

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2016
УДК 577.12:612.35.015.348

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА РАЗЛИЧНОЙ ВЫРАЖЕННОСТИ

С.А. ТЕПЛОВ, Ю.В. АБАЛЕНИХИНА, М.А. ФОМИНА, И.В. МАТВЕЕВА

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

CHANGES IN THE SPECTRUM OF ABSORPTION OF OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN RAT LIVER WITH SHORTAGE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS OF DIFFERENT EXPRESSIONS

S.A. TEPLOV, Y.V. ABALENIHINA, M.A. FOMINA, I.V. MATVEEVA

Ryazan State Medical University, Ryazan

Изучено влияние L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг на окислительную модификацию белков печени крыс. Установлено, что при использовании N-нитро-L-аргининметилового эфира в дозе 25 мг/кг уровень карбонильных производных белков печени крыс увеличивается по сравнению с контролем. Важно отметить, что статистически значимо увеличивается количество альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов в ультрафиолетовой области спектра, что свидетельствует о повреждении остатков аминокислот, обладающих нейтральными свойствами. Под действием L-NAME в дозе 200 мг/кг уровень карбонильных производных белков печени крыс уменьшается по сравнению с контролем, что является следствием снижения синтеза оксида азота. Так же отмечается увеличение резервно-адаптационного потенциала, что указывает на явные адаптационные и регенеративные способности печени.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, L-NAME, печень.

Influence of L-NAME in a dose of 25 and 200 mg/kg on oxidizing modification of proteins of a liver of rats is studied. It is established that when using N-nitro – L-arginine methyl ester in a dose of 25 mg/kg the level of proteins carbonyl derivative of a liver of rats increases in comparison with control. It is important to note that the quantity of aldehyde – and ketone-dinitrophenylhydrazons in ultra-violet area of a range statistically significantly increases that testifies to damage of the remains of the amino acids possessing neutral properties. Under the influence of L-NAME in a dose of 200 mg/kg the level of carbonyl derivative proteins of a liver of rats decreases in comparison with control that is a consequence of reduction of synthesis of nitrogen oxide. Also the increase in reserve and adaptation potential is noted that points to obvious adaptation and regenerative abilities of a liver.

Keywords: oxidative modification of proteins, L-NAME, liver.

Актуальность

Оксид азота является универсальным биологическим месседжером благодаря своим физико-химическим свойствам. Универсальность действия NO проявляется в способности регулировать многие физиологические и патофизиологические процессы [3]. Однако, при рассмотрении конкретного действия отмечается двойственность проявления эффектов, например, оксид азота способен как индуцировать [13], так и замедлять окислительные процессы [11]. N ω -нитро-L-аргинин-метиловый эфир (L-NAME) является неселективным ингибитором индуцибельной NO-синтазы, механизм действия которого основан на конкурентных взаимоотношениях с субстратом за активный центр фермента [2]. Данные изменения происходят в тканях, имеющих специфические эстеразы, такие как: печень, эндотелий [10, 12]. В связи с этим, особый интерес представляет исследование окислительной модификации белков печени в условиях экспериментального ингибирования синтеза оксида азота [5].

Цель исследования

Оценить спонтанную окислительную модификацию и резервно-адаптационный потенциал белков печени крыс под действием L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг

Материалы и методы

Исследование проводили на 24 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 граммов, которые были разделены на контрольную и экспериментальные группы.

Животным экспериментальной группы №1 (n = 8) ежедневно, в течение 7 дней внутрибрюшинно вводили L-NAME дозе 25 мг/кг [9], экспериментальной группы №2 (n=8) – в дозе 200 мг/кг [14].

Животным контрольной группы (n = 8) в те же сроки осуществляли внутрибрюшинное введение физиологического раствора.

Содержание животных в виварии соответствовало «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических

клиник» от 06.04.1993. Все манипуляции с животными, в том числе и выведение 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 животных из эксперимента из ткани печени путём двойного ультрацентрифугирования получали чистую цитоплазматическую (неседиментируемую) фракцию [4].

Окислительную модификацию белков оценивали по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой, после осаждения нуклеиновых кислот 10 %-м раствором стрептомицина сульфата [6].

Оценка спонтанной и металл-зависимой окислительной модификации белков на различных длинах волн поглощения может осуществляться и трактоваться отдельно, однако наибольшую информацию предоставляет параллельное осуществление указанных вариантов с последующим подсчетом отношения результатов измерения продуктов спонтанного окисления к индуцированному по реакции Фентона, принимая результаты индуцированного измерения за 100%, что характеризует резервно-адаптационный потенциал [7].

Карбонильные производные окисленных белков регистрировали на спектрофотометре при следующих длинах волн: 254, 270, 280, 356 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера – АДНФГн), 363 и 370 нм (кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера – КДНФГн), 428 и 430 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера – АДНФГо) и 434, 524, 530, 535 нм (кетон-динитрофенилгидразоны основного характера КДНФГо). Перечисленные длины волн выбраны в соответствии с диапазонами, в которых регистрируются динитрофенилгидразоны [8].

По полученным значениям экстинкций строили спектр поглощения продуктов окислительной модификации белков и подсчитывали площадь под кривой, вы-

раженной в условных единицах на грамм белка (у.е./г белка).

Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест).

Результаты и их обсуждение

Площади под кривой спектра ДНФГ-дериватов окисленных белков печени крыс составили: в контрольной группе – 3,044 [2,515; 3,367]; в экспериментальной группе – 5,740 [4,854; 7,265]. Из полученных данных, следует, что под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг уровень карбонильных производных белков печени увеличивается по сравнению со значениями контрольной группы. Важно отметить, что статистически значимое увеличение наблюдается в ультрафиолетовой области спектра (рис. 1), а именно в диапазонах: 254-356 нм, что соответствует АДНФГн; 363-370 нм, соответствует КДНФГн.

Известно, что существует несколько путей образования карбонильных производных белков, одним из которых является прямое воздействие на аминокислотные остатки боковых цепей белков активных форм кислорода, генерация которых в условиях угнетения синтеза оксида азота(II) может происходить за счет подавления антиоксидантной системы, например, каталазы и α -токоферола. Известно, что перекисное окисление липидов также ин-

гибируется благодаря взаимодействию NO с алкилпероксильными и алкоксильными радикалами. Возможно поэтому под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг образование карбонильных производных может происходить за счет взаимодействия продуктов свободнорадикального окисления липидов с остатками аминокислот в составе белков [6] и металлами переменной валентности [1].

Что же касается L-NAME в дозе 200 мг/кг, то площади под кривой спектра ДНФГ-девириатов окисленных белков печени крыс составили: в контрольной группе – 3,044 [2,515; 3,367]; в экспериментальной группе – 0,659 [0,570; 1,023]. Из полученных данных следует, что под действием L-NAME в дозе 200 мг/кг уровень карбонильных производных белков печени уменьшается по сравнению со значениями контрольной группы. Важно отметить, что статистически значимое уменьшение динитрофенилгидразонов отмечено на длинах волн 230 и 356 нм, что составляет АДНФГн; 363 и 370 нм – КДНФГн; 428 и 430 нм – АДНФГо; 434 и 520 нм – КДНФГо (рис. 1).

Из этого следует, что снижение образование карбонильных производных белков, под действием L-NAME в дозе 200 мг/кг, является, следствием снижения синтеза оксида азота (II).

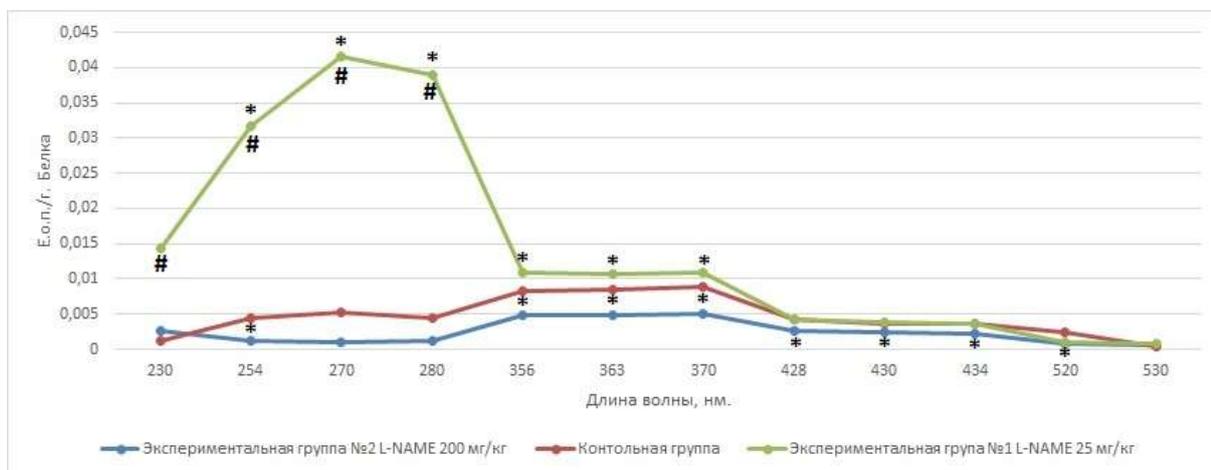


Рис. 1. Спектр поглощения продуктов окислительной модификации белков печени крыс (*- статистически значимые различия от контрольной группы; #- статистически значимые различия экспериментальной группы №1 от экспериментальной группы №2 ($p < 0,05$))

Резервно-адаптационный потенциал отражает возможности какого-либо уровня организации живой структуры (субклеточного, тканевого, органного, системного, целостного организма) приспособляться к постоянно изменяющимся условиям окружающей среды. Чем выше уро-

вень резервно-адаптационного потенциала, тем большие способности имеет организм к нивелированию неблагоприятных воздействий.

Результаты полученные при оценке данного показателя представлены на рисунке 2.



Рис. 2. Резервно-адаптационный потенциал белков печени (*- статистически значимые различия от контрольной группы ($p \leq 0,05$))

Из данных, приведённых на рисунке, следует, что для печени с увеличением дозы L-NAME происходило увеличение резервно-адаптационного потенциала, что объясняется повышенной устойчивостью и адаптацией данного органа к неблагоприятным факторам среды.

Выводы

1. N-нитро- L-аргининметилловый эфир в дозе 25 мг/кг способствует образованию карбонильных производных белков, при этом резервно-адаптационный потенциал печени увеличивается.

2. N-нитро- L-аргининметилловый эфир в дозе 200 мг/кг способствует снижению образования карбонильных производных белков, при этом резервно-адаптационный потенциал не изменяется относительно значений контрольной группы и экспериментальной группы L-NAME 25 мг/кг.

Литература

1. Абаленихина Ю.В. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на актив-

ность 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. Влияние ультрадисперсных порошков меди на окислительную модификацию белков сердца крыс / Ю.В. Абаленихина [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2015. – №1. – С. 18-25.

3. 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.

4. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В.И. Лушак // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 8. – С. 995-1017.

5. Окислительная модификация белков и изменение активности катепсинаL 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.

6. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.

7. Фомина М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина; ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава. – Рязань: РИО РязГМУ, 2014. – 60 с.

8. Характеристика продуктов окислительного повреждения белков миокарда на фоне гипергомоцистеинемии / И.С. Ильичева, М.А. Фомина, Д.В. Медведев // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2014. – №4. – С. 37-44.

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

10. Direct and Indirect Antioxidant Effects of Nitric Oxide: Radically / LaskinJ.D. [et al.] // Antioxidants & Redoxsignaling. – 2001. – №3. – P. 261-271.

11. Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / T. Nyström // The EMBO Journal. – 2005. – Vol. 24. – P. 1311-1317.

12. Scibior, D. Arginine – metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czczot // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2004. – Vol. 58. – P. 321-332.

13. Teale F.W.J. Ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution / F.W.J. Teale // Biochem. J. – 1960. – Vol. 76, № 2. – P. 381-388.

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Теплов Семён Александрович – студент 4 курса, 1 группы, лечебного факультета ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: 555lion5345@rambler.ru

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

E-mail: abalenihiina88@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

Матвеева Ирина Васильевна – к.м.н., зав. кафедрой биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: bxmatveeva@mail.ru