

УДК 57.013

*И.П. Загоруля, В.Е. Высокогорский***СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ И МОЛОКА**

Определены показатели окислительной модификации белков сыворотки крови крупного рогатого скота, сыворотки молока и цельного молока. Для оценки уровня карбонильных производных белков использовали метод, основанный на реакции взаимодействия карбонильных производных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином. При исследовании спектра продуктов спонтанной окислительной модификации белков от 250нм до 550нм выявлено образование пиков при одинаковых длинах волн как при определении карбонильных производных сыворотки крови, так и сыворотки молока и цельного молока. Установлено, что содержание продуктов карбонильных производных белков сыворотки молока меньше, чем в сыворотке крови при длине волны 370нм – на 24 %, при длине волны 530нм – на 65 %. При сравнении спонтанной окислительной модификации белков молока с карбонильными производными белков сыворотки крови установлено, что содержание карбонильных производных белков молока не превышает содержание карбонильных производных белков сыворотки крови. Установлено пониженное содержание карбонильных производных продуктов металлокатализированной окислительной модификации белков сыворотки молока в сравнении с белками сыворотки крови только при длине волны 530 нм. При остальных исследуемых длинах волн значимых отличий не выявлено. Данные о содержании продуктов окислительной деструкции белков сыворотки крови, сыворотки молока и цельного молока свидетельствуют о степени воздействия на структуру и свойства белков и подтверждают значимость определения этих показателей. Неинвазивный способ определения карбонильных производных белков молока может служить маркером окислительного стресса в ветеринарной медицине.

Ключевые слова: окислительная деструкция белков, карбонильные производные белков, сыворотка крови, молоко, сыворотка молока.

Наиболее распространёнными маркерами окислительного стресса считались продукты перекисидации липидов, однако продукты перекисидации липидов разрушаются в течение нескольких минут, а продукты окисленной модификации белков имеют период полураспада более суток даже при комнатной температуре [1]. Эти особенности белков, чувствительных к действию свободных радикалов и широко распространенных в клетке структур, позволяют рассматривать их как ранние и надёжные маркёры окислительного стресса [2]. При воздействии свободных радикалов по всей длине полипептидной цепи нарушается конформация белков, происходит агрегация и фрагментация белковой молекулы [1]. Так как белки выполняют специфические биологические функции, то можно выявлять не только образование продуктов окислительных повреждений, но и изменение их функций [3]. Определению подлежат продукты окисления белков, образующиеся как спонтанно, так и индуцируемо ионами железа [4]. Большинство исследований карбонильных производных белков связано с оценкой окислительной модификации белков в плазме, клетках крови и тканях при различных патологических состояниях: заболеваниях сердечно-сосудистой системы [5], нейродегенеративных болезнях [6-8], сахарном диабете [9; 10], заболеваниях органов дыхания [11] как у человека, так и при заболеваниях крупного рогатого скота [12; 13].

Если показатели окислительной модификации белков сыворотки крови являются признанным маркером окислительного стресса, то возможность использования карбонильных производных белков сыворотки молока и цельного молока, как неинвазивных маркеров свободно радикального окисления крупного рогатого скота, требует уточнения и детального изучения.

Цель работы: сравнение содержания карбонильных производных белков сыворотки крови и молока крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований

В работе исследовали сыворотку крови коров, сыворотку молока и молоко пастеризованное. Сыворотка молока получена после доведения молока до pH 4,6 с использованием лимонной кислоты с последующим центрифугированием в течение 15 мин. Сыворотка крови получена после термостабилизации и центрифугирования в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для оценки окислительной мо-

дификации белков использовали метод Reznick A.Z. & Parker L. в модификации Е.Е. Дубининой [14]. Метод определения продуктов карбонильных производных белков основан на том, что конечные продукты свободнорадикального окисления белков могут количественно реагировать с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов.

В работе для оценки показателей уровня карбонильных производных белков использовали метод, основанный на реакции взаимодействия карбонильных производных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином [14]. Содержание продуктов спонтанной и металл-катализируемой окислительной деструкции белков в спектре длин волн от 274 нм до 550 нм определяли с интервалом

1 нм. Статистическая обработка данных проведена с использованием программы STATISTICA 6. При проверке нулевых гипотез критический уровень значимости был принят $p=0,05$.

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования спонтанной окислительной модификации белков сыворотки крови коров установлены максимальные значения содержания карбонильных производных при длинах волн 274 нм, 356 нм, 370 нм, 430 нм, 530 нм (рис. 1), причём максимальное содержание установлено при длине волны 370 нм, а минимальный – при длине волны 430 нм. При исследовании продуктов спонтанной окислительной модификации белков сыворотки молока крупного рогатого скота также установлены пять пиков при тех же длинах волн, однако максимальное значение зафиксировано при длине волны 274 нм, минимальное при 530 нм. Аналогичные пики установлены и при исследовании карбонильных производных белков цельного молока, но максимальное значение обнаружено при длине волны 356 нм, а минимальное – при 530 нм.

Таким образом, в результате исследования продуктов спонтанной окислительной модификации белков в спектре от 250 нм до 550 нм, выявлено образование пиков при одинаковых длинах волн как при определении карбонильных производных сыворотки крови, так и сыворотки молока и цельного молока (рис. 1).

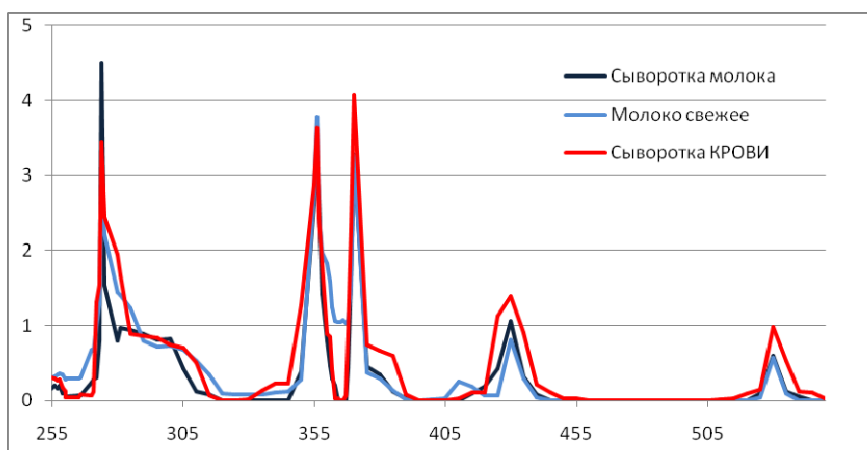


Рис. 1. Спектр карбонильных производных белков при спонтанной окислительной модификации

Аналогичные пиковые значения выявлены и при определении продуктов металл катализируемой окислительной модификации белков в спектре от 250 нм до 550 нм, установлены пики при тех же длинах волн – 274 нм, 356 нм, 370 нм, 430 нм, 530 нм во всех исследуемых продуктах (рис. 2).

Выявленные пиковые значения показателей карбонильных производных белков соответствуют показателям сыворотки крови, охарактеризованной в работах ранее, при которых определены продукты спонтанной и металл-катализируемой окислительной деструкции белков: альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера, кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера, альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера, кетон-динитрофенилгидразонов основного характера при – 274 нм, 356 нм., 370 нм., 430 нм., 530 нм., соответственно [3; 8; 14].

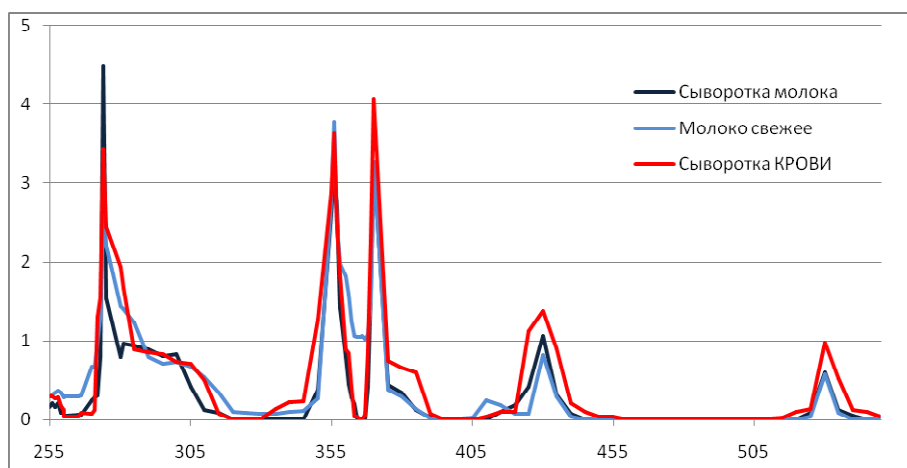


Рис. 2. Спектр карбонильных производных белков при металл катализированной окислительной модификации

При сравнении содержания продуктов спонтанной окислительной модификации белков сыворотки крови и сыворотки молока выявлено, что содержание продуктов карбонильных производных белков сыворотки молока меньше, чем в сыворотке крови при длине волны 370 нм на 24 %, при длине волны 530 нм на 65 %. Однако при длине волны 274 нм при исследовании показателей спонтанной окислительной деструкции белков сыворотки молока установлено, что содержание карбонильных производных больше, чем в сыворотке крови на 30 %. В исследовании сыворотки молока, в отличие от сыворотки крови, выявлено максимальное значение показателей карбонильных производных белков при длине волны 274 нм, минимальное аналогично сыворотке крови при 530 нм (табл. 1).

Таблица 1

Содержание продуктов спонтанной окислительной модификации белков (е.о.п/мл)

Биологический материал	Длина волны				
	274	356	370	430	530
Сыворотка крови	3,44 ± 0,12	3,63 ± 0,18	4,07 ± 0,14	1,38 ± 0,07	0,97 ± 0,037
Сыворотка молока	4,48 ± 0,08	3,10 ± 0,11	3,27 ± 0,19	1,06 ± 0,05	0,59 ± 0,03
p	0,005	0,26	0,045	0,062	0,0024
Молоко	2,59 ± 0,03	3,78 ± 0,13	3,27 ± 0,06	0,81 ± 0,01	0,58 ± 0,03
p	0,0003	0,66	0,001	0,0025	0,0034

В отличие от сыворотки молока, при сравнении спонтанной окислительной модификации белков молока с карбонильными производными белков сыворотки крови установлено, что содержание карбонильных производных белков молока не превышает содержание карбонильных производных белков сыворотки крови. Содержание продуктов спонтанной окислительной модификации белков молока меньше, чем продуктов спонтанной окислительной модификации белков сыворотки крови при длинах волн 274 нм, 370 нм, 430 нм, 530 нм на 33 %, 24 %, 70 %, 64 %, соответственно. Не выявлено значимых отличий при длине волны 356 нм при сравнении содержания карбонильных производных белков как сыворотки молока и сыворотки крови, так и молока и сыворотки крови.

Таким образом, можно сделать вывод, что использование данного метода применимо не только для определения карбонильных производных белков сыворотки крови, но и для изучения белков сыворотки молока и цельного молока.

В ходе исследования продуктов металл катализированной окислительной деструкции белков сыворотки крови выявлено, что максимальное содержание карбонильных производных белков установлено при длине волны 274 нм, минимальное – при 530 нм (табл. 2).

При исследовании продуктов металл катализированной окислительной модификации установлено пониженное содержание карбонильных производных белков сыворотки молока, в сравнении с белками сыворотки крови только при длине волны 530 нм. При остальных исследуемых длинах волн

значимых отличий не выявлено. Полученные результаты могут быть обусловлены аналогичными механизмами Fe^{2+} катализируемого окисления белков сыворотки крови и сыворотки молока и требуют дальнейшего исследования. Установлено, что содержание металл катализируемых карбонильных производных белков цельного молока меньше, чем содержание продуктов окислительной деструкции белков сыворотки крови при 274нм, 430нм, 530 нм на 31 %, 52 %, 36 %, соответственно.

Таблица 2

Содержание продуктов металл катализированной окислительной модификации карбонильных производных белков (е.о.п./мл)

Биологический материал	Длина волны				
	274	356	370	430	530
Сыворотка крови	5,63±0,053	5,39±0,017	4,59±0,16	2,76±0,17	1,71±0,026
Сыворотка молока	5,23±0,20	5,54±0,21	4,55±0,17	2,52±0,15	1,34±0,084
p	0,34	0,71	0,94	0,29	0,05
Молоко	4,31 ±0,06	5,42±0,086	4,37±0,31	1,82±0,065	1,26±0,013
p	0,0001	0,87	0,29	0,002	0,0001

Заключение

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что использование метода определения продуктов окислительной модификации белков позволяет определять уровень карбонильных производных белков, как сыворотки крови, так и сыворотки молока и цельного молока. Обнаруженные различия свидетельствуют о разной степени протекания процессов свободнорадикального окисления в белках сыворотки крови и белках молока, что может быть связано с разным составом белков и различием в антиокислительной активности исследуемого биологического материала. Использование неинвазивного метода определения карбонильных производных белков молока и сыворотки молока может служить дополнительным маркёром окислительного стресса в ветеринарной медицине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина [и др.] // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 413-421.
2. Berliner J.A., Heinecke J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 20, N. 5. P. 707-727.
3. Biomarkers of protein oxidation in human disease / A. Garcia-Garcia [et al.] // CurrMol Med. 2012. Vol. 12, N 6. P. 681-697.
4. Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма. Воронеж: ГНУ ВНИВИПФиТ, 2010. 70 с.
5. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация очищенных белков и белков плазмы крови у пожилых людей с сосудистой деменцией // Тез. докл. междунар. конф. «Свободно-радикальные процессы: экологические, фармакологические и клинические аспекты». Цитология. 1999. Т. 41, № 9. С. 785.
6. Козина О.В., Огородова Л.М. Образование и биологическая роль NO при аллергическом воспалении // Бюл. Сиб. медицины. 2009. № 3. С. 95-105.
7. LDL oxidative modification and carotid atherosclerosis: results of a multicenter study / K. Nyssönen [et al.] // Atherosclerosis. 2012. Vol. 225, № 1. P. 231- 236.
8. Oxidative modification of blood serum proteins in multiple sclerosis after interferon or mitoxantrone treatment / I. Sadowska-Bartosz [et al.] // J. of Neuroimmunology. 2014. Vol. 266, Is. 1-2. P. 67-74.
9. Влияние аллоксана на систему глутатиона и окислительную модификацию белков в адипоцитах при экспериментальном диабете / В.В. Иванов [и др.] // Бюл. Сиб. медицины. 2011. № 3. С. 44-47.
10. Занозина О.В. Возможности коррекции окислительного стресса у больных сахарным диабетом с помощью дибикора // Фарматека. 2010. № 16. С. 51-54.
11. Изменение содержания продуктов окислительной модификации белков и липидов в опухолевой ткани на разных стадиях рака легкого / Р.Н. Белоногов [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. Т. 147, № 5. С. 562-563.
12. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Метод её определения // Вопр. мед. химии. 1995. Т. 41, № 1. С. 24-26.

13. Высокогорский В.Е., Погорелова Н.А., Стрельчик Н.В. Сравнительная характеристика перекисидации липидов и окислительной модификации белков плазмы крови при послеродовом эндометрите у коров // Вестн. АПК Ставрополя. 2015. № 1 (17). С. 88-93.
14. Высокогорский В.Е., Воронова Т.Д., Погорелова Н.А. Перекисидация липидов и окислительная модификация белков молока и крови коров, больных послеродовым эндометритом // Фундаментальные исследования. 2014. № 3. С. 81.
15. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях // Биомед. химия. 2007. Т. 53, № 4. С. 351-372.

Поступила в редакцию 07.07.17

I.P. Zagorulya, V.E. Vysokogorskiy

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF CARBONYL DERIVATIVES OF BLOOD SERUM AND MILK PROTEINS

Parameters of oxidative modification of proteins of cattle blood serum, milk whey and whole milk were determined. To assess the level of protein carbonyl derivatives, a method based on the reaction of carbonyl derivatives of amino acid residues with 2,4-dinitrophenylhydrazine was used. When studying the spectrum of products of spontaneous oxidative modification of proteins from 250 nm to 550 nm, the formation of peaks at the same wavelengths was revealed as determining carbonyl derivatives in the serum, milk whey and whole milk. It was established that the content of the products of carbonyl derivatives of proteins of milk whey less than in the serum at a wavelength of 370 nm – 24 %, at a wavelength of 530nm by 65 %. When comparing spontaneous oxidative modification of milk proteins with protein carbonyl derivatives in the serum, it was found that the content of protein carbonyl derivatives in milk does not exceed the content of protein carbonyl derivatives in the serum. Low content of carbonyl derivatives of metaloxidative modification of milk whey proteins, in comparison with the serum proteins, was registered only at a wavelength of 530nm. Significant differences at other studied wavelengths were not revealed. Data on the content of oxidative degradation products of blood serum proteins, whey and whole milk proteins indicate the degree of impact on the structure and properties of proteins and proves the significance of calculation of these indicators. Non-invasive method for the determination of carbonyl derivatives of proteins in milk can serve as a marker of oxidative stress in veterinary medicine.

Keywords: oxidative degradation of proteins, carbonyl derivatives of proteins, blood serum, milk, milk whey.

REFERENCE

1. [Oxidative modification of proteins: oxidation of tryptophan and bityrosine formation in purified proteins using Fenton's system] / E. E. Dubinina [et al.], in *Biohimija*, 2002, vol. 67, pp. 413-421 (in Russ.).
2. Berliner J.A. and Heinecke J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis, in *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, vol. 20, no 5, pp. 707-727.
3. Biomarkers of protein oxidation in human disease / Garcia-Garcia A. [et al.], in *CurrMol Med.*, 2012, vol. 12, no 6, pp. 681-697.
4. *Metodicheskie polozhenija po izucheniju processov svobodnoradikal'nogo okislenija i sistemy antioksidantnoj zaschity organizma* [Methodical provisions on the study of processes of free radical oxidation and the system of antioxidant defense of the organism], Voronezh: GNU VNIVIPFiT, 2010, 70 p. (in Russ.).
5. Dubinina E.E. [Oxidative modification of purified proteins and the proteins of blood plasma in elderly people with vascular dementia], in *Tez. dokl. mezhdunar. konf. "Svobodno-radikal'nye processy: ekolog-cheskie, farmakologicheskie i klinicheskie aspekty"*, *Citologija*, 1999, vol. 41, no 9, p. 785 (in Russ.).
6. Kozina O.V. and Ogorodova L.M. [Formation and biological role of NO in allergic inflammation], in *Bjul. Sib. mediciny*, 2009, no 3, pp. 95-105 (in Russ.).
7. LDL oxidative modification and carotid atherosclerosis: results of a multicenter study / Nyysönen K. [et al.], in *Atherosclerosis*, 2012, vol. 225, no 1, pp. 231-236.
8. Oxidative modification of blood serum proteins in multiple MS after interferon or mitoxantrone treatment / Sadowska-Bartosz I. [et al.], in *J. of Neuroimmunology*, 2014, vol. 266, iss.1-2, pp. 67-74.
9. [The effect of alloxan on the glutathione system and oxidative modification of proteins in adipocytes in experimental diabetes] / V.V. Ivanov [et al.], in *Bjul. Sib. mediciny*, 2011, no 3, pp. 44-47 (in Russ.).
10. Zanozin O.V. [Correction of oxidative stress in diabetic patients with dibicor], in *Farmateka*, 2010, no16, pp. 51-54 (in Russ.).
11. [The change in the content of products of oxidizing modification of proteins and lipids in tumor tissue in different stages of lung cancer] / Belonogov R.N. [et al.], in *Bjull. eksperim. biologii i mediciny*, 2009, vol. 147, no 5, pp. 562-563 (in Russ.).
12. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A. and Porotov I.G [Oxidative modification of proteins of human serum. The method of its determination], in *Voprosy med. himii*, 1995, vol. 41, no 1, pp. 24-26 (in Russ.).

13. Vysokogorsky V.E., Pogorelov N.A. and Strelchik N.V [Comparative characteristics of lipid peroxidation and oxidative modification of plasma proteins during the postpartum endometritis in cows], in *Vestn. APK Stavropol'ja*, 2015, no 1 (17), pp. 88-93 (in Russ.).
14. Vysokogorsky V.E., Voronova T.D. and Pogorelova N.A. [Peroxidation of lipids and oxidative modification of proteins in milk and blood of cows, patients with postpartum endometritis], in *Fundamental'nye issledovanija*, 2014, no 3, p. 81 (in Russ.).
15. Dubinina E.E. and Pustygin V.A. [Free radical processes in aging, neurodegenerative diseases and other pathological conditions], in *Biomed. himija*, 2007, vol. 53, no 4, pp. 351-372 (in Russ.).

Загоруля Иван Павлович,
аспирант кафедры продуктов питания
и пищевой биотехнологии
E-mail: dionizag@mail.ru

Высокогорский Валерий Евгеньевич,
доктор медицинских наук, профессор кафедры
продуктов питания и пищевой биотехнологии
E-mail: vve-bio@mail.ru

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный
университет имени П.А. Столыпина»
644008, Россия, г. Омск, Институтская площадь, 1

Zagorulya I.P.,
postgraduate student at Department of food products
and food biotechnology
E-mail: dionizag@mail.ru

Vysokogorskiy V.E.,
Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor
at Department of Food and Food Biotechnology
E-mail: vve-bio@mail.ru

Omsk State Agrarian University
1, Institutskaya square, Omsk, Russia, 644008