

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.13/14-005.4-008.9
DOI:10.23888/НМЖ20173338-351

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ И ЛИЗОСОМАЛЬНОГО ПРОТЕОЛИЗА ПЛАЗМЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ИШЕМИИ И ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Р.Е. КАЛИНИН, Ю.В. АБАЛЕНИХИНА, А.С. ПШЕННИКОВ, И.А. СУЧКОВ, С.А. ИСАКОВ

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
ул. Высоковольтная, 9, 390026, г. Рязань, Российская Федерация

Цель: проанализировать зависимость состояния лизосомального цистеинового протеолиза от степени окислительной модификации белков в условиях экспериментального моделирования ишемии и ишемии-реперфузии.

Исследование выполнено на лабораторных животных – крысах линии Wistar. Созданы две экспериментальные модели – ишемии и реперфузии путем пережатия брюшного отдела аорты (первая группа) с последующим кондиционированием (вторая группа). Активность лизосомальных протеиназ и уровень окислительно-модифицированных белков определяли в плазме крови в следующие сроки операционного вмешательства: 1, 3, 5, 7 суток соответственно в обеих группах. В качестве контроля изучали плазму крови интактного животного. Изучена активность лизосомальных цистеиновых протеиназ В, L в условиях экспериментального моделирования ишемии и ишемии-реперфузии спектрофлуориметрическим методом по Barrett&Kirschke. Для оценки окислительной модификации белков использовали определение уровня карбонильных производных по R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой. Дана комплексная оценка окислительной модификации белков плазмы, а именно: подсчитаны площадь под кривой спектра поглощения продуктов карбонилирования протеинов, доля первичных и вторичных маркеров окислительного стресса, резервно-адаптационный потенциал. С целью анализа статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест). Для проверки равенства медиан нескольких выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса. Для оценки ранговой корреляции использовали коэффициент Спирмена.

Полученные результаты демонстрируют развитие окислительного стресса при ишемии-реперфузии с 1 по 7 сутки, а при ишемии – на 3 и 5 сутки, что сопровождается активацией катепсинов В и L. При ишемии и ишемии-реперфузии наблюдается истощение резервно-адаптационного потенциала, однако при ишемии преобладают первичные маркеры, а при реперфузии - вторичные. В результате анализа данных доказана положительная корреляционная связь между окислительным карбонилированием белков и активностью катепсина L плазмы на 3, 5 сутки при ишемии, на 3 сутки при ишемии-реперфузии.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, катепсины В, L, ишемия, ишемия-реперфузия.

Окислительный стресс, представляя собой молекулярную дисрегуляцию метаболизма, играет ключевую роль в патогенезе атеросклероза, воспаления сосудов, эндотелиальной дисфункции и потери биодоступности оксида азота [1, 2]. Поскольку окислительный стресс является объединяющим признаком почти всех кардиоваскулярных патологий, а модификация белков надежный критерий его оценки, то в качестве биомаркера, отражающего степень повреждения в условиях моделирования ишемии и ишемии-реперфузии, целесообразно использовать карбонильные производные протеинов.

В свою очередь, протеолитические системы признаются одним из возможных механизмов защиты от накопления окислительно модифицированных белков и совершенным регулятором протеинового обмена [3, 4]. Кроме этого, лизосомальные протеиназы являются важными факторами развития сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе ассоциированных с воспалением [5]. В настоящее время доказана повышенная экспрессия лизосомальных катепсинов L и В в области атеросклеротического повреждения сосуда [6], участие катепсина В в процессах формирования кровеносных сосудов [7].

Таким образом, вовлеченность катепсинов и окислительного стресса в развитие патофизиологических состояний не вызывает сомнения, однако остается не изученным взаимосвязь этих процессов.

Цель исследования

Проанализировать зависимость состояния лизосомального цистеинового протеолиза от степени окислительной модификации белков в условиях экспериментального моделирования ишемии и ишемии-реперфузии.

Материалы и методы

Исследование выполнено на лабораторных животных (крысах линии Wistar) в соответствии с этическими нормами, из-

ложенными в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и МЗРФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Для реализации эксперимента созданы две модели - ишемии и реперфузии путем пережатия брюшного отдела аорты (первая группа) с последующим кондиционированием (вторая группа). Все операции осуществлялись под наркозом с использованием препаратов «Ксило» 1 мг/кг и «Золетил 50» 15 мг/кг. Активность лизосомальных протеиназ и уровень окислительно-модифицированных белков определяли в плазме крови в следующие сроки операционного вмешательства: 1, 3, 5, 7 суток соответственно в обеих группах. В качестве контроля изучали плазму крови интактного животного.

Для оценки окислительной модификации белков использовали определение уровня карбонильных производных по R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [8]. Подсчет площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков осуществляли по авторской методике [9], полученное значение выражали в условных единицах/грамм белка.

Активность катепсинов В, L изучалась спектрофлуориметрическим методом по Barrett&Kirschke [10]. Удельную активность катепсинов в плазме выражали в нмоль амидо-метилкумарина/сек х г белка.

Для оценки доли первичных маркеров подсчитывалась сумма альдегид-динитрофенилгидразонов, для оценки вторичных – сумма кетон-динитрофенилгидразонов, и соотносилась с общим содержанием карбонильных производных белков ($S_{общ}$).

Оценка резервно-адаптационного потенциала производилась путем подсчета отношения площади под кривой карбонильных производных белков при спон-

танном окислении протеинов к индуцированному по реакции Фентона [11].

Статистический анализ результатов исследования проведен согласно руководству по медицинской статистике с применением современных методов виртуального математического анализа, а именно, с использованием программы «Statistica 10.0». Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Результаты представляли в формате Me [min; max], где Me – медиана, min – минимальное и max – максимальное значение. Для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест). Для проверки равенства медиан нескольких выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса. Для оценки ранговой корреляции использовали коэффициент Спирмена. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

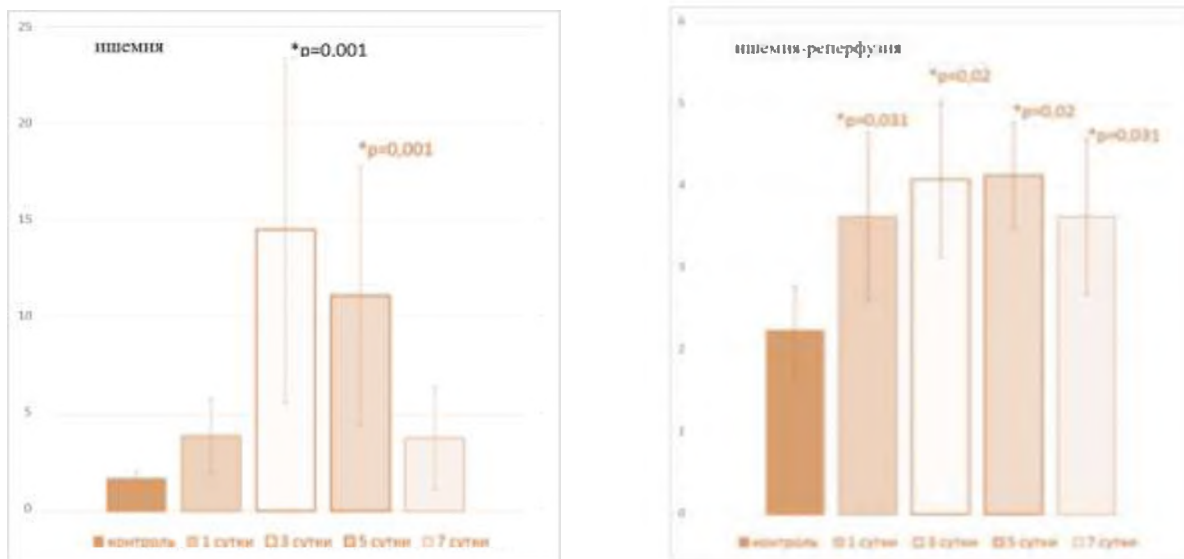
Окисление белков представляет собой процесс их ковалентной модификации, вызванный непосредственным воздействием активных форм кислорода и/или активных форм азота, а также кос-

венным взаимодействием с вторичными побочными продуктами окислительного стресса [12, 13]. Продукция активных форм кислорода является важным звеном в развитии патологии на фоне окислительного стресса.

Развитие окислительного стресса при ишемии-реперфузии наблюдается с 1 по 7 сутки, о чем свидетельствует увеличение общей площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков, а при ишемии – на 3 и 5 сутки (рис. 1).

Установленная динамика развития окислительного стресса в условиях ишемии является последствием гипоксии, в условиях которой происходит дополнительная генерация радикальных продуктов, повышается интенсивность окислительной деструкции белков, что в итоге может приводить к нарушению структуры и функции клеточных мембран и клеток в целом.

При ишемии-реперфузии активация свободно-радикальных процессов стимулируется напряжением кислорода, что является более интенсивным процессом, чем дополнительная генерация свободных радикалов в условиях гипоксии, и отражается в развитии окислительного стресса на 1 сутки.



Примечание: *- статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

Рис. 1. Оценка окислительной модификации белков плазмы при ишемии (слева) и ишемии-реперфузии (справа)

Характерным признаком карбонильных производных окисленных белков является формирование СО-группы (альдегид- и кето-группы): альдегидные производные окисленных белков принято считать ранними маркерами окислительного повреждения белка, а кетонные – поздними маркерами [14], характеризующими степень окислительной деструкции белковой молекулы.

С целью оценки степени повреждения белковых молекул проводили анализ

доли первичных и вторичных маркеров окислительного стресса. Из приведенных результатов следует, что при моделировании ишемии нарастает доля первичных маркеров относительно показателей контрольной группы на 3 и 5 сутки (табл. 1), а при моделировании ишемии-реперфузии преобладают вторичные маркеры на 3, 5, 7 сутки (табл. 1), что свидетельствует об усугублении окислительного стресса и переходе в позднюю стадию.

Таблица 1

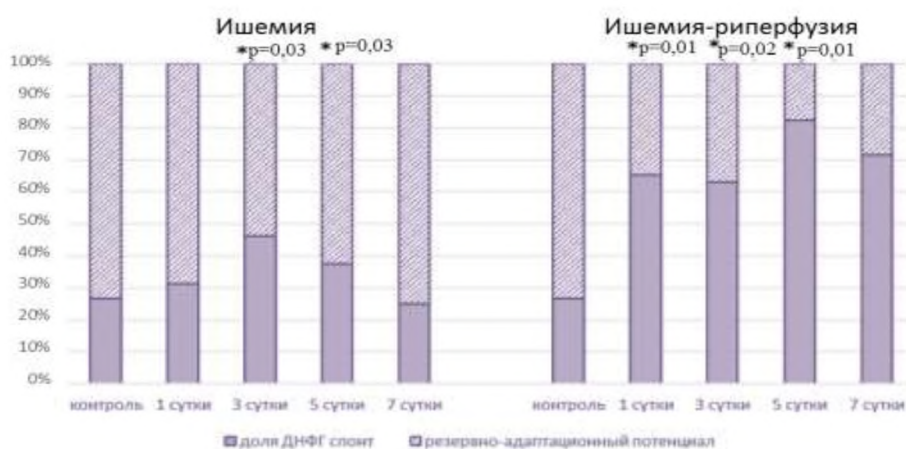
Значения доли первичных и вторичных маркеров (%) окислительного стресса при ишемии и ишемии-реперфузии в плазме

	ишемия		ишемия-реперфузия	
	Первичные маркеры (АДФНГ)	Вторичные маркеры (КДФНГ)	Первичные маркеры (АДФНГ)	Вторичные маркеры (КДФНГ)
контроль	73,4[70,3;78,2]	26,6[24,2;28,2]	73,4[70,3;78,2]	26,6[24,2;28,2]
1 сутки	73,4[71,3;79,1]	26,6[23,8;27,9]	76,7[72,3;79,3]	23,3[20,2;26,1]
3 сутки	82,5[79,3;85,7]* p=0,02	17,5[15,6;19,1]* p=0,02	61,6[64,1;76,8]* p=0,03	38,4[31,5;40,2]* p=0,03
5 сутки	78,1[74,2;81,9]* p=0,031	21,9[19,3;26,5]* p=0,031	62,6[60,1;74,9]* p=0,001	37,4[34,1;41,7]* p=0,001
7 сутки	74,5[71,2;77,1]	25,5[23,1;27,6]	55,7[51,3;59,6]* p=0,001	44,3[41,3;47,3]* p=0,001

Примечание: *- статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05); АДФНГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДФНГ – кетон-динитрофенилгидразоны.

Анализ спонтанной и металл-зависимой окислительной модификации белков позволяет оценить резервно-адаптационный потенциал, который косвенно характеризует оборот белковых молекул.

Полученные результаты демонстрируют истощение резервно-адаптационного потенциала на 3 и 5 сутки при моделировании ишемии (рис. 2), и на 1, 3, 5 сутки при моделировании ишемии-реперфузии (рис. 2).

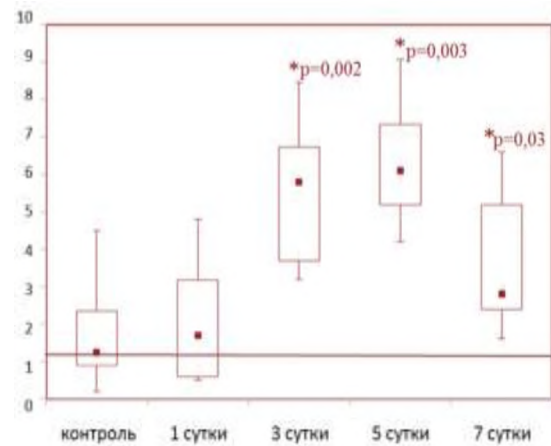
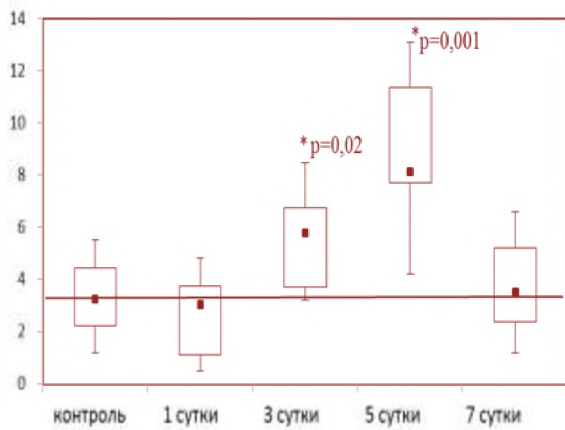


Примечание: *- статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

Рис. 2. Состояние резервно-адаптационного потенциала (%) белков плазмы при экспериментальном моделировании ишемии и ишемии-реперфузии

В послеоперационном периоде при моделировании ишемии наблюдается увеличение активности катепсина В плазмы на 3 и 5 сутки, при этом к 7 суткам актив-

ность возвращалась к исходным значениям (рис. 3), а активность катепсина L превышала значения контрольной группы с 3 по 7 сутки (рис. 3).

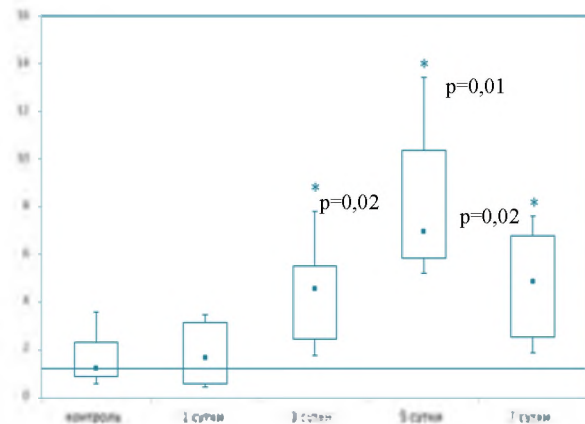
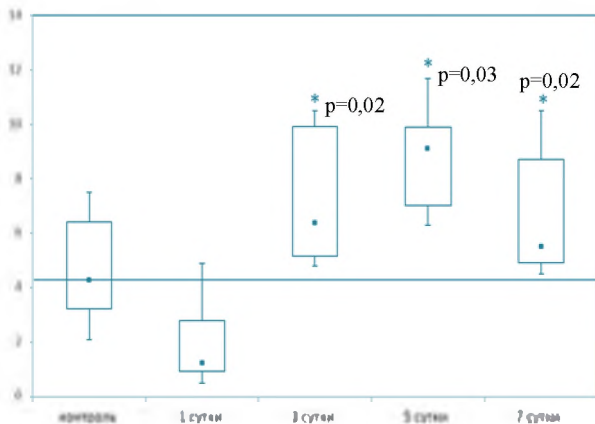


Примечание: *- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рис. 3. Активность катепсина В (слева) и L (справа) плазмы при ишемии

При экспериментальном моделировании ишемии-реперфузии наблюдается

увеличение активности катепсинов В и L плазмы с 3 по 7 сутки (рис. 4).



Примечание: *- статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рис. 4. Активность катепсина В (слева) и L (справа) плазмы при ишемии-реперфузии

Приведенные результаты показывают, что при экспериментальном моделировании ишемии окислительный стресс носит обратимый характер. Таким образом, на фоне истощения резервно-адаптационного потенциала (3, 5 сутки) наблюдается активация лизосомальных цистеиновых протеиназ В и L, вследствие чего модифицированные белки разрушают-

ся протеолитическими системами с образованием пептидов, которые могут быть направлены на синтез новых необходимых клетке протеинов.

Истощение резервно-адаптационного потенциала с 1 по 5 сутки при моделировании ишемии-реперфузии демонстрирует накопление модифицированных протеинов в клетке вследствие глубокого по-

вреждения частично окисленного белка. Стоит отметить, что необратимое окисление белков делает невозможным их деградацию протеолитическими системами, что приводит к формированию белковых агрегатов. В этих патологических условиях лизосомы играют важную роль в жизнедеятельности клетки, так как способны индуцировать каспаз-зависимый и лизосомно-зависимый апоптоз клетки [15-17].

При анализе полученных данных были выявлены прямые корреляционные связи между общей площадью под кривой окислительной модификации белков и общей активностью катепсина L плазмы при ишемии на 3, 5 сутки, при ишемии-реперфузии только на 3 сутки (табл. 2), что свидетельствует о существовании взаимосвязи между развитием окислительного стресса и активацией катепсина L.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции (R) между общим содержанием карбонильных производных белков и общей активностью катепсинов В, L плазмы при экспериментальном моделировании ишемии и ишемии-реперфузии

	катепсин В		катепсин L	
	ишемия	ишемия-реперфузия	ишемия	ишемия-реперфузия
контроль	0,36	0,24	0,45	0,33
1 сутки	0,38	0,20	0,49	0,20
3 сутки	0,19	-0,57	0,65* p=0,01	0,79* p=0,01
5 сутки	-0,05	-0,06	0,71* p=0,02	0,19
7 сутки	0,2	0,19	0,23	-0,16

Примечание: *-статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)

Выводы

1. При экспериментальном моделировании ишемии окислительный стресс развивается на 3, 5 сутки, что сопровождается истощением резервно-адаптационного потенциала и преобладанием первичных маркеров, при этом активация катепсинов В и L плазмы способствует удалению поврежденных белковых молекул.

2. При экспериментальном моделировании ишемии-реперфузии окислитель-

ный стресс развивается на 1, 3, 5, 7 сутки, что сопровождается истощением резервно-адаптационного потенциала и преобладанием вторичных маркеров, при этом активация катепсинов В и L плазмы возможна вследствие развития апоптоза клетки.

3. Между окислительным карбонилированием белков и активностью катепсина L плазмы выявлена положительная корреляционная связь на 3, 5 сутки при ишемии, на 3 сутки при ишемии-реперфузии.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Сучков И.А., Пшенников А.С., Герасимов А.А., Агапов А.Б., Камаев А.А. Профилактика рестенозов в реконструктивной хирургии магистральных артерий // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2013. №2. С. 12-19.

2. Hristova M., Penev M. Oxidative stress and cardiovascular diseases // Vascul.

Pharmacol. 2012. Vol. 12, №3. P. 296-303.

3. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А., Исаков С.А. Окислительная модификация белков и изменение активности катепсина L селезенки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2013. №1. С. 44-48. DOI:10.17816/PAVLOVJ2013144-48

4. Vasil'ev Y.V. [et al.] Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: Adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification // *Mass Spectrometry Reviews*. 2013. Vol. 33, № 3. P. 157-182.
5. Hannaford J. [et al.] Involvement of cathepsins B and L in inflammation and cholesterol trafficking protein NPC2 secretion in macrophages // *Obesity (Silver Spring)*. 2013. Vol. 21, №8. P. 1586-1595.
6. Cheng X.W. [et al.] Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis-based vascular disease and its complications // *Hypertension*. 2011. Vol. 58, № 6. P. 978-86.
7. Fraisl P. [et al.] Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism // *Dev Cell*. 2009. Vol. 16, №2. P. 167-179.
8. Дубинина Е.Е. [и др.] Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // *Вопр. мед. химии*. 1995. Т. 41, № 1. С. 24-26.
9. Пат. 2524667 РФ, МПК G01N33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях / Фомина М.А. и др.; Ряз. гос. мед. ун-т им. И.П. Павлова. 2013102618/15; заявл. 21.01.2013; опубл. 27.07.2014, Бюл. №21. 8 с.
10. Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L // *Methods in Enzymol*. 1981. Vol. 80. P. 535-561.
11. Никитина Ю.В., Мухина И.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе // *Вестн. Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. 2009. №6 (1). С. 124-131.
12. Baraibar M.A., Ladouce R., Friguet B. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging // *Journal of Proteomics*. 2013. Vol. 92. P. 67-70.
13. Isabella Dalle-Donnea [et al.] Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clinica Chimica Acta*. 2003. Vol. 329. P. 23-38.
14. Губский Ю.И. [и др.] Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях // *Совр. пробл. токсикологии*. 2005. Т. 8, №3. С. 20-27.
15. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция // *Биохимия*. 2004. Т. 69, вып. 10. С. 1301-1313.
16. Яровая Г.А. [и др.] Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза // *Лабораторная медицина*. 2011. № 11. С. 39-52.
17. Stoka Veronika, Boris Turk, Vito Turk. Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis // *IUBMB Life*. 2005. Vol. 57, №4/5. P. 347-353.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Калинин Р.Е. – д.м.н., проф., зав. кафедрой сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань.

E-mail: kalinin-re@yandex.ru

Абаленихина Ю.В. – к.б.н., ст. преподаватель кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань.

E-mail: abaleniuhina88@mail.ru

Пшенников А.С. – к.м.н., доцент кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань.

E-mail: pshennikov1610@rambler.ru

Сучков И.А. – д.м.н., профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань.

E-mail: suchkov_med@mail.ru

Исаков С.А. – д.м.н., профессор кафедры дерматовенерологии, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

INTERRELATION BETWEEN OXIDATIVE CARBONYLATION OF PROTEINS AND LYSOSOMAL PROTEOLYSIS OF PLASMA IN EXPERIMENTALLY MODELLED ISCHEMIA AND ISCHEMIA-REPERFUSION

R.E. KALININ, Yu.V. ABALENIKHINA, A.S. PSHENNIKOV, I.A. SUCHKOV, S.A. ISAKOV

Ryazan State Medical University, Vysokovolt'naya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

The aim is to analyze dependence of lysosomal cysteine proteolysis on the extent of oxidative modification of proteins in experimental modelling of ischemia and ischemia-reperfusion.

The research was conducted on laboratory animals – rats of Wistar line. Two experimental models were created – ischemia and reperfusion by compression of the abdominal aorta (the first group) with subsequent conditioning (the second group). Activity of lysosomal proteinases and the level of oxidatively modified proteins were determined in blood plasma in the following periods after surgical intervention: 1st, 3^d, 5th, 7th days in both groups, respectively. For control plasma of intact animal was examined. Activity of lysosomal cysteine proteinases B, L in experimentally modeled ischemia and ischemia-reperfusion was studied using spectrofluorimetric method according to Barrett & Kirschke. Oxidative modification of proteins was evaluated by determination of levels of carbonyl derivatives by method of R.V. Levine in E.E. Dubinina's modification. Integrated assessment of oxidative modification of plasma proteins was given, namely: the area under the absorption spectrum curve of protein carbonylation products, shares of the primary and secondary markers of oxidative stress and reserve-adaptation potential were calculated. Statistical significance of differences between independent samples was analyzed by Mann-Whitney rank test (U-test). Equality of medians of several samples was checked by Kruskal-Wallis test. Rank correlation was evaluated using Spearman's coefficient.

The obtained results demonstrate development of oxidative stress from 1st to 7th day in ischemia-reperfusion and on the 3^d and 5th day in ischemia, accompanied by activation of cathepsins B and L. In ischemia and ischemia-reperfusion depletion of reserve-adaptation potential was noted, with predomination of primary markers in ischemia and of secondary markers in reperfusion. Data analysis evidences a positive correlation between oxidative carbonylation of proteins and activity of plasma cathepsin L on the 3^d, 5th day in ischemia and on the 3^d day in ischemia-reperfusion.

Keywords: oxidative modification of proteins, cathepsins B, L, ischemia, ischemia-reperfusion.

Oxidative stress being a molecular dysregulation of metabolism plays a key role in the pathogenesis of atherosclerosis, vascular inflammation, endothelial dysfunction and in loss of bioaccessibility of nitric oxide [1, 2]. Since oxidative stress is a common sign

of almost all cardiovascular pathologies, and modification of proteins is a reliable criterion for its evaluation, it is reasonable to use carbonyl derivatives of proteins as a biomarker reflecting the extent of damage in modelled ischemia and ischemia-reperfusion.

For their turn, proteolytic systems are regarded as one of probable protective mechanisms against accumulation of oxidatively modified proteins and as a perfect controller of protein metabolism [3, 4]. Besides, lysosomal proteinases are important factors for development of cardiovascular diseases including those associated with inflammation [5]. Nowadays, there is an evidence of enhanced expression of lysosomal cathepsins L and B in the region of atherosclerotic lesion of vessel [6] and participation of cathepsin B in processes of formation of blood vessels [7].

Thus, involvement of cathepsins and oxidative stress in development of pathophysiological conditions is out of doubt, but, however, interrelation of these processes still remains unstudied.

Aim of Research

To analyze dependence of condition of lysosomal cysteine proteolysis on the extent of oxidative modification of proteins in experimentally modelled ischemia and ischemia-reperfusion.

Materials and Methods

Research was conducted on experimental animals (rats of Wistar line) in accordance with the ethical norms stated in "European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes" (Strasburg, 1986) and Order of Ministry of Health of the Russian Federation № 267 of 19.06.2003 "On the approval of rules of laboratory practice". For realization of the experiment two models were created – ischemia and reperfusion by compression of the abdominal aorta (the first group) with subsequent conditioning (the second group). All operations were conducted with narcosis using "Xylo" 1mg/kg and "Zoletil 50" 15 mg/kg medical drugs. The activity of lysosomal proteinases and the level of oxidatively modified proteins were determined in blood plasma in the following time periods of the surgical intervention: 1st, 3^d, 5th, 7th days in both groups respectively. For control, plasma of an intact animal was studied.

Oxidative modification of proteins was evaluated by determination of the level of carbonyl derivatives by R.L. Levine method

in E.E. Dubinina's modification [8]. The area under the curve of absorption spectrum of protein oxidative modification products was calculated by proprietary methodology [9], with expression of the obtained values in conventional unit/gram of protein.

Activity of cathepsins B, L was studied by spectrofluorimetric method according to Barrett & Kirschke [10]. Specific activity of cathepsin in plasma was expressed in nmol of amido-methylcoumarin/sec x g of protein.

The share of the primary markers was evaluated by counting the sum of aldehyde-dinitrophenylhydrazones, and the share of the secondary markers – by counting the sum of ketone-dinitrophenylhydrazones with correlation of these sums with the total content of carbonyl derivatives of proteins (S_{tot}).

Reserve-adaptation potential was evaluated by calculation of ratio of the area under carbonyl derivatives of proteins in spontaneous oxidation of proteins to that in oxidation induced by Fenton reaction [11].

Statistical analysis of research results was conducted according to the guidelines on medical statistics using modern methods of virtual mathematical analysis, in particular, "Statistica 10.0" program. Normality of distribution of data was tested using Shapiro-Wilk test (W-test). The results were presented in Me format [min; max] where Me – median, min – minimal value and ma – maximal value. Statistical significance of differences between independent samples was estimated by Mann-Whitney rank test (U-test). For evaluation of equality of medians in several samples, Kruskal-Wallis test was used. Rank correlation was evaluated using Spearman's coefficient. The critical level of significance of the null statistical hypothesis (p) was assumed to be 0.05.

Results and Discussion

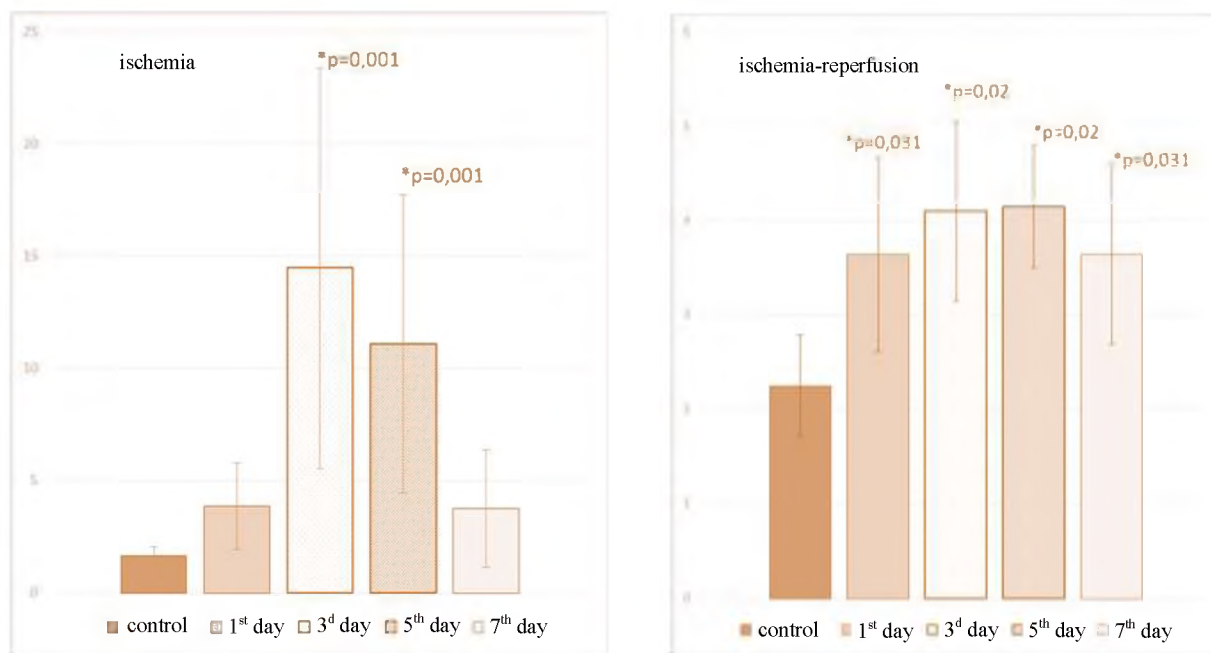
Oxidation of proteins is a process of their covalent modification under direct action of active forms of oxygen and/or active forms of nitrogen, and also in result of indirect interaction with secondary byproducts of oxidative stress [12, 13]. Production of active forms of oxygen is an important factor in development of pathology with the underlying oxidative stress.

Development of oxidative stress in ischemia-reperfusion is observed from the 1st to 7th day and is evidenced by increase in the total area under the curve of absorption spectrum of products of oxidative modification of proteins, and in ischemia – on the 3^d and 5th day (fig. 1).

The proven dynamics of development of the oxidative stress in ischemia is a consequence of hypoxia associated with additional generation of radical products, with en-

hancement of oxidative destruction of proteins which may finally lead to disorders in the structure and functions of cell membranes and of cells in the whole.

In ischemia-reperfusion activation of free radical processes is stimulated by oxygen tension which is a more intense process than additional generation of free radicals in hypoxia and is reflected in development of oxidative stress on the 1st day.



Note: * - statistically significant differences from the control group (p<0.05)

Fig. 1. Evaluation of oxidative modification of plasma proteins in ischemia (left) and ischemia-reperfusion (right)

A characteristic sign of carbonyl derivatives of oxidized proteins is formation of CO-group (aldehyde- and keto-group): aldehyde derivatives of oxidized proteins are considered early markers of oxidative damage to proteins, and ketone derivatives are considered late markers [14], characterizing the extent of oxidative destruction of protein molecule.

The extent of damage to protein molecules was estimated by analysis of shares of

the primary and secondary markers of the oxidative stress. It follows from the given results that in modelled ischemia the share of primary markers increases on the 3^d and 5th day relative to the parameters of control group (tab. 1), while in modelled ischemia-reperfusion secondary markers predominate on the 3^d, 5th, 7th day (tab. 1) which evidences aggravation of oxidative stress and progression to the later stage.

Table 1

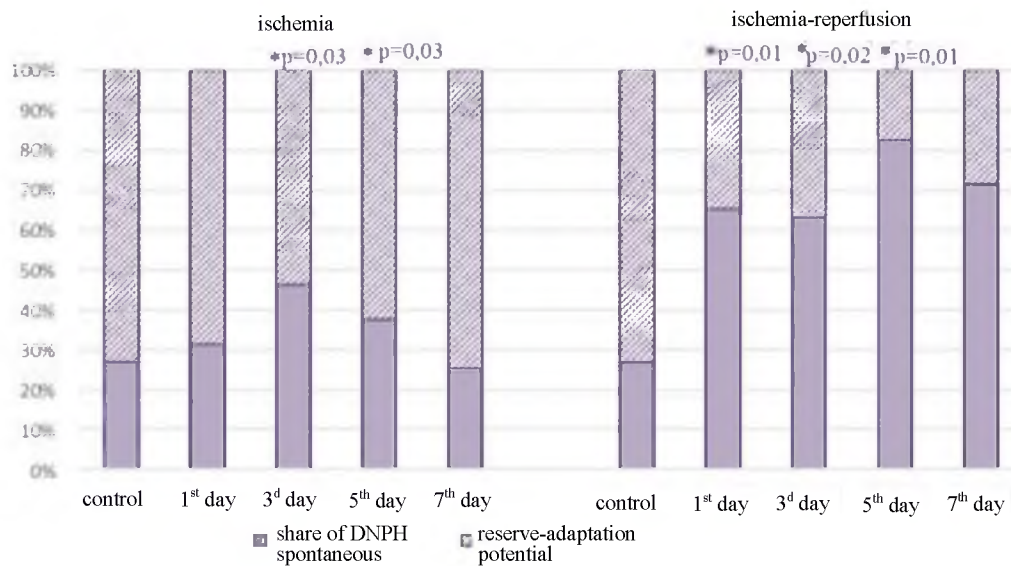
Shares of Primary and Secondary Markers (%) of Oxidative Stress in Plasma in Ischemia and Ischemia-Reperfusion

	Ischemia		Ischemia-Reperfusion	
	Primary Markers (ADNPH)	Secondary Markers (KDNPH)	Primary Markers (ADNPH)	Secondary Markers (KDNPH)
control	73,4[70,3;78,2]	26,6[24,2;28,2]	73,4[70,3;78,2]	26,6[24,2;28,2]
1 st day	73,4[71,3;79,1]	26,6[23,8;27,9]	76,7[72,3;79,3]	23,3[20,2;26,1]
3 ^d day	82,5[79,3;85,7]* p=0,02	17,5[15,6;19,1]* p=0,02	61,6[64,1;76,8]* p=0,03	38,4[31,5;40,2]* p=0,03
5 th day	78,1[74,2;81,9]* p=0,031	21,9[19,3;26,5]* p=0,031	62,6[60,1;74,9]* p=0,001	37,4[34,1;41,7]* p=0,001
7 th day	74,5[71,2;77,1]	25,5[23,1;27,6]	55,7[51,3;59,6]* p=0,001	44,3[41,3;47,3]* p=0,001

Note: *- statistically significant differences from control group (p<0.05); ADNPH – aldehyde-dinitrophenylhydrazones, KDNPH – ketondinitrophenylhydrazones.

Analysis of spontaneous and metal-dependent oxidative modification of proteins permits to evaluate reserve-adaptation potential which indirectly characterizes rotation of protein molecules. The obtained results

show depletion of reserve-adaptation potential on the 3^d and 5th days in modelling of ischemia (fig. 2) and on 1st, 3^d and 5th day in modelling of ischemia-reperfusion (fig. 2).

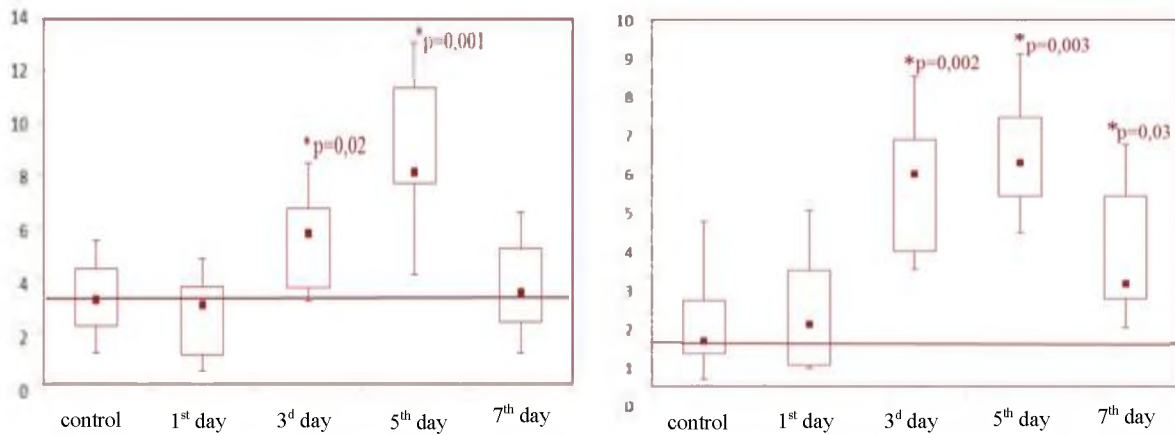


Note: *- statistically significant differences from control group (p<0.05);

Fig. 2. Reserve-adaptation potential (%) of plasma proteins in experimentally modelled ischemia and ischemia-reperfusion

In postoperative period in modelled ischemia activity of plasma cathepsin B increased on the 3^d and 5th day and recovered to the ini-

tial values by the 7th day (fig. 3), while activity of cathepsin L exceeded the values of the control group from the 3^d to 7th day (fig. 3).

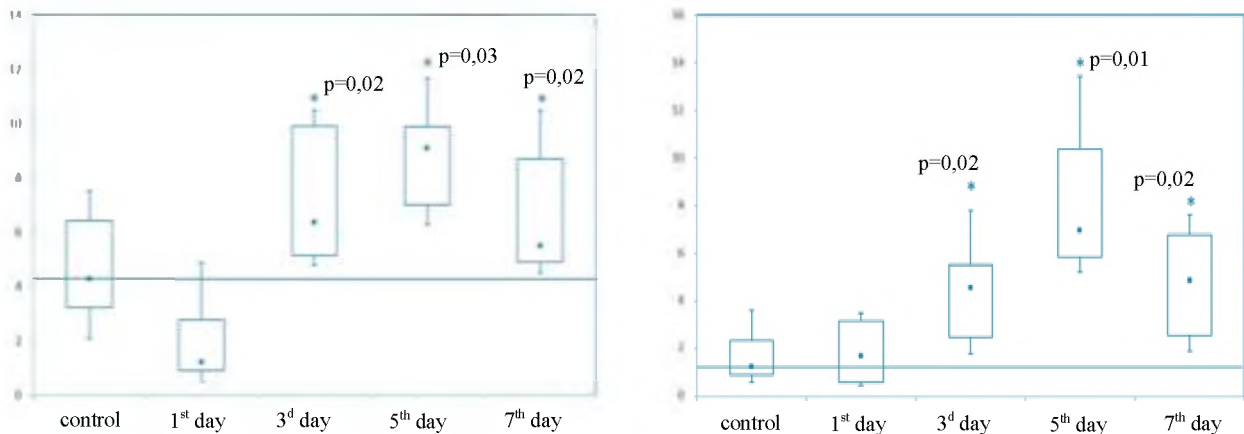


Note: *- statistically significant differences from control group ($p < 0.05$)

Fig. 3. Activity of cathepsin B (left) and of cathepsin L (right) in ischemia

In experimentally modelled ischemia-reperfusion increase in the activity of plasma

cathepsins B and L was noted from 3^d to 7th day (fig. 4).



Note: *- statistically significant differences from control group ($p < 0.05$)

Fig. 4. Activity cathepsin B (left) and cathepsin L (right) of plasma in ischemia-reperfusion

The given results show that in experimental model of ischemia oxidative stress is reversible. Thus, with depletion of reserve-adaptation potential (3^d, 5th day) activation of lysosomal cysteine proteinases B and L is seen with resultant destruction of modified proteins by proteolytic systems with production of peptides that can be used for synthesis of new proteins needed by cells.

Depletion of reserve-adaptation potential from 1st to 5th day in modelled ischemia-reperfusion is indicated by accumulation of modified proteins in cells due to profound damage of partially oxidized protein. It

should be noted that irreversible oxidation of proteins makes their degradation by proteolytic systems impossible which results in production of protein aggregations. In these pathological conditions lysosomes play an important role in the vital activity of cell due to their ability to induce caspase-dependent and lysosome-dependent apoptosis of cell [15, 16, 17].

Analysis of the obtained data revealed direct correlative relationships between the total area under the curve of oxidative modification of proteins and the total activity of plasma cathepsin L on 3^d, 5th day in ischemia

and only on the 3^d day (tab. 2) in ischemia-reperfusion, which evidences existence of

interrelation between development of oxidative stress and activation of cathepsin L.

Table 2

Correlation Coefficients (R) between Total Content of Carbonyl Derivatives of Proteins and Total Activity of Cathepsins B, L of Plasma in Experimental Modelling of Ischemia and Ischemia-Reperfusion

	Cathepsin B		CathepsinL	
	Ischemia	Ischemia-Reperfusion	Ischemia	Ischemia-Reperfusion
control	0,36	0,24	0,45	0,33
1 st day	0,38	0,20	0,49	0,20
3 ^d day	0,19	-0,57	0,65* p=0,01	0,79* p=0,01
5 th day	-0,05	-0,06	0,71* p=0,02	0,19
7 th day	0,2	0,19	0,23	-0,16

Note: *- statistically significant differences from control group (p<0.05);

Conclusions

1. In experimental modelling of ischemia oxidative stress develops on the 3^d, 5th day which is accompanied by depletion of reserve-adaptation potential and predomination of primary markers; here, activation of plasma cathepsins B and L promotes elimination of damaged protein molecules.

2. In experimental modelling of ischemia-reperfusion oxidative stress develops on

the 1st, 3^d, 5th, 7th day accompanied by depletion of reserve-adaptation potential and predomination of secondary markers; here, activation of plasma cathepsins B and L is possible in result of development of cell apoptosis.

3. A positive correlative relationship between oxidative carbonylation of proteins and activity of plasma cathepsin L is revealed on the 3^d, 5th day in ischemia and on the 3^d day in ischemia-reperfusion.

No conflict of interest.

References

1. Suchkov IA, Pshennikov AS, Gerasimov AA, Agapov AB, Kamaev AA Profilaktika restenozov v rekonstruktivnoj hirurgii magistral'nyh arterij [Prophylaxis of restenoses in reconstructive surgery of the major arteries] *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium) [Science of the Young (Eruditio Juvenium)]*. 2013; 2: 12-9. (in Russian)

2. Hristova M, Penev M. Oxidative stress and cardiovascular diseases. *Vascul. Pharmacol.* 2012; Vol. 12, 3: 296-303.

3. Abalenikhina YuV, Fomina MA, Isakov SA. Okislitel'naja modifikacija belkov i izmenenie aktivnosti katepsina L selebenki krys v uslovijah modelirovanija deficit sinteza oksida azota [Oxidative modification of proteins and change in activity of cathepsin L of the lien of rats in conditions of

modelled deficiency of nitric oxide synthesis] *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2013; 1: 44-8. DOI:10.17816/PAVLOVJ2013144-48 (in Russian)

4. Vasilyev YV [et al.] Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: Adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification. *Mass Spectrometry Reviews*. 2013; (33) 3: 157-82.

5. Hannaford J [et al.]. Involvement of cathepsins B and L in inflammation and cholesterol transport protein NPC2 secretion in macrophages. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Aug.; (21) 8: 1586-95.

6. Cheng XW [et al.]. Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis-based vas-

cular disease and its complications. *Hypertension*. 2011 Dec.; (58) 6: 978-86.

7. Fraisl P[at al.]. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell*. 2009 Feb.; (16) 2: 167-79.

8. Dubinina E.E. [et al.] Okislitel'naja modifikacija belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ejo opredelenija [Oxidative modification of serum proteins of human, method of its determination] *Vopr. med. Himii [Questions of medical chemistry]*. 1995; (41) 1: 24-6. (in Russian)

9. Pat. 2524667 RF, MPK G01N33/52. Sposob kompleksnoj ocenki sodержanija produktov okislitel'noj modifikacii belkov v tkanjah i biologicheskikh zhidkostjakh [Method of complex assessment of content of protein oxidative modification products in tissues and biological fluids] / M.A. Fomina et al; Rjaz. gos. med. un-t im. I.P. Pavlova [acad. I.P. Pavlov Ryaz. State Medical Un-ty]. – 2013102618/15; zajavl. 21.01.2013; opubl. 27.07.2014, Bjul. №21. 8 p. (in Russian)

10. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L. *Methods in Enzymol.* 1981; 80: 535-61.

11. Nikitina YuV, Mukhina IV. Izmenenija okislitel'nyh processov v tkani golovnogo mozga i krovi krysa v rannem ontogeneze [Changes in oxidizing processes in brain tissue and blood of rats in early ontogenesis] *Vestn. Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo [Herald of N.I. Lobachevsky*

University of Nizhny Novgorod]. 2009; (6) 1: 124-31. (in Russian)

12. Baraibar MA, Ladouce R, Friguet B. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *Journal of Proteomics*. 2013; 92: 67-70.

13. Dalle-Donnea Isabella [et al.] Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. 2003; Vol. 329: 23-38.

14. Gubskij YuI [i dr.] Toksikologicheskie posledstvija okislitel'noj modifikacii belkov pri razlichnyh patologicheskikh sostojanijah [Toxicological consequences of oxidative modification of proteins indifferent pathological states]. *Sovr. probl. Toksikologii [Modern problems of toxicology]*. 2005; (8) 3: 20-7. (in Russian)

15. Gordeeva AV, Labas YuA, Zvyagil'skaya RA. Apoptoz odnokletochnykh organizmov: mehanizmy i jevoljucija [Apoptosis of unicells: mechanisms and evolution]. *Biohimija [Biochemistry]*. 2004; (69) 10: 1301-13. (in Russian)

16. Yarovaya GA [et al.]. Rol' proteoliticheskikh fermentov v kontrole razlichnyh stadij apoptoza. [Role of proteolytic enzymes in control of various stages of apoptosis]. *Laboratornaja medicina [Laboratory medicine]*. 2011; 11: 39-52. (in Russian)

17. Stoka Veronika, Boris Turk, Vito Turk. Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis. *IUBMB Life*. 2005; (57) 4/5: 347-53.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kalinin R.E. – MD, PhD, DSc, professor, head of cardiovascular, roentgen-endovascular, operative surgery and topographic anatomy department, Ryazan State Medical University, Ryazan.

E-mail: kalinin-re@yandex.ru

Abalenikhina Yu.V. –PhD (Biol. Sc.), senior lecturer of biological chemistry department with course of clinical laboratory diagnostics, Ryazan State Medical University, Ryazan.

E-mail: abalenihina88@mail.ru

Pshennikov A.S. – MD, PhD, associate professor of cardiovascular, roentgen-endovascular, operative surgery and topographic anatomy department, Ryazan State Medical University, Ryazan.

E-mail: pshennikov1610@rambler.ru

Suchkov I.A. – MD, PhD, DSc, professor of cardiovascular, roentgen-endovascular, operative surgery and topographic anatomy department, Ryazan State Medical University, Ryazan.

E-mail: suchkov_med@mail.ru

Isakov S.A. – MD, PhD, DSc, professor of dermatovenerology department, Ryazan State Medical University, Ryazan.