

УДК 577.121:963

© Коллектив авторов, 2011.

ОБРАЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ И ПРОДУКТОВ НЕПОЛНОГО РАСПАДА БЕЛКОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА И В УСЛОВИЯХ ИНИЦИАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ IN VITRO

Н.М. Ёлкина, В.В. Казакова, С.В. Коношенко, М.А. Долгов*Кафедра медицинской биологии (зав. - профессор Лазарев К.Л.) ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского» г. Симферополь.**Кафедра физической культуры, спорта и здоровья человека (зав. - доцент Луцки Е.Г.) Крымского факультета Запорожского национального университета, г. Симферополь.**Кафедра биохимии (зав. - профессор Коношенко С.В.) Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, г. Симферополь.*

FORMATION OF THE SECONDARY PEROXIDATED PRODUCTS AND THE PRODUCTS OF PROTEINS SHORT DESTRUCTION IN HUMAN ERYTHROCYTES UNDER ISCHEMIC HEART DISEASE AND INITIATION OF OXIDATIVE REACTIONS IN VITRO

N. M. Yolkina, V. V. Kazakova, S. V. Konoshenko, M. A. Dolgov

SUMMARY

It has been shown that under ischemic heart disease the formation of secondary peroxidated products in human erythrocytes is increased. Under incubation of erythrocytes of patients in Fenton system, generated the oxygen active forms, the some decreasing of the level of TBA-active products of POL is observed. The reciprocal changes of the content of the secondary peroxidated products and the middle molecular oligopeptides are observed under pathology and in the conditions of initiation of oxidative reactions in vitro.

УТВОРЕННЯ ВТОРИННИХ ПРОДУКТІВ ПЕРОКСИДАЦІЇ ЛІПІДІВ І ПРОДУКТІВ НЕПОВНОГО РОЗПАДУ БІЛКІВ В ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ ПРИ ІШЕМІЧНІЙ ХВОРОБІ СЕРЦЯ ТА ЗА УМОВ ІНІЦІАЦІЇ ОКИСНЮВАЛЬНИХ РЕАКЦІЙ IN VITRO

Н. М. Иолкіна, В. В. Казакова, С. В. Коношенко, М. О. Долгов

РЕЗЮМЕ

Показано, що при ішемічній хворобі серця в еритроцитах посилюється утворення вторинних продуктів пероксидації ліпідів. Інкубація еритроцитів хворих в середовищі Фентона, що генерує активні форми кисню, призводить до деякого зменшення рівня ТБК-активних продуктів ПОЛ.

Встановлено реципронний характер змін вмісту в еритроцитах вторинних продуктів пероксидації ліпідів і середньомолекулярних олігопептидів (продуктів неповного розпаду білків) як за умов патології, так й при ініціації окиснювальних реакцій in vitro.

Ключевые слова: эритроциты, пероксидация липидов, среднмолекулярные олигопептиды, среда Фентона, ишемическая болезнь сердца.

Проблема окислительного стресса является одной из наиболее актуальных в современной биологии и медицине [4-6].

Известно, что при многих заболеваниях нарушается прооксидантно-антиоксидантное равновесие, что ведет к интенсификации свободно-радикальных реакций, усиленному генерированию активных форм кислорода (АФК) и их влиянию на клеточные структуры [5, 8].

Однако, несмотря на большое количество работ, выполненных в этом аспекте, до сих пор остаётся нерешенным вопрос о характере повреждающего действия АФК на различные по уровню организации клетки и молекулярные системы, а также вопрос о возможности развития в условиях окислительного стресса компенсаторных реакций, их направленности и взаимосвязи. В частности, имеет определенный

научный и практический интерес выяснение взаимосвязи процессов пероксидации липидов и распада белков, что сопровождается образованием среднмолекулярных олигопептидов (СМО), фрагментов белковых молекул с молекулярной массой от 300 до 5000 Да, большинство из которых считается эндотоксинами, вредными для организма человека [1, 3].

В связи с этим, целью настоящей работы было изучение образования в эритроцитах вторичных продуктов переокисления липидов (ПОЛ) и продуктов неполного распада белков в условиях патологии и при инициации окислительных реакций in vitro.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты доноров станции переливания крови (25 человек), а также 30-ти больных ишемической болезнью сердца. С целью инициации окислительных реакций

in vitro эритроциты практически здоровых людей и больных ишемической болезнью сердца инкубировали в среде Фентона, генерирующей АФК (10мМ FeSO₄ и 3мМ H₂O₂), при температуре 4°С в течение 2 часов [4]. Гемолиз эритроцитов осуществляли по методу Драбкина [7]. В гемолизатах эритроцитов определяли содержание ТБК-активных продуктов перекисидации липидов и продуктов неполного распада белков (СМО).

ТБК-активные продукты ПОЛ идентифицировали по интенсивности поглощения при 535 нм и 560 нм [2]. Содержание среднемoleкулярных олигопептидов оценивали по интенсивности поглощения при 254 нм, 275 нм и 280 нм [3].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что в эритроцитах больных ишемической болезнью сердца увеличивается содержание ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов: в 1,8 раза по сравнению с контрольной группой доноров (табл. 1), что является проявлением развития окислительного стресса, связанного с интенсификацией процессов перекисидации [4].

При инкубации эритроцитов практически здоровых людей в среде Фентона, генерирующей АФК, также наблюдается достоверное увеличение содержания в гемолизатах ТБК-активных продуктов, в среднем, в 1,46 раза по сравнению с контролем, но на 37,5 % меньше по сравнению с эритроцитами больных.

Таблица 1

Содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах практически здоровых людей и больных ишемической болезнью сердца в условиях инициации окислительных реакций *in vitro* (M ± m)

Объект исследования	ед. опт. пл.	
	535 нм	560 нм
Эритроциты здоровых людей до инкубации в среде Фентона (контроль 1)	0,273 ± 0,006	0,204 ± 0,004
Эритроциты здоровых людей после инкубации в среде	0,387 ± 0,017*	0,302 ± 0,021*
Эритроциты больных до инкубации в среде Фентона	0,519 ± 0,020*	0,353 ± 0,015*
Эритроциты больных после инкубации в среде Фентона	0,463 ± 0,022***	0,320 ± 0,017***

Примечание: * - достоверность различия по сравнению с контролем 1 ($p < 0,05$);

** - достоверность различия по сравнению с контролем 2 ($p < 0,05$).

В отличие от эритроцитов здоровых людей, инкубация эритроцитов больных в среде Фентона сопровождалась некоторым снижением уровня ТБК-активных продуктов относительно исходного показателя эритроцитов больных (на 9,1 %).

Однако, относительно эритроцитов здоровых людей содержание ТБК-активных продуктов было достоверно выше. Снижение уровня вторичных продуктов ПОЛ в эритроцитах больных после инкубации в среде Фентона может быть связано с проявлением действия определенных компенсаторных механизмов, которые включаются в условиях инициации окислительных реакций с участием активных форм кислорода.

При изучении содержания в гемолизатах эритроцитов среднемoleкулярных олигопептидов наблюдалась обратная направленность изменений (табл. 2).

Так, в эритроцитах больных значение этого показателя было в 1,46 раза ниже по сравнению с эритроцитами здоровых людей. Снижение оптической плотности исследованных образцов отмечено так же при

инкубации эритроцитов здоровых людей и больных ишемической болезнью сердца в среде Фентона.

Наблюдается увеличение соотношения содержания ТБК-активных продуктов и среднемoleкулярных олигопептидов в направлении: эритроциты здоровых людей → эритроциты здоровых людей после инкубации в среде Фентона → эритроциты больных → эритроциты больных после инкубации в среде Фентона (0,19; 0,35; 0,51; 0,56).

В изменениях содержания ТБК-активных продуктов и уровня среднемoleкулярных олигопептидов прослеживается хорошо выраженная корреляционная связь ($r = -0,95$).

Из литературы известно [1], что среднемoleкулярные олигопептиды образуются вследствие деструктивных процессов, в которые, наряду с другими органическими соединениями, вовлекаются белковые молекулы. В условиях окислительного стресса увеличивается вероятность разрушительного действия активных форм кислорода и, таким образом, образования СМО.

Таблица 2

Содержание среднемолекулярных олигопептидов в эритроцитах практически здоровых людей и больных ишемической болезнью сердца в условиях инициации окислительных пепактий *in vitro* (M + m)

Объект исследования	ед. опт. пл.		
	254 нм	275 нм	280 нм
Эритроциты здоровых людей до инкубации в среде Фентона (контроль 1)	1,170 ± 0,050	0,442 ± 0,020	0,290 ± 0,009
Эритроциты здоровых людей после инкубации в среде Фентона	1,000 ± 0,045*	0,320 ± 0,010*	0,175 ± 0,004*
Эритроциты больных до инкубации в среде Фентона (контроль 2)	0,834 ± 0,035*	0,312 ± 0,009*	0,165 ± 0,005*
Эритроциты больных после инкубации в среде Фентона	0,739 ± 0,029***	0,213 ± 0,005***	0,120 ± 0,004***

Примечание: обозначения для * и ** те же, что и в табл. 1.

Наблюдаемое в наших исследованиях снижение уровня СМО в гемолизатах эритроцитов в условиях патологии и при инициации окислительных реакций *in vitro* может быть связано с агрегацией среднемолекулярных олигопептидов в макромолекулярные комплексы с последующим их осаждением и удалением из опытных образцов.

Не исключено также, что под действием АФК происходит частичное разрушение кольцевых структур ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана), которые входят в состав продуктов распада белков и на абсорбционных свойствах которых основан метод определения среднемолекулярных олигопептидов.

Высокий уровень корреляции, который отмечен в изменениях содержания ТБК-активных продуктов и среднемолекулярных олигопептидов в условиях инициации окислительных реакций *in vitro* и при патологии, свидетельствует о тесной связи процессов перекисидации липидов и разрушения белков. Возможно, что липидные компоненты первыми претерпевают разрушительное действие АФК, тогда как разрушение белковых молекул зависит не только от уровня активных форм кислорода, но и от образования вторичных продуктов ПОЛ, которые способны связываться с белками, модифицируя их структуру [5].

ВЫВОДЫ

1. В эритроцитах больных ишемической болезнью сердца усиливаются процессы перекисидации липидов, о чем свидетельствует увеличение уровня ТБК-активных продуктов ПОЛ.

2. Инкубация эритроцитов больных в среде Фентона, генерирующей АФК, приводит к некоторому

уменьшению содержания в эритроцитах вторичных продуктов ПОЛ. Такой характер изменения соответствующего показателя в условиях патологии свидетельствует о возможности развития в эритроцитах больных определенных компенсаторных реакций.

3. Показана тесная корреляционная связь в изменениях содержания в эритроцитах ТБК-активных продуктов и среднемолекулярных олигопептидов как в условиях патологии, так и при инициации окислительных реакций *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьева А.Н. Сравнительная оценка уровня эндогенной интоксикации у лиц разных возрастных групп // Клин. лаб. диагн. - 2004, № 6. - С. 11-13.
- Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. Покровского А.А. - М: Медицина, 1969. - С. 287-288.
- Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // Лаб. дело. - 1984, № 3. - С. 38-42.
- Дубинина Е.Е., Гавровская СВ., Кузьмич Е.В. и др. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битриптофана в очищенных белках с использованием системы Фентона // Биохимия. - 2002. - Т. 67, вып. 3. - С. 413-421.
- Меньшиков Е.Б., Зенков Н.К. Окислительный стресс при воспалении // Усп. совр. биол. - 1997. - Т. 117, № 2. С. 155-169.
- Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. - 2002. - Т. 67, № 3. - С. 339-352.

7. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch, biochem. - 1949. - V. 21. - P. 224-226.

8. Ruano-Ravina A., Figueiras A., Freire-Garabal M., Barros-Dios I. Antioxidant vitamins and risk of lung cancer // Gurr. Pharm. Des. – 2006. – Vol. 12, N 5. – P. 599-613.