

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Теплов С.А., Абаленихина Ю.В., Иваннычева Ю.Н., 2015
УДК 616.12-008.9-085.31'156

**ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАДИСПЕРСНЫХ ПОРОШКОВ МЕДИ
НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ СЕРДЦА КРЫС**

С.А. ТЕПЛОВ, Ю.В. АБАЛЕНИХИНА, Ю.Н. ИВАНЫЧЕВА

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

**THE INFLUENCE OF ULTRAFINE POWDERS OF COPPER
OXIDATIVE MODIFICATION PROTEINS OF RAT HEART**

S.A. TEPLOV, JU.V. ABALENIHINA, JU.N. IVANYCHEVA

Ryazan State Medical University, Ryazan

Изучено влияние ультрадисперсных порошков меди в дозе 10^{-4} мг/кг и 1 мг/кг на окислительную модификацию белков сердца крыс. Установлено, что в условиях данной модели уменьшается содержание карбонильных производных протеинов и доля вторичных маркеров окислительного стресса. Воздействие меди в ультрадисперсной форме сопровождается сайт-специфическим окислительным повреждением белков в области остатков триптофана, что свидетельствует о процессе фрагментации белковых молекул.

Ключевые слова: карбонильные производные белков, окисленный триптофан, медь в ультрадисперсной форме.

The effect of ultrafine copper powder at a dose of 10^{-4} mg / kg and 1 mg / kg on the oxidative modification of proteins rat heart. It was found that under this model reduces the content of oxidation-modified proteins and the proportion of

secondary markers of oxidative stress. Exposure to form copper ultrafine followed by site-specific oxidative damage to proteins in tryptophan residues, indicating that the fragmentation of the protein molecules.

Keywords: protein carbonyl derivatives, oxidized tryptophan, copper in the form of ultrafine.

Введение

Медь необходима для жизни всех организмов, так как участвует в осуществлении многих клеточных процессов. Способность меди восстанавливать молекулярный кислород до его активных форм позволяет рассматривать ионы меди в качестве токсического вещества [5]. Большой интерес вызывают биопрепараты нового поколения – микроэлементы в виде ультрадисперсных порошков металлов (УДПМ), активными компонентами которых является медь и другие микроэлементы в ультрадисперсном состоянии. Установлено, что нанокристаллические порошки меди улучшают физиологическое состояние животных, однако большая удельная поверхность наноматериалов и ее особые свойства могут усилить механизмы, связанные с токсическим действием металла на живые организмы [1].

Эффективными ловушками активных форм кислорода являются белки, в результате чего формируются карбонильные производные белковых молекул. Окислительная модификация белков является наиболее перспективным маркером интенсивности свобод-

но-радикальных процессов, происходящих под действием неблагоприятных внешних факторов, таких как ионизирующая радиация, фотохимические воздействия, металл-зависимое окисление [3, 2, 8]. Роль окислительного стресса рассматривается в качестве одного из патогенетических звеньев многих заболеваний [4, 6].

Цель исследования

Выявление влияния меди в ультрадисперсной форме на окислительную модификацию белков сердца крыс.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 18 конвенциональных крысах-самках линии Wistar массой 280-320 г. Животным экспериментальных групп в течение 14 дней перорально вводили ультрадисперсный порошок меди (размер частиц 10-15 нм): экспериментальной группе 1 (n=6) в дозе 10^{-4} мг/кг, а экспериментальной группе 2 (n=6) в дозе 1 мг/кг. Контрольной группе животных (n=6) в те же сроки осуществляли пероральное введение физиологического раствора. Содержание животных в виварии соответствовало "Санитарным правилам по

устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник" от 06.04.1993 г. В манипуляции с животными, в том числе выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных" (Приказ Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г.) Немедленно после выведения животного из эксперимента из ткани сердца готовили гомогенат ткани сердца.

Окислительную модификацию белков оценивали в цитоплазматической фракции гомогената по методу R.L.Levine модификации Е.Е. Дубининой [3], после осаждения нуклеиновых кислот 10% раствором стрептомицина сульфата. Карбонильные производные белков регистрировали на спектрофотометре на следующих длинах волн: 254, 270, 280, 354, 363, 370, 428, 430, 434, 520, 524, 535 нм. По полученным экстинкциям строили спектр окислительной модификации белков.

Содержание битирозина и окисленного триптофана определяли флуориметрическим методом. Окислительная модификация тирозиновых остатков белков измерялась по образованию битирозина, который обладает характерной флуоресценцией [7]. Окисление триптофановых остатков сопровождается снижением флуоресценции, характерной для триптофана [9].

Для оценки достоверности различий независимых выборок исполь-

зовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест).

Результаты и их обсуждение

Результаты экспериментальных групп были сопоставлены с результатами контрольной группы: уровень карбонильных производных белков в сердце крыс статистически значимо снижался (рис. 1). Указанные изменения не зависят от дозы вводимых ультрадисперсных порошков меди.

В УФ-свете спектра регистрируются динитрофенилгидразоны нейтрального характера: в диапазоне 260-558 нм - альдегиды, а при 363-370 нм - кетоны. Для динитрофенилгидразоновосновного характера спектр поглощения в области видимого света в диапазоне 258-264, 428-520 нм для альдегидов, и 430-434 нм, 524-535 нм для кетонов. Из спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков следует, что показатели снижаются на длинах волн 356 нм и 520 нм, что свидетельствует о снижении количества альдегид-динитрофенилгидразоновосновного и нейтрального характера, а при $\lambda = 363, 370$ нм и 428, 430 нм - кетон-динитрофенилгидразоны основного и нейтрального характера.

Представленный факт может объясниться следующими механизмами: ограничение поступления избытка меди через ионные каналы [5], а также индуцирование защитных путей от токсического действия металлов переменной валентности.

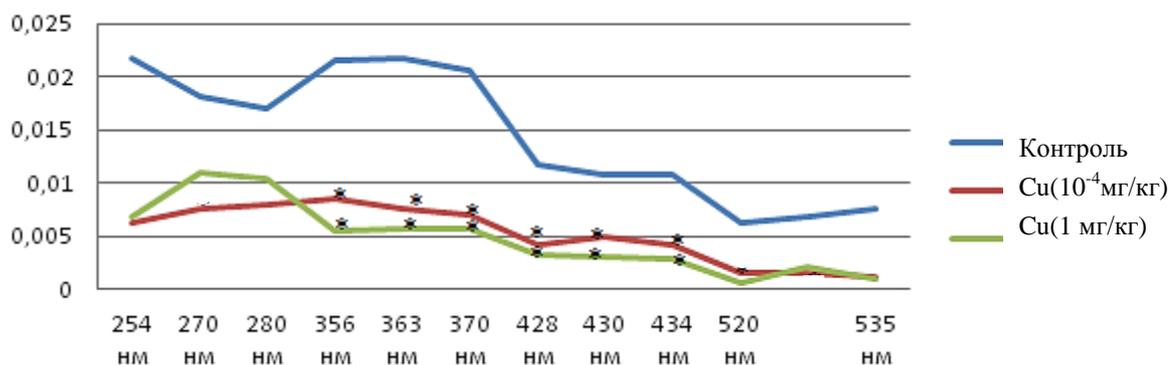


Рис. 1. Спектр поглощения продуктов спонтанной окислительной модификации белков

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

Известно, что первичными маркерами окислительного стресса являются альдегиды, а вторичные маркеры – кетоны [2]. Из полученных результатов следует, что доля вторичных маркеров окислительного стресса при введении УДП меди статистически значимо снижается относительно показателей контрольной группы (рис. 2). Полученная закономерность свидетельствует о том, что процесс окислительного стресса не переходит в позднюю стадию и носит обратимый характер. Возможно, в условиях снижения уровня карбонильных производных белков новые альдегиды не образуются, а присутствующие в ткани сердца переходят в кетоны.

Индукция белкового механизма защиты может осуществляться по пути синтеза белков *denovo*, которые связывают медь в неактивные комплек-

сы. Возможно, что в качестве таких белков выступают триптофан-содержащие протеины. Об этом процессе свидетельствует прямая достоверная зависимость между вводимой дозой меди в ультрадисперсной форме и резким снижением флуоресценции триптофана (табл. 1). Таким образом, воздействие УДП меди сопровождается сайт-специфическим окислительным повреждением белков в области остатков триптофана. Представленные данные свидетельствуют о глубоких окислительных повреждениях белков при данной экспериментальной модели, подтверждением этого является зарегистрированная нами в гомогенате сердца высокая концентрация практически нерепарируемых стабильных модификаций триптофана в белках, сопровождающееся выраженными и достоверными изменениями их флуоресценции.

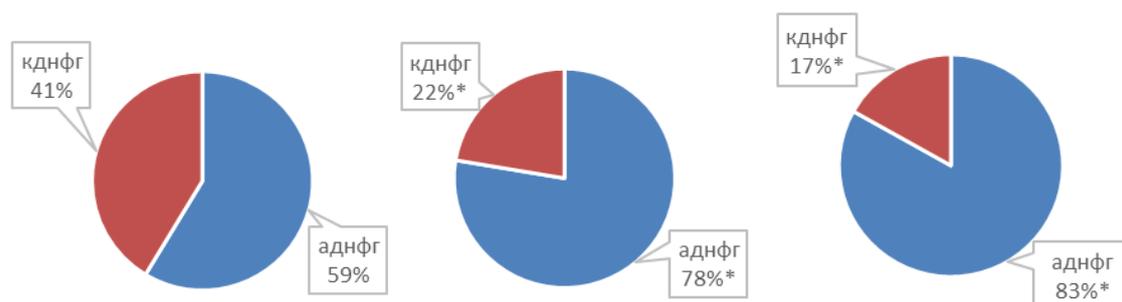


Рис. 2. Соотношение первичных и вторичных маркёров окислительного стресса контрольной группы животных

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

Окислительная модификация тирозиновых остатков сопряжена с образованием битирозина, который обладает характерной голубой флуоресценцией, однако, его образование в экспериментальных условиях снижалось (табл. 1). Представленный факт подтверждает литературные данные о том, что ароматические аминокислоты ред-

ковходят в состав металл-связывающей поверхности белков, поэтому они меньше подвергаются воздействию металл-катализируемого окисления [8]. Снижение уровня битирозина и нарастание количества окисленного триптофана свидетельствует об отсутствии процессов агрегации и преобладании фрагментации белков.

Таблица 1

Показатели флуоресценции битирозина и триптофана

Показатель	Контроль	Группа №1	Группа №2
Триптофан, интенсивность флуоресценции, ед. на 1 г белка	2,02 [1,84;2,97]	1,09 [0,97;1,30]*	0,93 [0,87;1,63]*
Битирозин, интенсивность флуоресценции, ед. на 1 г белка	1,10 [0,77;1,51]	0,65 [0,48;1,09]*	0,87 [0,59;1,34]*

Примечание: *- статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Выводы

При пероральном введении ультрадисперсных порошков меди содержание карбонильных производных белков снижается и сопровождается нарастанием первичных маркеров окислительного стресса. Количество битирозина в условиях экспериментальных моделей снижается, однако, количество окисленного триптофана возрастает, что свидетельствует о сайт-специфичном повреждении и защитном значении данного процесса.

Литература

1. Глущенко Н.Н. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенность их биологического действия / Н.Н. Глущенко, О.А. Богословская, И.П. Ольховская // Нанотехнологии и информационные технологии – технологии XXI века: материалы Международной научно-практической конференции. – М., 2006. – С. 93-95.
2. Губский Ю.И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губский // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т. 8, № 3 – С. 20-27.
3. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е.Е. Дубинина. – СПб.: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
4. Локальные изменения свободнорадикального статуса роговицы при экспериментальной гнойной язве / А.В. Колесников [и др.] // Наука молодых – ERUDITIO JUVENIUM. – 2013. – №1. – С. 26-30.
5. Розонцвет А.О. Аккумуляция меди и ее влияние на метаболизм белков, липидов и фотосинтетических пигментов в листьях *POTAMOGETON PERFOLIATUS L.* / А.О. Розонцвет [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2003. – Т. 5, №2. – С. 305-311.
6. Солейко Е.В. Осложненное течение хронической постинфарктной аневризмы сердца (клинико-морфологические параллели) / Е.В. Солейко, Л.В. Кактурский // Наука молодых – ERUDITIO JUVENIUM. – 2013. – №3. – С. 7-14.
7. Amado R. Dytirosine: in vitro production and characterization / R. Amado, R. Aeschbach, H. Neukom // *Methods Enzymol.* – 1984. – Vol. 107. – P. 377-388.
8. Aust S.D. Role of metals in oxygen radical reactions / S.D. Aust, L.A. Morehouse, C.E. Thomas // *Free Radic. Biol. Med.* – 1985. – Vol. 1, № 1. – P. 3-25.
9. Stadtman E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences / E.R. Stadtman // *Free Radic. Biol. Med.* – 1990. – Vol. 9, № 4. – P. 315-325.
10. Teale F.W.J. Ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution / F.W.J. Teale // *Biochem. J.* – 1960. – Vol. 76, № 2. – P. 381-388.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Теплов С.А. – студент 3 курса лечебного факультета ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

Абаленихина Юлия Владимировна – ст. преп. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

Иванычева Юлия Николаевна – канд. биол. наук, ассист. кафедры общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.