определенной степени данными хемиллюминесценции, индуцированной перекисью водорода и раствором сульфата железа. Светосумма хемиллюминесценции эритроцитов, инкубированных с окисленным альбумином, после его обработки  $\alpha$ -токоферолом была выше, чем у эритроцитов, инкубированных с окисленным альбумином без токоферола, хотя и меньше, чем у эритроцитов, обработанных неокисленным альбумином.

Концентрация МДА в эритроцитах, инкубированных с окисленным и неокисленным альбумином, преинкубированных с  $\alpha$ -токоферолом, была значительно ниже, чем в серии с окисленным альбумином, и не отличалась от контроля. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что  $\alpha$ -токоферол способствует восстановлению антиоксидантных свойств альбумина и выводит из сферы реакции активные свободные радикалы, продуцируемые окисленным альбумином.

Полученные данные приобретают особое значение при патологических состояниях, в патогенезе которых ведущую роль играет усиление свободнорадикального окисления. К этим состояниям относится, прежде всего, ожоговая болезнь, при которой активация ПОЛ показана многими исследователями. Однако данных об изменении уровня белков окислительной модификации после термической травмы в литературе практически не встречается.

Для исследования уровня белков окислительной модификации был использован метод, в основе которого лежит взаимодействие 2,4-динитрофенилгидразина с альдегидными и кетонными группировками аминокислотных остатков, образующихся в результате окисления белков [2]. Нами установлено, что в острый период ожоговой болезни практически все виды карбонильных производных значительно превышали норму, что является следствием активации свободнорадикального окисления и свидетельствует о резком повышении уровня белков окислительной модификации (табл. 2).

Таблица 2

Изменение уровня белков окислительной модификации в сыворотке крови при ожоговой болезни

Группы	$\lambda=357$ (нм)	$\lambda=363$ (нм)	$\lambda=370$ (нм)	$\lambda=430$ (нм)	$\lambda=530$ (нм)
Норма (ЕД/1 мг общего белка /1 мл сыворотки)	19.29 $\pm 0.73$	18.48 $\pm 0.75$	17.54 $\pm 0.79$	4.89 $\pm 0.06$	0.23 $\pm 0.09$
Ожог (ЕД/1 мг общего белка /1 мл сыворотки)	26.21 $\pm 1.87$ **	25.40 $\pm 1.09$ **	24.40 $\pm 1.33$ **	8.08 $\pm 1.23$ *	0.51 $\pm 0.22$

Примечание: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , критерий Манна-Уитни.

Полученные нами данные с достаточным основанием позволяют полагать, что свободные радикалы, продуцируемые окисленными белками, уровень которых значительно повышен при ожогах, являются важнейшей причиной изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов, а отсюда и нарушений их реологических свойств – усиления агрегации и снижения их деформируемости, характерных для острого периода ожоговой болезни и лежащих в основе микроциркуляторных нарушений. Более понятными становятся возрастание агрегации эритроцитов под действием окисленного альбумина, которое показано в опубликованных нами ранее работах [7], и механизм этого процесса. В то же время показанное нами действие  $\alpha$ -токоферола, снижающего способность окисленного альбумина усиливать СРО, дает обоснование использования антиоксидантной терапии с целью нормализации мембранных свойств эритроцитов.

#### **Выводы:**

1. Альбумин окислительной модификации способен сам продуцировать свободные радикалы и вызывать перекисную трансформацию фосфолипидов мембран эритроцитов.
2. В острые периоды ожоговой болезни значительно возрастает уровень сывороточных белков окислительной модификации.

#### **Список литературы**

1. Азизова О.А. Роль физико-химических изменений клеточной мембраны и свободно-радикальных процессов в патологии // Физико-химическая медицина: проблемы атеросклероза, детоксикации и иммунокоррекции. – М., 1991. – С. 46-62.
2. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Поротов // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.
3. Кузьмина Е.И. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценок свободнорадикальных реакций в биологических субстратах / Е.И. Кузьмина, А.С. Нелюбин, М.К. Щенникова // Биохимия и биофизика микроорганизмов. - Горький, 1983. - С. 41-48.
4. Baouali B.A. Plasma lipid peroxidation in critically in patients: importance of mechanical ventilation // Free Rad. Biol. Med. – 1994. – Vo1. 6, N 2. – P. 223-227.
5. Cetinkale O. Modulating the function of neutrophils and lipid peroxidation by FK 506 in a rata model of thermal injury / O. Cetinkale, D. Konukoğlu, O. Senel et al. // Burns. – 1999. – Vol. 25, N 2. – P. 105-112.

6. de Zwart L.L. Review: Biomarkers of Free Radical Damage: Applications in Experimental Animals and in Humans / L.L. de Zwart, J.H.N. Meerman, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen // *Free Rad. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 26. – P. 202-226.
7. Levin G.Ya The role of oxidized albumin in blood cell aggregation disturbance in burn disease / G.Ya. Levin, M.N. Egorihina // *Int. J. Burn Trauma.* – 2013. – Vol. 3, N2. – P. 115-121.
8. Levine R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver et al. // *Meth. Enzymol.* – 1990. – Vol. 186. – P. 464-478.
9. Miyata T. Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids / Miyata T., Inagi R., Asahi K. e.a. // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol. 437, N 1-2. – P. 24-28.
10. Smith C.A. Protection by albumin against the prooxidant actions of phenolic dietary components / C.A. Smith, B. Halliwell, O.I. Aruoma // *Food. Chem. Toxicol.* – 1992. – Vol. 30. – P. 483-489.
11. Steinberg D. Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity / D. Steinberg, S. Parthasarathy, T.E. Carew et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1989. – Vol. 320. – P. 915-924.
12. Uchida K. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress / K. Uchida, M. Kanematsu, K. Sakai et al. // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 95, N 9. – P. 4882-4887.