

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Абаленихина Ю.В., Фомина М.А., 2016
УДК 577.1:547.96

**СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ТИРОЗИНА
И ТРИПТОФАНА В УСЛОВИЯХ IN VIVO-МОДУЛИРОВАНИЯ
СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА**

Ю.В. АБАЛЕНИХИНА, М.А. ФОМИНА

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

**STATUS OF TYROSINE AND TRYPTOPHAN OXIDATIVE MODIFICATION
IN CONDITIONS OF IN VIVO MODULATION OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS**

J.V. ABALENIHINA, M.A. FOMINA

Ryazan state medical university, Ryazan, Russia

Изучено влияние модуляторов синтеза оксида азота – L-аргинина и N-нитро-L-аргининметилового эфира на окислительную модификацию тирозина и триптофана в составе белков тимуса и селезенки. Установлено, что под действием L-аргинина окислительная модификация триптофана снижается, а тирозина – не изменяется. В условиях дефицита синтеза оксида азота снижается повреждение остатков тирозина и триптофана.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, тирозин, триптофан, оксид азота.

The influence of nitric oxide modulators – L-arginine and N-nitro-L-arginine methyl ester on oxidative modification of tyrosine and tryptophan in the composition of proteins of the thymus and spleen was studied. It was established that under the effect of L-arginine oxidative modification of tryptophan is reduced and of tyrosine – does not change. Given the lack of nitric oxide, damage to tyrosine and tryptophan residues is reduced.

Keywords: oxidative modification of proteins, tyrosine, tryptophan, nitric oxide.

В связи с тем, что оксид азота способен как индуцировать [3, 5, 15], так и ингибировать окислительные процессы [14] существует две стороны проблемы изучения биологии оксида азота в организме: исследование эффектов избыточной и недостаточной продукции данного вещества [3]. Короткоживущая молекула NO спо-

собна продуцировать активные формы азота (NO^{\cdot} , ONOO^{-}), которые запускают свободно-радикальные реакции, оказывающие деструктивное действие на белковые молекулы.

Особым вариантом окислительной модификации белков является нитрозилирование, индуцируемое оксидом азота [1, 7, 9,

13], сопровождающееся активацией тканевых протеиназ [9]. Наиболее изученным является механизм повреждения ароматических аминокислот. Доказано, что остатки аминокислот тирозина и триптофана чувствительны к повреждению в условиях окислительного стресса благодаря системе разветвленных двойных связей в своей структуре.

При этом важно отметить, что сайт-специфичное нитрозилирование тирозина и триптофана сочетается с изменением функций протеинов и развитием NO-зависимого окислительного стресса (нитрозативного стресса).

Материалы и методы

Работа выполнена на 88 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 граммов, количество особей в каждой группе – 8. Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли в соответствии с правилами, изложенными Международным Советом Медицинских Научных Обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.) и приказе МЗРФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Для моделирования дефицита синтеза оксида азота осуществляли внутрибрюшинное введение неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метилового эфира (L-NAME) в дозе 25 мг/кг [8] и 200 мг/кг [17] в виде физиологического раствора через переднюю брюшную стенку одноразовым пластиковым шприцем с тонкой короткой иглой. Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота (NO) субстратом NO-синтазы, осуществляли путем внутрижелудочного введения раствора L-аргинина на 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [4] через стеклянный градуированный шприц с внутрижелудочным зондом. Для изучения корректирующего действия L-аргинина осуществляли внутрибрюшинное введение L-NAME в указанных дозах с 3-х по 9-е сутки на фоне перорального введения L-аргинина. Животных выводили из экс-

перимента на 10-е сутки. Контрольные группы формировались для каждой серии эксперимента из животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями.

Немедленно после выведения животного из эксперимента из ткани тимуса и селезенки получали чистую цитоплазматическую (неседиментируемую) фракцию, путём двойного ультрацентрифугирования, в которой оценивали окислительную модификацию тирозина и триптофана.

Интенсивность окислительной модификации белков оценивали по степени флуоресценции битирозина и триптофана. Флуоресценцию триптофана регистрировали при длине волны возбуждения λ 295 нм и длина волны испускания λ 340 нм [6], образование битирозина регистрировали при длине возбуждения λ 325 нм и длина волны испускания λ 415 нм [10]. Полученные результаты выражали в единицах флуоресценции, отнесенных на грамм белка.

Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Для вариационных рядов с отсутствием согласия данных с нормальным распределением вычисляли характеристики: медиану (Me), минимальное (min) и максимальное (max) значение, результаты представляли в формате Me [min; max]. Для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест).

Результаты и их обсуждение

Структурные изменения, являющиеся результатом окислительной модификации тирозина и триптофана, проявляются в изменении их флуоресцирующей способности. Так, продукты окисления триптофана (N-формилкинуренин) характеризуется снижением флуоресцирующей способности относительно исходного вещества [14], а окисление тирозина приводит к образованию битирозина, что сопровождается повышением флуоресцирующей активности [10, 11, 12].

В условиях *in vivo*-моделирования дополнительного синтеза оксида азота

ожидаемого накопления битирозина и окисленного триптофана не отмечалось. Полученные результаты показывают (табл. 1, 2), что флуоресценция битирозина не

изменяется, однако повышается для триптофана. Полученный факт может объясняться пространственной недоступностью тирозиновых и триптофановых остатков.

Таблица 1

Изменения флуоресценции битирозина и триптофана селезенки крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота, ед. фл./г белка (Me [min; max])

экспериментальная модель	Флуоресценция битирозина	Флуоресценция триптофана
контроль 1	0,15 [0,14; 0,17]	0,29 [0,26; 0,31]
L-NAME (25 мг/кг)	0,09 [0,08; 0,12]* p=0,045	0,72 [0,69; 0,73]* p=0,018
L-NAME (200 мг/кг)	0,13 [0,12; 0,15]* p=0,02	0,71 [0,62; 0,77]* p=0,008
контроль 2	0,16 [0,13; 0,22]	0,31 [0,29; 0,34]
L-аргинин (500 мг/кг)	0,18 [0,15; 0,20]	0,61 [0,39; 0,74]* p=0,02
контроль 3	0,13 [0,11; 0,19]	0,33 [0,28; 0,36]
L-NAME (25 мг/кг) + L-аргинин (500 мг/кг)	0,14 [0,09; 0,13]	0,73 [0,69; 0,96]* p=0,01
L-NAME (200 мг/кг) + L-аргинин (500 мг/кг)	0,15 [0,10; 0,18]	0,86 [0,79; 1,25]* p=0,008

Примечание: * – статистически значимые отличия относительно группы контроля

Поскольку реакция образования нитротриптофана обратима, то он способен разлагаться, таким образом, низкие концентрации оксида азота способствуют смещению равновесия в сторону немодифицированного триптофана, о чем свидетельствует

увеличение флуоресценции (табл. 1, 2). Незначительный уровень битирозина свидетельствует об отсутствии процессов агрегации, а низкий уровень окисленного триптофана об отсутствии процессов фрагментации белковых молекул.

Таблица 2

Изменения флуоресценции битирозина и триптофана тимуса крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота, ед. фл./г белка (Me [min; max])

экспериментальная модель	Флуоресценция битирозина	Флуоресценция триптофана
контроль 1	0,32 [0,31; 0,38]	0,65 [0,63; 0,75]
L-NAME (25 мг/кг)	0,20 [0,15; 0,25]* p=0,045	1,47 [1,42; 1,53]* p=0,008
L-NAME (200 мг/кг)	0,26 [0,19; 0,32]* p=0,04	1,68 [0,94; 2,17]* p=0,008
контроль 2	0,31 [0,30; 0,35]	0,62 [0,61; 0,69]
L-аргинин (500 мг/кг)	0,34 [0,19; 0,66]	1,43 [0,59; 2,65]* p=0,002
контроль 3	0,34 [0,25; 0,40]	0,61 [0,59; 0,73]
L-NAME (25 мг/кг) + L-аргинин (500 мг/кг)	0,39 [0,11; 0,49] [#] p=0,021	1,59 [0,95; 3,53]* p=0,01
L-NAME (200 мг/кг) + L-аргинин (500 мг/кг)	0,38 [0,17; 0,49] [▲] p=0,03	1,44 [1,38; 1,67]* p=0,008

Примечание: * – статистически значимые отличия относительно группы контроля;

[#] – статистически значимые отличия относительно группы L-NAME (25 мг/кг);

[▲] – статистически значимые отличия относительно группы L-NAME (200 мг/кг).

Процессу нитрозилирования аминокислотных остатков могут помешать функциональные группы аминокислот, которые окружают остатки триптофана в первичной структуре белка.

Выделяют несколько механизмов нитрозилирования тирозиновых остатков белков, а именно: пероксонитритный (классический), пероксидазный (энзиматический) и гем-пероксидазный (неэнзиматический) [16].

Важно отметить, что для нитрозилирования тирозина необходимы следующие условия:

- недостаток остатков цистеина
- отсутствие пространственных преград.

Кроме этого нитрозилирование протеинов в организме животных связано с оксидативным стрессом [2], который, по данным полученных результатов, под действием субстрата синтеза NO не развивается.

Таким образом, моделирование дефицита синтеза оксида азота препятствует образованию битирозина и окисленного триптофана, изменения не зависят от вводимой дозы. L-аргинин не оказывает влияния на изучаемые показатели, но обладает корригирующим действием.

Литература

1. Абаленихина Ю.В. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность и аутопроцессинг катепсина в иммунокомпетентных органах крыс в условиях *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2014. – №1. – С. 53-60.

2. Блюм Я.Б. Нитрувание тирозина как регуляторная посттрансляционная модификация протеинов / Я.Б. Блюм, Ю.А. Красиленко, А.И. Смец // Укр. биохим. журн. – 2009. – Т. 81, № 5. – С. 5-15.

3. Граник В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств: монография / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. – М.: Вузовская книга, 2004. – 360 с.

4. Дорохина Л.В. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-

аргинин-NO системы / Л.В. Дорохина, В.В. Зинчук // Весті НАН РБ. Сер. біял. нав. – 2000. – №4. – С. 87-90.

5. Исследование эндотелио и кардиопротективных эффектов комбинаций основных групп антигипертензивных средств с L-аргинином при экспериментальной эндотелиальной дисфункции/ Т. Г. Покровская [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2008. – №2. – С. 126-131.

6. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина [и др.] // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 3. – С. 413-421.

7. Окислительная модификация белков и изменение активности катепсина L селезенки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота / Ю.В. Абаленихина [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С. 45-49.

8. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота / М.В. Покровский [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т. 71, №2. – С. 29-31.

9. Фомина Н.В. Оценка связи активности лизосо- мальных цистеиновых протеиназ плазмы крови и показателей эндотелиальной дисфункции у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей / Н.В. Фомина, М.А. Фомина // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2014. – №1. – С. 60-68.

10. Amado R. Dityrosine: *in vitro* production and characterization / R. Amado, R. Aeschbach, H. Neukom // Methods Enzymol. – 1984. – Vol. 107. – P. 377-388.

11. Ćolak E. New markers of oxidative damage to macromolecules / E. Ćolak // JMB. – 2008. – P. 1-16.

12. Giulini C. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance / C. Giulini, N.J. Traaseth, K.J. Davies // Amino Acids. – 2003. – №3-4. – P. 227-232.

13. Liang-Jun Y. Protein Redox Modification as a Cellular Defense Mechanism

against Tissue Ischemic Injury / Y. Liang-Jun // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – Vol. 2014. – Article ID 343154. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/343154>

14. Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way / Stephen G. Hummel [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2006. – Vol. 40. – P. 501-506.

15. Nitric Oxide in Cell Survival: A Janus Molecule / Vittorio Calabrese [et al.] //

ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING. – 2009. – Vol. 11, №11. – P. 2717-2739.

16. Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers / Pavel Rossner Jr. [et al.] // *Mutation Research*. – 2007. – Vol. 617. – P. 23-32.

17. Wang Zun-Yi. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation / Zun-Yi Wang, Rolf Hakanson // *British Journal of Pharmacology*. – 1995. – Vol. 116. – P. 2447-2450.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

E-mail: abaleniuhina88@mail.ru

Фомина Мария Алексеевна – к.м.н., доц. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: marya.fom@yandex.ru