

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Ильичева А.С., Фомина М.А., Медведев Д.В., 2014
УДК 577.1+616-008

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ БЕЛКОВ МИОКАРДА НА ФОНЕ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

А.С. ИЛЬИЧЕВА, М.А. ФОМИНА, Д.В. МЕДВЕДЕВ

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
г. Рязань

CHARACTERISTIC PRODUCTS OF OXIDATIVE DAMAGE OF PROTEINS IN HEART MUSCLE WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA

A.S. ILICHEVA, M.A. FOMINA, D.V. MEDVEDEV

Ryazan State Medical University, Ryazan

Изучены продукты окислительного повреждения белков в миокарде при выраженной гипергомоцистеинемии. Обнаружено значительное нарастание содержания динитрофенилгидразонов в экспериментальной группе, преимущественно за счет альдегидных производных.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, динитрофенилгидразоны, сердечная мышца, гипергомоцистеинемия.

The products of oxidative damage of proteins in heart muscle with hyperhomocysteinemia were investigated. The significance increasing of contents dinitrophenylhydrazine (DNPH) was found in the experimental group, primary at the expense of aldehyde derivatives.

Keywords: oxidative modification of proteins, heart muscle, dinitrophenylhydrazine (DNPH), hyperhomocysteinemia.

Введение

В основе развития оксидативного стресса лежит увеличение продукции свободных радикалов и (или) снижение эффективности антиоксидантных систем организма. Повышенная концентрация окисленных макромолекул, особенно при длительной персистенции в организме, формирует различные патологические процессы, сопровождающиеся повышенным катаболизмом. Одно из значимых последствий оксидативного стресса – повреждение структуры нуклеиновых кислот, липидов, белков, что провоцирует генерацию вторичных активных форм [11, 12]. Из-за высокой распространенности в биологических системах белки являются главными мишенями для АФК/АФА [10]. Окислительные изменения структуры белка разнообразны и многочисленны, приводят к различным функциональным изменениям [5]. Помимо того, окислительномодифицированные белки способствуют вторичному повреждению других биомолекул. В настоящее время среди клинически значимых провокаторов свободно-радикальной патологии рассматривается гомоцистеин, являющийся промежуточным звеном в обмене незаменимой аминокислоты метионина. Обладая прооксидантной активностью из-за наличия SH-группы, гомоцистеин при высоких

концентрациях окисляется с образованием свободных радикалов, что ведет к развитию оксидативного стресса. Кроме того, известно, что гипергомоцистеинемия влечет за собой развитие тромбоваскулярных осложнений [2], провоцирует коронарный атеросклероз и ассоциированный с ним инфарктмиокарда [3], изучение факторов риска которого, особенно в молодом возрасте, остается актуальной медико-социальной задачей [7].

Цель исследования

Охарактеризовать продукты окислительной модификации белков (ОМБ) в миокарде при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 12 белых конвенциональных крысах-самцах линии Wistar массой 320 грамм, разделенных на 2 группы по 6 особей. Гипергомоцистеинемии моделировали введением растворов метионина в Твин 80 [4] в течение 21 суток с дополнительным добавлением метионина в питьевую воду. В качестве контрольной группы использовались животные, сопоставленные с экспериментальной по полу и массе, получавшие Твин 80 peros в течение 21 дня. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с использова-

нием коммерческого набора компании Axis Shield, Норвегия. После выведения животного из эксперимента, из навески тканей миокарда готовили гомогенат. ОМБ определяли во внелизосомальной фракции по методу R.I. Levineв модификации Е.Е. Дубининой [1]. Характеристика продуктов окислительного повреждения белков осуществлялась согласно авторской мето-

дики [9], а именно, график спектра ОМБ делился на области видимого света (λ 380-790 нм), ультрафиолетового излучения (λ 100-400) нм и на сегменты, где регистрировались альдегидные (АДФГ) и кетонные карбонильные производные (КДФГ). Соответствие длины волны поглощения и продуктов окислительной модификации белков представлено в таблице 1.

Таблица 1

Соответствие длины волны поглощения и продуктов окислительной модификации белков

	АДФГ нейтрального характера	КДФГ нейтрального характера	АДФГ основного характера	КДФГ основного характера
Длина волны, λ , нм	230, 254, 270, 280, 356	363, 370	428, 430	430, 434, 524, 535

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

Результаты исследования выражались в е.о.п/г белка. Содержание белка измеряли по методу Лоури с использованием коммерческого набора Клини Тест-БЛ НПЦ «Эко-сервис», СПб. Статистический анализ данных проводили используя программное обеспечение Microsoft Excel и программу Statistika 10. Для каждой выборки рассчитывали медиану (Me), верхний и нижний квартили [Q1; Q3]. Статистическую значимость отличий показателей экспериментальной группы от группы сравнения оценивали по U – критерию Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

На фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии получено достоверное увеличение динитрофенилгидразонов по сравнению с контрольной группой (рис. 1). При этом обнаружилось статистически значимое нарастание содержания альдегидных и кетонных динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера (табл. 2).

Из данных таблицы 2 видно значительноепревалирование содержания АДФГ, которые выступают в роли первичных маркеров окислительного стресса [8] и показывают возможное накопление фрагментированных по-

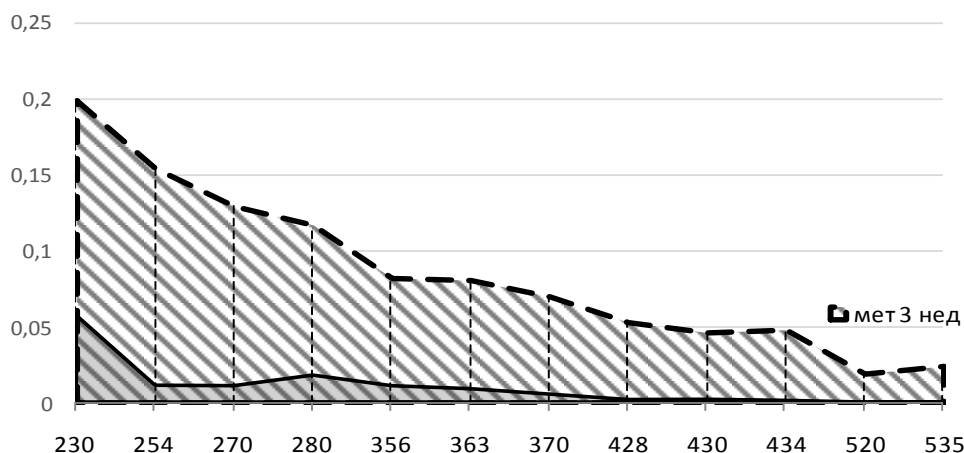


Рис. 1. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов ОМБ миокарда при ГГЦ и группы сравнения

Таблица 2

Площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков (е.о.п/г белка, Me[Q1;Q3])

	S АДНФГ нейтр.	S КДНФГ нейтр.	S АДНФГ осн.	S КДНФГ осн.	S общая
Контроль n=6	1,86 [1,50; 5,33]	0,39 [0,24; 0,55]	0,22 [0,04;0,35]	0,018 [0,004; 0,1]	2,32 [2,19; 5,42]
ГГЦn=6	16,12* [11,46;16,53]	4,06* [3,03;4,41]	3,30* [3,04;3,76]	0,51* [0,45;0,68]	22,84* [19,96;24,1]

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

врежденных белков в тканях миокарда. Предположительно, высокие концентрации гомоцистеина приводят к формированию смешанных дисульфидов и дополнительному образованию активных форм кислорода, и, как следствие, возникновению оксидативных нарушений в ткани миокарда. Содержание КДНФГ также статистически значимо возросло, но изменения оказались менее выраженными. На рисунках 2, 3 представлено соотношение динитрофенилгидразонов различных

типов в контрольной и экспериментальной группах. Причем внутри контрольной группы доля АДНФГ оказалась выше, той же доли при ГГЦ, а вот доля КДНФГ, как вторичного маркера окислительного стресса, оказалась выше в экспериментальной выборке по сравнению с контрольной группой, что подтверждает развитие достаточно интенсивного оксидативного повреждения, сопровождающегося дополнительным формированием агрегированных окисленных молекул [9].

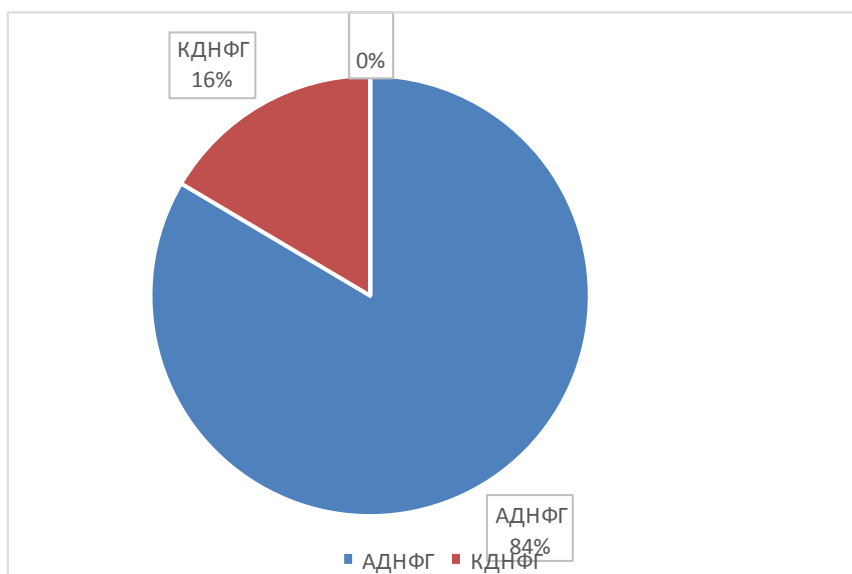


Рис. 2. Соотношение маркеров окислительного стресса в контрольной группе

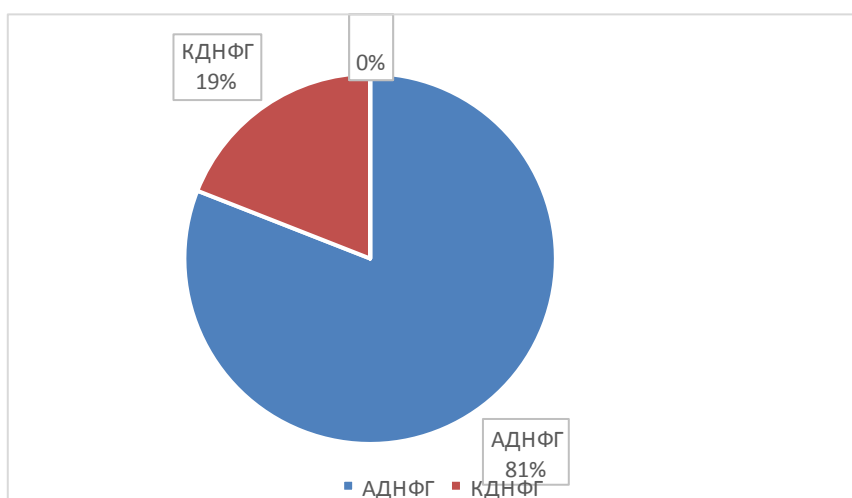


Рис. 3. Соотношение маркеров окислительного стресса при экспериментальной гипергомоцистеинемии

По-видимому, цитотоксическое действие гомоцистеина, и как следствие, развитие окислительного стресса, может приводить к возникновению дисфункций различных органелл клет-

ки, нарушению транскрипции и трансляции нуклеиновых кислот [14]. Например, при дисфункции митохондрий может возрастать их способность к супероксидобразованию [6], что увеличи-

вает вероятность свободно радикального повреждения миокарда, выражающегося в повышенном окислении миоглобина [13], нарушении процессов связывания Ca^{2+} с тропонином и усилении взаимодействия с другими сократительными белками, что ведет к ослаблению сократительной способности миокарда. Развитие окислительного стресса может запускать процессы некроза или апоптоза кардиомиоцитов, с накоплением продуктов белковой деградации в клеточных компартментах или даже внеклеточно, тем самым подавляя функцию протеасом. Выраженная гипергомоцистеинемия приводит к так называемому порочному кругу, а именно, уменьшению протеолиза с одновременным накоплением окислительно-поврежденных белков.

Выводы

1. Общее содержание продуктов окислительной модификации белков в миокарде при выраженной гипергомоцистеинемии резко возрастает по сравнению с контролем, что демонстрирует развитие оксидативного стресса.
2. Содержание первичных маркеров превышает содержание вторичных маркеров окислительного стресса.
3. Преобладание нарастания АДНФГ может свидетельствовать о большой вероятности запуска процесса фрагментации при накоплении поврежденных белков.

Литература

1. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения [Текст] / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, №1. – С. 24-26.
2. Костюченко Г.И. Гипергомоцистеинемия: клиническое значение, возрастные особенности, диагностика и коррекция [Текст] / Г.И. Костюченко // Клинич. геронтология. – 2007. – Т. 13, №4. – С. 32-40.
3. Маслов А.П. Гипергомоцистеинемия и повышенный риск сердечно-сосудистых осложнений у больных ИБС с атерогенной гиперхолестеринемией [Текст] / А.П. Маслов, А.Т. Тепляков, А.В. Кузнецова // Сиб. мед. журн. – 2009. – № 4, вып. 9. – С. 25-30.
4. Модель гипергомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс [Текст] / М.В. Корокин [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, №8. – С. 173.
5. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования [Текст] / Л.Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. – №1. – С. 74-78.
6. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания [Текст] / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
7. Селиверстова Д.В. Инфаркт миокарда у пациентов молодого возраста: факторы риска, течение, кли-

ника, ведение на госпитальном этапе [Текст] / Д.В. Селивертова, О.В. Евсина // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2013. – № 4. – С. 110-114.

8. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях [Текст] / Ю.И. Губский [и др.] // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т. 8, №3. – С. 20-27.

9. Фомина М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях [Текст] / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина; ГБОУ ВПО РязГМУ им. акад. И.П. Павлова. – Рязань, 2014. – 60 с.

10. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease [Text] / Isabella

Dalle-Donne [et al.] // Clinical Chemistry. – 2006. – Vol. 52, №4. – P. 601-623.

11. Čolak E. New markers of oxidative damage to macromolecules [Text] / E. Čolak // JMB. – 2008. – P. 1-16.

12. Stadtman E.R. Protein oxidation [Text] / E.R. Stadtman, R.L. Levine // Annals of N.Y. Academy of Sciences. – 2000. – Vol. 899. – P. 191-208.

13. Hydrogen peroxide plays a key role in the oxidation reaction of myoglobin by molecular oxygen – A computer simulation [Text] / T. Wasawa [et al.] // Biophys. J. – 1992. – Vol. 63. – P. 544-550.

14. Weisfeldt M.L. Oxygen-derived free radicals and myocardial ischemic injury [Text] / M.L. Weisfeldt, J.L. Zweier, J.T. Flaherty // Heart Dis. – 1988. – № 3. – P. 60-72.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ильичева А.С. – ассист. кафедры биохимии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, зав. КДЛ ФДПО МУЗ ГКБ Коломенская центр. районная больница, г. Рязань.

E-mail: sergan52006@rambler.ru.

Фомина М.А. – к.м.н., доц. кафедры биохимии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: marya.fom@yandex.ru.

Медведев Д.В. – ассист. кафедры биохимии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: meddmit@mail.ru.