

## УЧАСТИЕ ТИОЛДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В НЕЙТРОФИЛАХ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Елена Алексеевна СТЕПОВАЯ<sup>1</sup>, Татьяна Васильевна ЖАВОРОНОК<sup>1</sup>, Галина Викторовна ПЕТИНА<sup>1</sup>,  
Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА<sup>1</sup>, Владимир Владимирович ИВАНОВ<sup>1</sup>, Федор Федорович ТЕТЕНЕВ<sup>1</sup>,  
Татьяна Сергеевна АГЕЕВА<sup>2</sup>, Вячеслав Викторович НОВИЦКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава  
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup>ФГОУ ВПО Томский военно-медицинский институт МО РФ  
634041, г. Томск, пр. Кирова, 49

Исследовали роль тиолдисульфидной системы в реализации механизмов защиты белков от окислительной модификации в нейтрофилах крови при окислительном стрессе *in vitro* и развивающемся при остром воспалении. Показано, что в условиях действия протектора SH-групп 1,4-дитиозэритрита в нейтрофильных лейкоцитах крови пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе происходит снижение содержания карбонильных производных белков. При инкубировании клеток с ингибитором каталазы или ингибитором синтеза глутатиона выявлено, что дефицит восстановленного глутатиона и нарушение образования белково-связанного глутатиона в нейтрофилах у больных внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе приводят к активации окислительной модификации белков.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, тиолдисульфидная система, окислительный стресс, окислительная модификация белков.

Тиолдисульфидная система клеток давно привлекает внимание исследователей. Известна роль восстановленного глутатиона как редокс-буфера и антиоксиданта, имеющего большое значение в поддержании тиолдисульфидного состояния белков и защите клеток от окислительного стресса (ОС) при старении, онкологических, нейродегенеративных и воспалительных заболеваниях [1, 2]. Регуляция важнейших биологических процессов в клетках связана с изменениями редокс-состояния тиоловых групп в белках [3, 4]. Изучение механизмов антиоксидантной защиты в нейтрофилах при ОС актуально в плане поиска путей увеличения эффективности их функционирования как эффекторных клеток острого воспаления. Цель настоящей работы: оценка роли компонентов тиолдисульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков нейтрофилов крови при внебольничной пневмонии и окислительном стрессе *in vitro*.

### Материал и методы

Материалом служила венозная кровь, полученная у 48 больных внебольничной пневмонией сред-

ней степени тяжести (23 мужчины и 25 женщин в возрасте от 18 до 50 лет, средний возраст  $36 \pm 4$  лет) и 27 здоровых доноров-добровольцев (10 мужчин и 17 женщин в возрасте от 18 до 50 лет, средний возраст  $33 \pm 6$  лет). Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.). Кровь забирали, используя вакуумные системы BD VACUTAINER™ (Greiner-bio-one, Австрия) с гепарином лития. Нейтрофилы выделяли на двойном градиенте плотности Ficoll-Paque (1,077 г/см<sup>3</sup>) (GE Healthcare, Швеция) и фиколл-урографин (1,095 г/см<sup>3</sup>) (фиколл – GE Healthcare, Швеция; урографин – «Шеринг», Россия). Суспензию нейтрофилов трижды отмывали в среде RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), стандартизовали количество клеток до  $2 \times 10^6$  в 1 мл среды. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5 % трипановым синим (Serva, США) составляла 95 %. Клетки культивировали в полной питательной среде (90 % RPMI-1640, 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гента-

Степовая Е.А. — д.м.н., проф. кафедры биохимии и молекулярной биологии, e-mail: [muir@mail.ru](mailto:muir@mail.ru)

Жаворонок Т.В. — к.м.н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии, e-mail: [tavaza@ngs.ru](mailto:tavaza@ngs.ru)

Петина Г.В. — аспирант кафедры биохимии и молекулярной биологии, e-mail: [galap1@rambler.ru](mailto:galap1@rambler.ru)

Рязанцева Н.В. — д.м.н., проф., зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины, e-mail: [ryazan@mail.tomsknet.ru](mailto:ryazan@mail.tomsknet.ru)

Иванов В.В. — к.б.н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии, e-mail: [biochemistry@ssmu.net.ru](mailto:biochemistry@ssmu.net.ru)

Тетенев Ф.Ф. — д.м.н., проф., зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней, e-mail: [fieteney@list.ru](mailto:fieteney@list.ru)

Агеева Т.С. — к.м.н., доцент, зав. кафедрой терапии и усовершенствования врачей, e-mail: [ts.ageeva@mail.ru](mailto:ts.ageeva@mail.ru)

Новицкий В.В. — зав. кафедрой патологической физиологии, академик РАМН, e-mail: [office@ssmu.tomsk.ru](mailto:office@ssmu.tomsk.ru)

мицина, 2 мМ HEPES (Flow, Великобритания) в течение 18 ч при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>.

Для индукции ОС нейтрофилы, полученные у здоровых доноров, инкубировали в присутствии пероксида водорода в конечной концентрации 200 мкМ [5, 6]. Для оценки участия глутатиона в защите белков нейтрофилов от окислительной модификации в условиях ОС *in vitro* и при внебольничной пневмонии в среду инкубации добавляли либо 5 мМ протектора SH-групп 1,4-дитиозеритрита [7], либо 5 мМ блокатора SH-групп N-этилмалеимида [8], либо 1 мМ бутионинсульфоксимида, известного как ингибитор ключевого фермента синтеза глутатиона  $\gamma$ -глутамил-цистеинсинтетазы [9], либо 2 мМ 3-амино-1,2,4-триазола, ингибирующего каталазу [10].

После инкубации нейтрофилы трижды отмывали холодным 0,1 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,5) и ресуспендировали с добавлением 1 % тритона X-100, выдерживали на льду и готовили лизат с сохранением стандартной концентрации клеток.

Для определения содержания компонентов тиолдисульфидной системы лизат нейтрофилов депротеинировали с 5% сульфосалициловой кислотой [11]. Далее оценивали содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) по методике [12], основанной на ферментативной реакции рециркуляции и блокирования SH-групп GSH винилпирилидином (Wako, Япония). Для расчета концентрации глутатиона строили калибровочный график, используя раствор GSH (MP, США) с концентрациями от 3 до 100 мкМ. Определяли содержание SH-групп белка (белок-SH) и белково-связанного глутатиона (белок-SSG) методом [13], учитывая способность 1% боргидрида натрия (Sigma, США) высвобождать GSH из связи с белками. Содержание карбонильных производных белков в нейтрофилах оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора для определения окислительной модификации белков «Protein Carbonyl ELISA Kit» (Alexis Corporation, Швейцария). Концентрацию белка в пробах определяли методом М.М. Бредфорд [14], используя калибровочный график, построенный на основе стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина с концентрациями от 1 до 10 мкг/100 мл.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Данные представлены в таблицах в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>). Для проверки нормальности распределения показателей каждого параметра использовали тест Шапиро – Уилка. Достоверность различий независимых выборок оценивали, используя ранговый критерий Манна – Уитни, зависимых выборок – непараметрический критерий Вилкоксона. Для выявления взаимосвязей между показателями, оценки их силы и направления применяли непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Развитие ОС у больных внебольничной пневмонией способствовало снижению антиоксидантного потенциала нейтрофилов крови: концентрация GSH уменьшалась в 3,0 раза, а содержание GSSG было в 1,7 раза выше соответствующих контрольных значений ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). При этом в нейтрофилах у пациентов с внебольничной пневмонией величина отношения GSH/GSSG, характеризующая степень выраженности ОС, была в 6,5 раза ниже соответствующей величины в контроле ( $p < 0,05$ ).

Содержание GSH в нейтрофильных лейкоцитах при экспериментальном ОС было снижено в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ), а количество GSSG – увеличено в 2,0 раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 1), в результате чего величина отношения GSH/GSSG уменьшалась в 6,2 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Достоверных различий по содержанию GSH, GSSG и значению величины соотношения GSH/GSSG в нейтрофилах при ОС *in vitro* и в случае внебольничной пневмонии выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

Снижение редокс-потенциала тиолдисульфидной системы в нейтрофилах у больных внебольничной пневмонией и при экспериментальном ОС сопровождалось повышением содержания карбонильных производных белков. В обоих случаях он был задействован для защиты функциональных SH-групп внутриклеточных белков от необратимого окислительного повреждения, о чем свидетельствовало возрастание содержания белок-SSG на фоне снижения количества свободных SH-групп белка. Участие глутатиона в редокс-регуляции клеток связано, в частности, с образованием смешанных дисульфидов между тиоловыми группами белков и GSH, причем этот эффект обратим. После исчезновения прооксидантной нагрузки происходит репарация функциональных SH-групп белка путем отсоединения глутатиона [2]. Глутатионилирование функциональных редокс-чувствительных SH-групп цистеина в белках защищает их от окислительной дегградации активными формами кислорода уже на стадии сульфеновой кислоты (Cys-SOH), с которой и реагирует GSH. Этим предупреждается дальнейшее окисление цистеина до сульфиновой (Cys-SO<sub>2</sub>H) и сульфоновой (Cys-SO<sub>3</sub>H) кислот или участие сульфената в образовании внутри- и межмолекулярных связей в белках, а также в реакциях внутриклеточной редокс-регуляции [3, 15]. Окислительные модификации, модулирующие активность протеинов, в частности, образование карбонильных производных и глутатионилирование белков, могут участвовать в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофильных лейкоцитов.

Основные параметры, характеризующие состояние тиолдисульфидной системы (количество GSH, GSSG, величина соотношения GSH/GSSG) и окислительную модификацию белков (содержание карбонильных производных белков) в нейтрофилах крови при внебольничной пневмонии и экспериментальном ОС, индуцированном 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, статистически значимо не различались ( $p > 0,05$ ).

Таблица 1

Влияние блокатора SH-групп N-этилмалеимида и протектора SH-групп дитиоэритритола на состояние тиолдисульфидной системы и окислительную модификацию белков нейтрофилов крови в условиях окислительного стресса *in vitro* и у пациентов с внебольничной пневмонией (Ме ( $Q_1-Q_3$ ))

| Группы обследованных                |   | GSH,<br>нмоль/мг<br>белка | GSSG,<br>нмоль/мг<br>белка | Белок-SH,<br>нмоль/мг<br>белка | Белок-SSG,<br>нмоль/мг<br>белка | Карбонильные<br>производные<br>белков, пг/мг<br>белка |
|-------------------------------------|---|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| Здоровые доноры                     | Интактные нейтрофилы (контроль)   | 4,84<br>(4,64–5,39)       | 0,27<br>(0,25–0,31)        | 3,15<br>(2,83–3,39)            | 0,05<br>(0,03–0,08)             | 2,85<br>(2,01–3,29)                                   |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                    | 1,97<br>(1,45–2,40)*      | 0,55<br>(0,51–0,59)*       | 2,45<br>(2,28–2,85)*           | 0,32<br>(0,11–0,62)*            | 7,13<br>(6,82–8,30)*                                  |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и N-этилмалеимидом | 1,04<br>(1,02–1,12)*, ^   | 0,57<br>(0,52–0,64)*       | 0,35<br>(0,33–0,36)*, ^        | 0,37<br>(0,35–0,38)*            | 8,03<br>(7,60–8,78)*                                  |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и дитиоэритритолом | 3,18<br>(3,06–3,40)*, ^   | 0,41<br>(0,38–0,43)*, ^    | 2,61<br>(2,29–3,12)            | 0,16<br>(0,12–0,17)*, ^         | 2,87<br>(2,49–3,18)^                                  |
| Пациенты с внебольничной пневмонией | Интактные нейтрофилы  | 1,62<br>(1,23–1,92)*      | 0,47<br>(0,37–0,66)*       | 1,69<br>(1,50–1,93)*, ^        | 0,58<br>(0,47–0,70)*, ^         | 6,68<br>(5,73–7,94)*                                  |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с N-этилмалеимидом                                 | 1,11<br>(0,92–1,42)*, **  | 0,55<br>(0,52–0,72)*, **   | 0,45<br>(0,35–0,51)*, **       | 0,77<br>(0,69–0,87)*, **        | 8,28<br>(6,72–9,14)*, **                              |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с дитиоэритритолом                                 | 1,80<br>(1,44–1,96)*      | 0,49<br>(0,40–0,62)*       | 1,35<br>(1,06–1,90)*           | 0,55<br>(0,25–0,66)*            | 4,49<br>(3,77–5,09)*, **                              |

Примечание: здесь и в табл. 2 отличие достоверно при  $p < 0,05$  от соответствующего показателя: \* – в интактных нейтрофилах здоровых доноров, ^ – в нейтрофилах, инкубированных с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*\* – в интактных нейтрофилах пациентов с внебольничной пневмонией.

Это свидетельствует о том, что использованная нами концентрация пероксида водорода являлась адекватной для моделирования ситуации ОС, сопоставимого с таковым при остром воспалении.

При внесении блокатора SH-групп в среду инкубации нейтрофилов, находящихся в условиях ОС *in vitro* или полученных у больных внебольничной пневмонией, содержание GSH было ниже соответственно в 1,9 и 1,5 раза по сравнению с аналогичным параметром в клетках, инкубированных без добавления N-этилмалеимида ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Параллельно в нейтрофильных лейкоцитах как при внебольничной пневмонии, так и в случае экспериментального ОС выявлялось снижение количества белок-SH и величины отношения GSH/GSSG на фоне возрастания содержания белок-SSG. Вероятно, при активном окислении SH-групп восстановительный потенциал GSH в первую очередь расходовался для защиты функциональных групп белков, образуя дисульфиды белок-SSG, способные к обратимой регенерации.

При блокаде свободных SH-групп с помощью N-этилмалеимида в нейтрофилах с индуцированным ОС содержание карбонильных производных белков имело лишь тенденцию к повышению, а в нейтрофилах, полученных у пациентов с внеболь-

ничной пневмонией, этот показатель в 1,2 раза превышал соответствующие значения в клетках, инкубированных без действия блокатора ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). При сравнении ситуации ОС *in vitro* (воздействие 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на нейтрофилы здоровых лиц) и острого воспаления (нейтрофилы, стимулированные в условиях внебольничной пневмонии) показатели карбонилирования белка в клетках, находящихся под влиянием N-этилмалеимида, были сопоставимы ( $p > 0,05$ ).

Присутствие протектора SH-групп в культуре нейтрофилов, инкубированных с пероксидом водорода, приводило к снижению содержания продуктов карбонилирования белков в 2,5 раза по сравнению с показателем в клетках без 1,4-дитиоэритритола ( $p < 0,05$ ). Более того, под влиянием 1,4-дитиоэритритола изучаемый показатель достигал величин, не отличавшихся от таковых в интактной культуре нейтрофилов здоровых доноров (табл. 1). У больных внебольничной пневмонией содержание карбонильных производных белков в нейтрофилах в присутствии 1,4-дитиоэритритола было лишь в 1,5 раза ниже ( $p < 0,05$ ) их уровня в интактных клетках пациентов, оставаясь в 1,6 раза выше ( $p < 0,05$ ) значений, зафиксированных в интактных нейтрофилах здоровых доноров. Следова-

Таблица 2

Влияние ингибитора каталазы аминотриазола и блокатора синтеза глутатиона бутионинсульфоксимином на состояние тиолдисульфидной системы и окислительную модификацию белков нейтрофилов крови в условиях окислительного стресса *in vitro* и у пациентов с внебольничной пневмонией (Me ( $Q_1$ – $Q_3$ ))

| Группы обследованных                |   | GSH,<br>нмоль/мг<br>белка | GSSG,<br>нмоль/мг<br>белка | Белок-SH,<br>нмоль/мг<br>белка | Белок-SSG,<br>нмоль/мг<br>белка | Карбонильные<br>производные<br>белков, пг/мг<br>белка |
|-------------------------------------|---|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| Здоровые доноры                     | Интактные нейтрофилы (контроль)   | 4,84<br>(4,64–5,39)       | 0,27<br>(0,25–0,31)        | 3,15<br>(2,83–3,39)            | 0,05<br>(0,03–0,08)             | 2,85<br>(2,01–3,29)                                   |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                          | 1,97<br>(1,45–2,40)*      | 0,55<br>(0,51–0,59)*       | 2,45<br>(2,28–2,85)*           | 0,32<br>(0,11–0,62)*            | 7,13<br>(6,82–8,30)*                                  |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и аминотриазолом         | 1,23<br>(1,08–1,63)*. ^   | 0,59<br>(0,56–0,72)*       | 2,08<br>(1,87–2,15)*. ^        | 0,30<br>(0,28–0,35)*            | 8,30<br>(5,08–11,30)*. ^                              |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и бутионинсульфоксимином | 1,15<br>(1,01–1,16)*. ^   | 0,37<br>(0,35–0,47)*. ^    | 0,29<br>(0,28–0,33)*. ^        | 0,38<br>(0,37–0,39)*            | 9,18<br>(8,12–10,18)*. ^                              |
| Пациенты с внебольничной пневмонией | Интактные нейтрофилы  | 1,62<br>(1,23–1,92)*      | 0,47<br>(0,37–0,66)*       | 1,69<br>(1,50–1,93)*. ^        | 0,58<br>(0,47–0,70)*. ^         | 6,68<br>(5,73–7,94)*                                  |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с аминотриазолом   | 1,33<br>(1,09–1,71)*. **  | 0,58<br>(0,51–0,69)*       | 1,58<br>(1,50–1,83)*           | 0,63<br>(0,61–0,81)*            | 8,22<br>(7,67–8,73)*. **                              |
|                                     | Нейтрофилы, инкубированные с бутионинсульфоксимином                                 | 0,85<br>(0,81–0,96)*. **  | 0,66<br>(0,57–0,76)*. **   | 0,28<br>(0,25–0,34)*. **       | 0,65<br>(0,61–0,70)*            | 8,49<br>(7,78–9,02)*. **                              |

тельно, поддержание SH-групп в восстановленном состоянии с помощью 1,4-дитиоэритрита оказывало более выраженное протекторное влияние на процессы окислительной модификации белков нейтрофилов при экспериментальном ОС, чем при внебольничной пневмонии.

С целью ингибирования синтеза глутатиона *de novo* в условиях ОС *in vitro* и при внебольничной пневмонии на культуру нейтрофилов воздействовали блокатором  $\gamma$ -глутамил-цистеинсинтетазы — бутионинсульфоксимином (табл. 2). В обоих случаях прекращение синтеза новых молекул глутатиона способствовало значимому снижению в клетках содержания GSH, белок-SH, интегрального показателя GSH/GSSG. Однако количество белок-SSG при этом достоверно не отличалось от соответствующего параметра в нейтрофилах, инкубированных с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а также в интактных нейтрофилах, полученных у больных внебольничной пневмонией ( $p > 0,05$ ). Это указывало на уменьшение редокс-потенциала тиолдисульфидной системы в нейтрофилах под действием бутионинсульфоксимином и нарушение образования дисульфидных связей белок-SSG, которые предохраняют SH-группы белков от необратимого окисления в условиях ОС.

При ОС *in vitro* и при внебольничной пневмонии блокирование синтеза глутатиона в нейтрофилах также приводило к повышению содержания нерес-

парируемых карбонильных производных белков относительно соответствующих значений в клетках, не испытывающих влияния бутионинсульфоксимином ( $p < 0,05$ ). Недостаток синтеза GSH, выступающего ингибитором активных форм кислорода, значительно повышает их цитотоксическое и деструктивное действие, особенно выраженное при ОС [1, 3]. При этом в нейтрофилах у больных внебольничной пневмонией отмечалось наличие отрицательной корреляционной связи между содержанием GSH и карбонильных производных белков ( $r = -0,71$ ,  $p < 0,05$ ), а также между концентрацией SH-групп и карбонильных производных белков ( $r = -0,57$ ,  $p < 0,05$ ). В условиях ОС *in vitro* выявлена тесная корреляция между величиной соотношения GSH/GSSG и уровнем карбонильных производных белков в нейтрофилах ( $r = -0,88$ ,  $p < 0,05$ ). Необходимо учесть, что часть GSH обычно расходуется в качестве субстрата глутатионпероксидаз и глутатионтрансфераз, которым принадлежит ведущая роль в защите от окислительных повреждений липидных компонентов мембран и нуклеиновых кислот [1].

При добавлении ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола в среду инкубации нейтрофилов, находящихся в условиях экспериментального ОС или взятых у больных внебольничной пневмонией, содержание GSH было ниже аналогичных величин в клетках, не испытывающих влияния аминотриазола

( $p < 0,05$ ) (табл. 2). В обоих случаях ингибирование каталазы повышало содержание карбонильных производных белков в нейтрофилах ( $p < 0,05$ ), а при ОС *in vitro* также сопровождалось снижением количества белок-SH ( $p < 0,05$ ). Низкая активность каталазы в клетках способствует возрастанию стационарной концентрации пероксида водорода, а это увеличивает вероятность окислительной модификации белков. Немажово, что ингибирование каталазы часто сопровождается снижением активности ряда ферментов, чувствительных к окислению, в частности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, которая участвует в поддержании пула восстановительных эквивалентов, необходимых для функционирования глутатионредуктазы и защиты клеток при окислительном стрессе [1].

#### Заключение

Окислительный стресс при внебольничной пневмонии и индуцированный 200 мкМ пероксидом водорода сопровождается снижением содержания восстановленного глутатиона, тиоловых групп белков и возрастанием концентрации окисленной формы глутатиона и белково-связанного глутатиона, активацией окислительной модификации белков в нейтрофилах крови.

Ингибирование каталазы аминотриазолом или синтеза глутатиона бутионинсульфоксимином в нейтрофильных лейкоцитах крови при экспериментальном окислительном стрессе и внебольничной пневмонии приводит к нарушению образования белково-связанного глутатиона и к активации окислительной модификации белков.

В условиях действия 1,4-дитиозэритрита показан протекторный эффект глутатиона в отношении окислительной модификации белков в нейтрофилах крови у больных внебольничной пневмонией и при окислительном стрессе *in vitro*.

#### Благодарности

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК № 02.740.11.0311), РФФИ 2009–2010 гг. (грант 09-04-99026-р\_офи).

#### Список литературы

1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. М.: Наука, 2001. 343 с.
2. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshchikova E.B. Oxidative stress: biochemical and pathophysiological aspects. M.: Nauka, 2001. 343 p.
3. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. 72. (2). 158–174.
4. Oktiabr'sky O.N., Smirnova G.V. Cell function redox-regulation // Biochemistry. 2007. 72. (2). 158–174.
5. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь

и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб., 2006. 400 с.

Dubinina E.E. Oxygen metabolism products in functional activity of cells (life and death, creation and destruction). SPb, 2006. 400 p.

4. Stadtman E.R., Levine R.L. Protein oxidation // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000. 899. 191–208.

5. Pietarinen-Runtti P., Lakari E., Raivio K.O., Kinula V.L. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells // J. Physiol. Cell Physiol. 2000. 278. (1). 118–125.

6. Grune T., Reinheckel T., Joshi M. et al. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome // Am. Soc. Biochem. Mol. Biol. 1995. 270. (5). 2344–2351.

7. Brumell J.H., Burkhardt A.L., Bolen J.B. et al. Endogenous reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils // J. Biol. Chem. 1996. 271. (3). 1455–1461.

8. Sahaf B., Heydari K., Herzenberg L.A. Lymphocyte surface thiol levels // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. 100. (7). 4001–4005.

9. Laragione T., Bonetto V., Casoni F. et al. Redox regulation of surface protein thiols: Identification of integrin-4 as a molecular target by using redox proteomics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. 100. (25). 14737–14741.

10. Spolarics Z., Wu J.-X. Role of glutathione and catalase in  $H_2O_2$  detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells // J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1997. 273. 1304–1311.

11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб., 2000. 103 с.

Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. Methods of free radical oxidation and antioxidative protection of organism. SPb., 2000. 103 p.

12. Kojima S., Nadayama K.H., Ishida H. Low dose j-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth // J. Radiat. Res. 2004. 45. 33–39.

13. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B. et al. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes // J. Cell Biol. 1978. 76. (2). 439–447.

14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. 7. (1, 2). 248–254.

15. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. 2007. 72. (8). 995–1017.

Lushchayak V.I. Protein free radical oxidation and its connection with organism functional state // Biochemistry. 2007. 72. (8). 995–1017.

## THIOLDISULPHIDE SYSTEM PARTICIPATION IN PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION REGULATION IN NEUTROPHILS DURING OXIDATIVE STRESS

Elena Alekseevna STEPOVAYA<sup>1</sup>, Tat'yana Vasil'evna ZHAVORONOK<sup>1</sup>, Galina Viktorovna PETINA<sup>1</sup>, Natal'ya Vladimirovna RYAZANTSEVA<sup>1</sup>, Vladimir Vladimirovich IVANOV<sup>1</sup>, Fedor Fedorovich TETENEV<sup>1</sup>, Tat'yana Sergeevna AGEeva<sup>2</sup>, Vyacheslav Viktorovich NOVITSKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian State Medical University  
634050, Tomsk, Moskovskii tract, 2

<sup>2</sup>Tomsk Military Medical Institute  
634041, Tomsk, Kirov av., 49

---

There was studied the thioldisulphide system role in realization of protein protection mechanisms against oxidative modification in blood neutrophils during oxidative stress in vitro and developing at acute inflammation. It has been shown that when SH-groups protector 1,4-dithioerythritol works in blood neutrophil leucocytes of patients with the community-acquired pneumonia and during experimental oxidative stress the decrease of protein ketonic derivatives occurs. Under cultivating cells with catalase inhibitor or glutathione synthesis inhibitor, it has been revealed that reduced glutathione deficit and protein-bound glutathione formation disturbance in neutrophils in patients with community-acquired pneumonia and at the experimental oxidative stress results in the activation of protein oxidative modification.

---

**Key words:** neutrophils, thioldisulphide system, oxidative stress, protein oxidative modification.

*Stepovaya Ye.A.* — doctor of medical sciences, professor of the chair for biochemistry and molecular biology, e-mail: muir@mail.ru

*Zhavoronok T.V.* — candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for biochemistry and molecular biology, e-mail: tavaza@ngs.ru

*Petina G.V.* — graduate student of the chair for biochemistry and molecular biology, e-mail: galap1@rambler.ru

*Ryazantseva N.V.* — doctor of medical sciences, professor, head of the chair for fundamental basis of clinical medicine, e-mail: ryazan@mail.tomsknet.ru

*Ivanov V.V.* — candidate of biological sciences, assistant professor of the chair for biochemistry and molecular biology, e-mail: biochemistry@ssmu.net.ru

*Tetenev F.F.* — doctor of medical sciences, professor, head of the chair for propaedeutics of internal diseases, e-mail: ftetenev@list.ru

*Ageeva T.S.* — candidate of medical sciences, assistant professor, head of the chair for therapy and physician advanced training, e-mail: ts.ageeva@mail.ru

*Novitsky V.V.* — head of the chair for pathological physiology, academician of RAMS, e-mail: office@ssmu.tomsk.ru