

УДК 616.15-074:[616.379-008.64+616.517]

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ СОЧЕТАННОМ ТЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА И ПСОРИАЗА

Попов К.А., Мелконян К.И., Карташевская М.И.

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар, Россия (350063, Краснодар, ул. Седина, 4); e-mail: naftalin444@mail.ru

В результате проведенных исследований было установлено, что при сочетанном течении сахарного диабета 2 типа и псориаза имеются выраженные нарушения биохимических показателей, отражающих конформации белков молекул в плазме крови. Состояние пространственной структуры белков изучено косвенными методами с помощью флуоресцентной спектроскопии, а также путем определения соотношения поверхностных и скрытых тиоловых групп протеинов. Интенсивность собственной флуоресценции белков плазмы крови больных, в сравнении с контрольной группой, была снижена на 8,3%. Общее содержание тиоловых групп белков плазмы при сочетанном течении сахарного диабета 2 типа и псориаза было снижено на 27,7 % за счет резкого уменьшения количества скрытых сульфгидрильных групп, при этом количество поверхностных SH-групп достоверно не изменилось, что подтверждалось двукратным увеличением коэффициента их соотношения. Такие результаты исследований позволяют говорить о значительных нарушениях в нативной конформации белков плазмы крови в исследуемой группе, предположительно за счет их неферментного гликирования и окислительных модификаций.

Ключевые слова: сахарный диабет, псориаз, конформации белков, флуоресценция, тиоловые группы.

CONFORMATIONAL CHANGES OF PLASMA PROTEINS IN DIABETES MELLITUS TYPE 2 AND PSORIASIS

Popov K.A., Melkonyan K.I., Kartashevskaya M.I.

Kuban state medical university, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, M. Sedina street, 4), e-mail: naftalin444@mail.ru

In this study we show the combined diabetes type 2 and psoriasis is characterized by pronounced disturbances of biochemical indicators that reflect the conformation of protein molecules in plasma. Condition of proteins spatial structure was studied by indirect methods using fluorescence spectroscopy and by determining the ratio of surface and latent thiol proteins groups. The intensity of the intrinsic fluorescence of plasma proteins compared with the control group was reduced by 8.3 %. The total content of thiol groups in plasma proteins in patients with diabetes type 2 and psoriasis was reduced by 27.7 % due to a sharp decrease in the number of latent sulfhydryl groups, the number of surface SH-groups was not significantly changed, which was confirmed by two-fold increase of correlation coefficient. Research results suggest that in the target group there are significant disturbances of the native conformation of plasma proteins supposedly because of their non-enzymatic glycation and oxidative modification.

Keywords: diabetes mellitus, psoriasis, protein conformation, fluorescence, thiol group.

Сахарный диабет (СД) представляет собой заболевание, проявляющееся ярким нарушением метаболизма, прежде всего углеводного и энергетического, сопровождающееся в конечном итоге дисбалансом всех функциональных систем организма. К таким нарушениям приводит абсолютная или относительная недостаточность инсулина, и как результат – хроническая гипергликемия. В соответствии с современными представлениями дефицит инсулина или инсулинорезистентность, длительная гипергликемия ведут к таким нарушениям на молекулярном уровне, как окислительный стресс и гликирование белков. Оба этих фактора ведут к изменению конформации белковых молекул и нарушению их функции, что и является молекулярной основой патогенеза поздних осложнений СД.

Метаболические нарушения при СД в сочетании с микро- и макроангиопатиями, нарушениями иммунологической реактивности, в том числе местной, приводят к изменениям в структуре эпидермиса, дермы, потовых желез, фолликулах. Эти изменения приводят к повышению риска развития дерматологической патологии у больных СД. И действительно к настоящему времени описано около 30 дерматозов, развивающихся на фоне, или реже предшествующих СД 2 типа. Одним из таких наиболее распространенных и тяжелых дерматозов является псориаз [3, 12, 13].

Одним из интересных направлений в прогнозировании течения заболеваний, оценке риска развития осложнений и контроле эффективности проводимой терапии является исследование конформационных изменений белков различных биожидкостей, прежде всего, плазмы или сыворотки крови. Белки ответственны за выполнение любого биологического процесса и являются необходимым компонентом жизни. Важнейшая биологическая роль протеинов связана с уникальностью пространственной структуры каждого индивидуального белка. Нарушение конформации белковой молекулы ведет к изменению ее функционирования: ослаблению, редко в условиях патологического процесса к усилению или к извращению ее действия. Степень выраженности подобных изменений может говорить о тяжести патологии, риске развития осложнений. Следует отметить широкий спектр процессов, приводящих к изменению пространственной структуры белков плазмы крови, это может быть и вышеупомянутое гликирование, повреждение белков активными формами кислорода, а также другими свободными радикалами и продуктами перекисного окисления биомолекул, связывание с тяжелыми металлами, другими биогенными элементами при нарушении металл-лигандного гомеостаза, взаимодействие с прочими лигандами, как экзогенными, так и эндогенными, при нарушении их гомеостаза, изменение характера среды (рН, ионной силы и т.д.), реакции изотопного обмена и многое другое. Вышесказанное хорошо подчеркивает универсальность нарушений трехмерной структуры белков, говорит о возможности применения их оценки в исследовании практически любых заболеваний [1, 2, 7, 8, 9, 10].

Целью настоящей работы являлось изучение конформационных изменений белков плазмы крови у больных СД 2 типа при сочетанном течении с псориазом.

Материалы и методы

Наблюдения были выполнены на базе ГБУЗ «Клинический кожно-венерологический диспансер» министерства здравоохранения Краснодарского края. Все пациенты с сахарным диабетом 2 типа и псориазом, которые дали согласие на участие в проведении данного исследования, проходили лечение в стационаре по основному заболеванию – псориаз. Первую группу составили пациенты с сахарным диабетом 2 типа при сочетанном течении

псориаза (n = 30 человек), контрольную группу составили здоровые доноры (n = 30 человек).

Забор крови производился в утреннее время, натощак из локтевой вены. Объем забираемой крови 5 мл. Полученную цельную кровь центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об./мин. Для дальнейшего исследования использовали надосадочную жидкость – плазму.

Концентрацию белка в плазме крови определяли по поглощению света образцом биожидкости в ультрафиолетовой области при 280 нм [5]. Определение концентрации сывороточного альбумина осуществляли унифицированным методом по реакции с бромкрезоловым зеленым [6].

Для оценки конформационных изменений белковых молекул измеряли собственную флуоресценцию плазмы крови, при длине волны возбуждения 270 нм, длине волны регистрации флуоресценции 330 нм. Также для косвенной оценки нарушений пространственной структуры белков проводили определение соотношения поверхностных (легко доступных) и скрытых (трудно доступных) тиоловых (-SH) групп белков с помощью 5,5'-дителиобис (2-нитробензойной) кислоты (ДТНБК, реактив Элмана) [4, 11]. За поверхностные сульфгидрильные группы были приняты группы, прореагировавшие с реактивом Элмана за первые 3 минуты, а скрытые за промежуток от 3 до 30 минуты. Изменения собственной флуоресценции говорят об изменениях в окружении остатков триптофана в белках, в гораздо меньшей степени об окружении тирозина и фенилаланина. Соотношение – поверхностные/скрытые SH-группы может говорить об изменении окружения исследуемых функциональных групп, выворачивании белковой глобулы. Оба метода применены для повышения общей информативности, так как отсутствуют какие-либо разработанные рекомендации по данному вопросу, а изменения белковых глобул могут затрагивать в большей или меньшей степени различные участки макромолекулы, что в одном из применяемых методов может не отразиться.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с принятыми методами вариационной статистики, с использованием критерия t-Стьюдента и программного обеспечения, находящегося в свободном доступе. Различия считали достоверными, если вероятность ошибки составляла $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Гетерогенность белкового состава плазмы крови может обуславливать ошибку предложенных нами исследований собственной флуоресценции и соотношения поверхностных/скрытых SH-групп, за счет изменения соотношений различных белковых фракций, которых в плазме насчитывается несколько десятков. Для минимизирования влияния данного фактора было предложено определять содержание общего белка и

альбумина плазмы крови и на основе полученных результатов рассчитывать ориентировочный коэффициент альбумины/глобулины. Концентрация глобулинов была приблизительно взята, равной разнице между содержанием общего белка и альбумином. Биологические пробы с отклонением альбумин-глобулинового коэффициента от значений 1,2–1,8 были исключены из дальнейших исследований. Средний коэффициент проб, проходивших дальнейшее изучение, составил: в контрольной группе – $1,45 \pm 0,20$, в опытной группе – $1,36 \pm 0,15$, разница данных показателей статистически незначима.

Анализ собственной флуоресценции плазмы крови здоровых доноров и пациентов, больных СД 2 типа в стадии декомпенсации с сочетанным течением псориаза, показал небольшое (на 8,3 %), но статистически значимое снижение собственной флуоресценции плазмы опытной группы, в сравнении с контрольной группой (рис. 1).

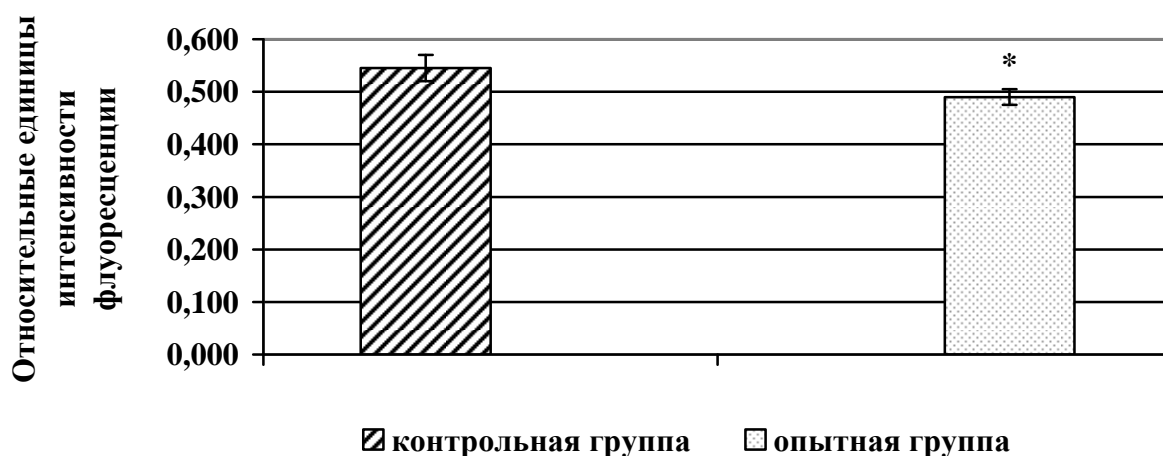


Рис. 1. Изменения собственной флуоресценции плазмы крови при СД 2 типа с сочетанным течением псориаза

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой.

Анализ количества и состава тиоловых групп у больных СД 2 типа в стадии декомпенсации с сочетанным течением псориаза, а также у здоровых доноров показал, что данные патологии сопровождаются снижением общего содержания белковых сульфгидрильных групп (на 27,7 %), причем в основном за счет пула скрытых SH-групп, при несколько возросшей доле поверхностных. Эти изменения наглядно демонстрирует значительно возросший коэффициент их соотношения (табл. 1).

Таблица 1

Состав тиоловых групп белков плазмы крови при СД 2 типа и сочетанном течении псориаза

Показатель	Контрольная группа n = 30	Пациенты, страдающие СД 2 типа в сочетании с псориазом n = 30
SH-группы, общие	$0,159 \pm 0,006$	$0,115 \pm 0,008^*$

SH-группы, поверхностные	0,073±0,003	0,075±0,004*
SH-группы, скрытые	0,086±0,008	0,040±0,007*
K(3/30-3)^	0,475	1,018*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе; ^ – коэффициент соотношения поверхностных SH-групп к скрытым.

Все данные представлены в относительных единицах оптической плотности.

Исследование тиоловых групп белков плазмы крови может дать большое количество разнообразной информации. Сульфгидрильные группы, имея один из наиболее низких окислительно-восстановительных потенциалов, обеспечивают антиоксидантные свойства белков. Однако не все SH-группы обладают одинаковой реакционной способностью. Традиционно выделяют три типа тиоловых групп: быстро реагирующие с обычными тиоловыми реагентами или окислителями (например, ДТНБК, п-хлормеркурибензоат и др.), медленно реагирующие и SH-группы, обнаружить которые химическими методами удастся лишь после денатурации белковой молекулы. Нам более всего интересуют первые две группы, различие в реакционной способности которых во многом объясняется локализацией их в белковой молекуле. Первые, как правило, расположены на поверхности глобулы, вторые частично прикрыты полипептидными цепями. Изменение соотношения поверхностных / скрытых сульфгидрильных групп объясняется только изменением конформации белковой молекулы, влекущим за собой изменение локализации SH-групп в трехмерной структуре макромолекулы.

Выводы

Таким образом, резюмируя все вышеизложенное, можно отметить, что значимую роль в патогенезе исследуемых заболеваний (СД 2 типа при сочетанном течении псориаза) играют нарушения нативной конформации белков плазмы крови. Говорить о конкретных механизмах наблюдаемых модификаций на данном этапе развития наших исследований представляется затруднительным, однако с большой долей вероятности можно предположить, что основной причиной регистрируемых изменений является неферментативное гликирование и окислительные модификации, прежде всего тиоловых групп белков. Результаты исследований нарушений трехмерной структуры макромолекул протеинов могут дать полезную информацию о выраженности патологического процесса, в связи с чем, такие лабораторные тесты можно рекомендовать для уточнения степени тяжести СД 2 типа с сочетанным течением псориаза и контроля эффективности терапии.

Список литературы

1. Басов А.А., Мелконян К.И., Сторожук А.П. Влияние препаратов липоевой кислоты на

- показатели проокислительно-антиокислительной системы крови при сахарном диабете и гипотиреозе // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 613.
2. Басов А.А., Павлюченко И.И., Быков И.М., Федосов С.Р., Губарева Е.А. Способ диагностики нарушений метаболизма в организме в условиях окислительного стресса. Патент на изобретение № 2436101, Российская Федерация, МПК G01N 33/573. – Заявл. 25.06.2010; опубл. 10.12.2011. – Бюл. № 34. – 20 с.
 3. Беловол А.Н., Береговая А.А., Штыров И.Н. Хронические системные дерматозы на фоне метаболического синдрома // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2014. – № 14 (2). – С. 364-370.
 4. Веревкина И.В., Точилкин А.И., Попова Н.А. Колориметрический метод определения SH-групп и SS-связей в белках при помощи 5,5-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 223-231.
 5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
 6. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. – СПб.: Интермедика, 2002. – 600 с.
 7. Литвинова М.Г., Басов А.А., Быков И.М. Показатели свободнорадикального окисления в крови и ротовой жидкости у больных при ишемической болезни сердца и сахарном диабете 2-го типа // Кубанский научный медицинский вестник. – 2012. – № 3 (132). – С. 94-98.
 8. Малышко В.В., Федосов С.Р., Басов А.А., Чернобай К.Н. Сравнительная оценка динамики проокислительно-антиокислительных показателей на системном и локальном уровнях при сахарном диабете, осложненном острой и хронической хирургической инфекцией // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 4–3. – С. 551-555.
 9. Павлюченко И.И., Басов А.А., Быков И.М., Орлова С.В. Интегральные методы оценки уровня эндогенной интоксикации и перекисного окисления биомолекул при острых и хронических заболеваниях // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т. 5. – № 4. – С. 551-555.
 10. Павлюченко И.И., Басов А.А., Орлова С.В., Быков И.М. Изменение активности ферментов антирадикальной защиты как прогностический критерий развития и прогрессирования сахарного диабета // International Journal on Immunorehabilitation. – 2004. – Vol. 6. – No. 1. – P. 14-19.
 11. Паталах И.И., Урвант Л.П., Евстратова И.Н., Дроботько Т.Ф., Ломаковский А.Н. Белковые тиол-дисульфиды плазмы: роль в атерогенезе // Лабораторная диагностика. – 2008. – 4 (46). – С. 11-19.

12. Штода Ю.М., Слесаренко Н.А., Родионова Т.И., Утц С.Р., Карпова Е.Н. Некоторые аспекты общности патогенеза сахарного диабета 2 типа и псориаза // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 4. – С. 647-654.
13. Qure A. A., Choi H. K. Psoriasis and the risk of diabetes and hypertension: a prospective study of US female nurses // *Arch. Dermatol.* – 2009. – Vol. 145. – No. 4. – P. 379-382.

Рецензенты:

Павлюченко И.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар;

Быков И.М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар.