Клінічна фізіологія та біохімія

УДК 577.121:963

С.В. КОНОШЕНКО[1], Н.М. ЙОЛКІНА[2]
[1] *Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, м. Симферополь*
[2] *Кримський факультет Запорізького національного університету, м. Симферополь*

Особливості окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах хворих на кардіоміопатію, ішемічну хворобу серця, еритремію та апластичну анемію

Порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за умов патології призводить до активізації вільнорадикальних реакцій і, як наслідок, посиленого генерування активних форм кисню (АФК), що супроводжуються окиснювальною деструкцією протеїнів, нуклеїнових кислот і ліпідів, розвитком окиснювального стресу [1, 5, 6, 8, 10, 11].

Сьогодні все більше уваги приділяють вивченню ролі окиснювальної модифікації протеїнів (спонтанної та металокаталізуючої) у розвитку вільнорадикальних процесів, які пов'язані з різними захворюваннями організму людини [3, 4, 7].

Протеїни завдяки особливостям своєї будови активно взаємодіють з різними реакційними сполуками, серед яких особливе місце посідають АФК як радикальної, так і нерадикальної природи ($O^{\bullet}_2$, $^{\bullet}OH$, H_2O_2 та ін.) [3, 4, 12].

Оскільки еритроцити, циркулюючи в руслі крові, є однією з мішеней дії АФК, доцільно вивчити процеси окиснювальної модифікації еритроцитарних протеїнів за умов патології, зокрема, при серцево-судинних захворюваннях і захворюваннях гематологічного характеру.

Мета нашої роботи – дослідити окиснювальну модифікацію протеїнів у гемолізатах еритроцитів хворих на дилатаційну кардіоміопатію, ішемічну хворобу серця (ІХС), еритремію та апластичну анемію.

Матеріали та методи дослідження. Матеріалом для досліджень слугували еритроцити практично здорових людей (25 донорів станції переливання крові) і хворих на ІХС II і III функціональних класів (25 осіб), дилатаційну кардіоміопатію (20 осіб) віком від 47,5 до 52,7 року, а також хворих на еритремію I ступеня (9 осіб, середній вік 60 років) і апластичну анемію (11 осіб, середній вік 56 років). У кожній групі хворих співвідношення чоловіків і жінок було приблизно однаковим. Захворювання на ІХС тривало в середньому 4,7 року; хворих на дилатаційну кардіоміопатію – 3,8; еритремію – 2,5; на апластичну анемію – 1,5 року.

Критерієм для вилучення з досліджень були тяжка артеріальна гіпертензія, декомпенсація легенево-серцевої недостатності, наявність тяжких форм аритмій. Кров хворих брали при їх надходженні до стаціонару, перед початком лікування.

Гемоліз еритроцитів здійснювали за методом Драбкіна у рівному об'ємі дистильованої води [9]. Вміст продуктів окиснювальної модифікації протеїнів (ОМП) в гемолізатах еритроцитів визначали спектрофотометричним методом [2]. Гемолізати еритроцитів брали в об'ємі 0,1 мл.

© Коношенко С.В., Йолкіна Н.М., 2013

Протеїни гемолізатів денатурували 20% розчином трихлороцетової кислоти, відокремлювали центрифугуванням, додавали 0,1 М розчин 2,4-динітрофенілгідразину (2,4-ДФГ), який готували на 2 М HCl.

До контрольної проби замість розчину 2,4-ДФГ додавали 2 М HCl. Проби інкубували при температурі 22° протягом 1 год. Після інкубації проби цетрифугували при 8000 об./хв протягом 20 хв, осад промивали етанолом з етилацетатом (1:1), підсушували і розчиняли у 8 М розчині сечовини.

Альдегідні та кетонні динітрофенілгідразони нейтрального характеру реєстрували при 356 і 370 нм. Альдегідні і кетонні динітрофенілгідразони основного характеру – при 430 та 530 нм відповідно. Вміст продуктів ОМП виражали в одиницях оптичної густини на 1 мл гемолізату еритроцитів.

Результати досліджень та їх обговорення. Як свідчать результати досліджень, у гемолізатах еритроцитів практично здорових людей і хворих на кардіоміопатію, ІХС, еритремію та апластичну анемію виявлено наявність альдегідних і кетонних продуктів окиснювальної модифікації протеїнів основного та нейтрального характеру (див. таблицю).

Вміст продуктів окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах хворих на ІХС, кардіоміопатію, еритремію та апластичну анемію, од. опт. густ./мл гемолізату еритроцитів (*M*±*m*)

Обстежені групи	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
	356 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Контрольна	0,86±0,05	0,78±0,05	0,46±0,04	0,10±0,02
Хворі на ІХС	1,18±0,04*	1,17±0,04*	0,81±0,03*	0,17±0,02*
Хворі на кардіоміопатію	1,07±0,03*	1,03±0,04*	0,67±0,04*	0,15±0,02*
Хворі на еритремію	1,81±0,05*	1,59±0,05*	0,97±0,04*	0,39±0,02*
Хворі на апластичну анемію	1,72±0,05*	1,79±0,06*	1,14±0,04*	0,10±0,03

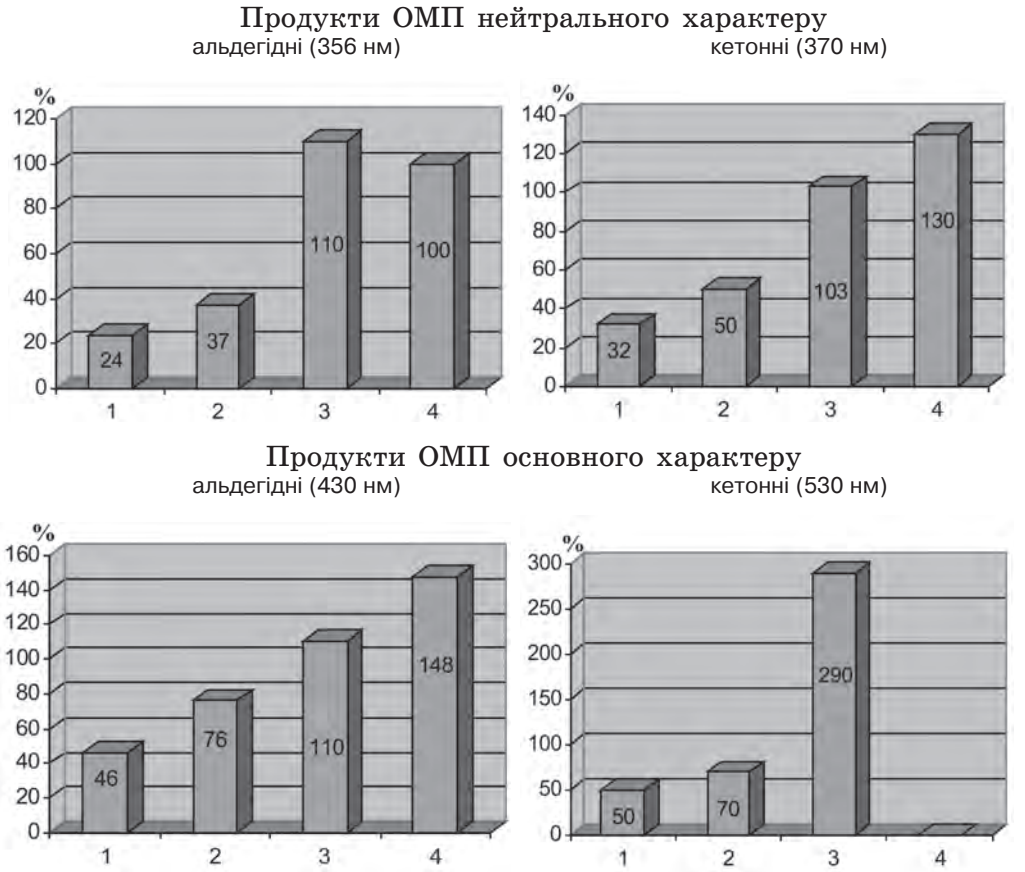
Примітка: * – вірогідність відміни показника порівняно із контрольною групою ($p<0,05$)

В усіх обстежених групах зазначено більш високий вміст в еритроцитах альдегідних і кетонних продуктів нейтрального характеру, найбільш низький вміст показано для продуктів ОМП основного характеру.

Водночас, незважаючи на загальні особливості вмісту в еритроцитах продуктів ОМП, спостерігаються відмінності, що зумовлені патологією і є залежними від виду захворювання. Наприклад, в еритроцитах хворих на дилатаційну кардіоміопатію вміст альдегідних і кетонних продуктів нейтрального характеру був на 24 і 32% вище порівняно з контрольною групою. Вміст альдегідних і кетонних продуктів основного характеру перевищував рівень контрольної групи на 46 і 50% (див. рисунок).

В еритроцитах хворих на ІХС порівняно з контрольною групою також простежується більш високий вміст продуктів ОМП. Вміст альдегідних і кетонних продуктів нейтрального характеру перевищував рівень контрольної групи на 37 і 50%, вміст продуктів основного характеру – на 76 і 70% відповідно. При ішемічній хворобі серця і кардіоміопатії зміни вмісту продуктів ОМП в еритроцитах мали односпрямований характер, але були більш вираженими при ІХС.

В еритроцитах хворих на еритремію вміст альдегідних і кетонних продуктів ОМП нейтрального характеру був на 100 і 103% вище порівняно з контрольною групою, вміст продуктів окиснювальної модифікації основного характеру перевищував рівень контрольної групи на 110 та 290%.



Оцінка змін вмісту продуктів окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах хворих на кардіоміопатію (*1*), ІХС (*2*), еритремію (*3*) та апластичну анемію (*4*) порівняно з контрольною групою донорів (нульова лінія).

В еритроцитах хворих на апластичну анемію порівняно з контрольною групою спостерігався вищий вміст альдегідних і кетонних продуктів нейтрального характеру (на 100 і 130%), вміст альдегідних продуктів основного характеру перевищував рівень контрольної групи на 148%. Проте вміст кетонних продуктів основного характеру практично не змінювався.

Слід зазначити, що найбільш виражені зміни вмісту продуктів ОМП в еритроцитах хворих простежуються при еритремії та апластичній анемії, захворюваннях онкологічного характеру, які пов'язані зі злоякісним переродженням кісткового мозку. Привертає увагу також той факт, що на відміну від ІХС та кардіоміопатії у хворих на еритремію і апластичну анемію зміни рівня продуктів ОМП в еритроцитах не мали певного закономірного характеру. Особливо це стосується рівня продуктів окиснювальної модифікації, що реєструються при 530 нм.

Водночас спостерігається загальна особливість: в усіх групах хворих найбільші зміни характерні для альдегідних і кетонних продуктів ОМП основного характеру.

Беручи до уваги результати наших досліджень, можна припустити, що процеси окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах за умов патології мають залежність від виду захворювання і певною мірою характеризують рівень залучення еритроцитів до патологічного процесу.

Значні відмінності вмісту ОМП в еритроцитах хворих на еритремію та апластичну анемію можуть свідчити про те, що при відповідних

гематологічних захворюваннях можуть відбуватися більш глибокі біохімічні зміни в популяціях еритроїдних клітин, можливо, ще на ранніх етапах їх формування, і такі зміни мають бути залежними від характеру патологічного процесу.

Висновки. В еритроцитах хворих на ІХС, дилатаційну кардіоміопатію, еритремію та апластичну анемію посилюється окиснювальна модифікація протеїнів. Більш значущими є зміни показників окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах хворих на еритремію і апластичну анемію. Процеси окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах за умов патології мають залежність від виду захворювання та певною мірою відображають рівень розвитку окиснювального стресу в організмі хворих.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Владимиров Ю.А.* Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии / Ю.А. Владимиров // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 1. – С. 5–7. 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 // Вопросы мед. химии. – 1995. Т. 41, вып. 1. – С. 24–26. 3. *Дубинина Е.Е.* Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина, С.В. Гавровская, Е.В. Кузьмич // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 3. – С. 413–421. 4. *Дубинина Е.Е.* Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5–18. 5. *Меньшиков Е.Б.* Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155–169. 6. *Меньшиков Е.Б.* Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с. 7. *Муравлёва Л.Е.* Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлёва, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Клюев и др. // Фундамент. исследования. – 2010, № 1. – С. 74–78. 8. *Сато Э.* Окислительный стресс вызывает регресс гемопоеза печени плода / Э. Сато, Э. Накагава, К. Хирамото, С. Ямамацу и др. // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 1. – С. 25–29. 9. *Drabkin D.* A simplified technique for large scale crystallization myoglobin an haemoglobin in the cristalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1949. – Vol. 21. – P. 224–226. 10. *Kaur K.* Lipid peroxidation and the level of antioxidant enzymes in coronary artery disease / K. Kaur // Indian J. of Clin. Biochem. – 2008. – Vol. 23, № 1. – P. 33–37. 11. *Ranjan R.* Oxidative stress in erythrocytes liver and kidneyes of X-ray exposed rabbits / R. Ranjan // Res. report Florida. – 2009. – Vol. 42, № 2. – P. 88–93. 12. *Rice-Evans C.* Oxigen toxicity free radicals and antioxidants in human disease: biochemical indication in atherosclerosis premature neonates / C. Rice-Evans, V. Gopinathan // Essays Biochem. – 1998. – Vol. 29. – P. 57–63.

Стаття надійшла до редколегії 24.04.13

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕИНОВ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ КАРДИОМИОПАТИЕЙ, ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА, ЭРИТРЕМИЕЙ И АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ

С.В. КОНОШЕНКО[1], *Н.М. ЁЛКИНА*[2]

[1] *Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского, г. Симферополь*

[2] *Крымский факультет Запорожского национального университета, г. Симферополь*

Установлено, что в эритроцитах больных дилатационной кардиомиопатией, ишемической болезнью сердца, эритремией и апластической анемией усиливается окислительная модификация протеинов. Процессы окислительной модификации протеинов в эритроцитах в условиях патологии имеют зависимость от вида заболевания. Более значительными являются изменения показателей окислительной модификации протеинов в эритроцитах больных эритремией и апластической анемией.

Ключевые слова: эритроциты, окислительная модификация протеинов, окислительный стресс, патология.

PECULIARITIES OF PROTEINS OXIDATIVE MODIFICATION IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH CARDIOMYOPATHIES, ISCHEMIC HEART DISEASE, ERYTHRAEMIA AND APLASTIC ANEMIA

S. KONOSHENKO, N. YOLKINA
Taurida National Vernadsky University, Simferopol
Crimean department of Zaporizhzhyi National University, Simferopol

Since red blood cells is one of the targets of oxygen active forms, it is reasonable to study the processes of oxidative modification of erythrocyte proteins under conditions of pathology, particularly cardiovascular diseases and diseases of hematological character.

The materials for the study were erythrocytes of healthy people and patients with ischemic heart disease II and III functional classes, dilated cardiomyopathy, erythraemia patients with grade I and aplastic anemia. In each group of patients male to female ratio was approximately the same. Duration of disease with ischemic heart disease (CHD) was an average of 4.7 years, patients with dilated cardiomyopathy – 3,8 years, with erythraemia – 2,5 years, with aplastic anemia – 1,5 years. The criterion for exclusion from the study were severe hypertension, pulmonary decompensation of heart failure, presence of severe arrhythmias. The blood samples of patients were taken at their admission to hospital, before treatment.

Hemolysis of erythrocytes was performed by the method of Drabkin. The content of the products of oxidative modification of proteins (OMP) was determined by spectrophotometric method at 356 nm, 370 nm, 430 nm and 530 nm.

It has been shown that in erythrocytes of healthy individuals and patients with cardiomyopathy, ischemic heart disease, aplastic anaemia and erythraemia revealed the presence of ketone and aldehyde products of oxidative modification of proteins basic and neutral character. All surveyed groups indicated a higher content in the erythrocytes aldehyde and ketone products of neutral character, the lowest content displayed for products OMP of base character.

However, despite the common features of content in erythrocytes OMP products, there are differences related to pathology, dependent on the type of the disease. It has been shown that in erythrocytes of patients with dilated cardiomyopathy the content of aldehyde and ketone neutral products was by 24 and 32 percent higher compared with the control group. The content of aldehyde and ketone products of base character exceeded the control group by 46 and 50 percent. In erythrocytes of the patients with ischemic heart disease the content of aldehyde and ketone neutral products exceeded the control group by 37 and 50 percent, the content of base products- by 76 and 70 percent, respectively. In erythrocytes of patients with erythraemia the content of neutral aldehyde and ketone products was 100 and 103 percent higher compared with the control group. The content of base OMP exceeded the control group by 110 and 290 percent. Erythrocytes of the patients with aplastic anemia showed a higher content of OMP also: by 100 and 130 percent for aldehyde and ketone products of neutral character and by 148 percent for aldehide products of base character.

It should be noted that the most pronounced changes in content of OMP products in erythrocytes of patients were traced at erythraemia and aplastic anemia, diseases of cancer character that are associated with malignant transformation of the bone marrow. However, there is a common feature: in all groups of patients more changes were shown for aldehyde and ketone products OMP of base character.

Taking into account the results of our study we suggest that the processes of oxidative modification of proteins in red blood cells under conditions of disease are dependent on the type of disease and to some extent characterize the involvement of red blood cells in the pathological process. More significant differences between OMP content in erythrocytes of the patients with aplastic anemia and erythraemia may indicate that the relevant hematological diseases can be more profound biochemical changes in populations of erythroid cells, perhaps even at the early stages of their formation, and such changes should be dependent on nature of the pathological process.

Key words: erythrocytes, oxidative modification of proteins, oxidative stress, pathology.