

УДК 577.12: 612.438

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ТИМУСА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕДИ В УЛЬТРАДИСПЕРСНОЙ ФОРМЕ

Абаленихина Ю.В., Фомина М.А., Чурилов Г.И., Иванычева Ю.Н.

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России», Рязань, e-mail: abalenihtina88@mail.ru

Изучено влияние ультрадисперсных порошков меди в дозе  $10^{-4}$  мг/кг и 1 мг/кг на окислительную модификацию белков тимуса крыс. Установлено, что в условиях данной модели дозозависимо повышается окислительная модификация протеинов с преобладанием процессов фрагментации белковых молекул. Согласно полученным данным соотношение альдегид-динитрофенилгидразонов и кетон-динитрофенилгидразонов зависит от изменения уровня свободной меди в организме в сторону преобладания первичных маркеров окислительного стресса. Воздействие меди в ультрадисперсной форме сопровождается сайт-специфическим окислительным повреждением белков в области остатков триптофана. Глубокие окислительные повреждения белков в условиях данной модели способствуют снижению возможности обновления белков ткани тимуса, что, вероятно, связано со снижением активности клеточных протеазных систем.

**Ключевые слова:** окислительная модификация белков, тимус, ультрадисперсные порошки меди

## OXIDATIVE PROTEIN MODIFICATION RATS THYMUS UNDER THE INFLUENCE OF COPPER IN ULTRAFINE FORM

Abalenihtina Y.V., Fomina M.A., Churilov G.I., Ivanycheva Y.N.

Ryazan State Ivan Petrovich Pavlov Medical University, Ryazan, e-mail: abalenihtina88@mail.ru

The effect of ultrafine powders of copper at a dose of  $10^{-4}$  mg/kg and 1 mg/kg on the oxidative modification of proteins of the rats thymus. Found that in this model, a dose-dependent increased oxidative modification of proteins with a predominance of fragmentation processes of protein molecules. According to the data, the ratio of the aldehyde-dinitrophenylhydrazone and ketone-dinitrophenylhydrazone depends on changes in the level of free copper in the organism, the predominance of the primary markers of oxidative stress. The impact of copper in the form of ultra accompanied by site-specific oxidative damage of proteins in the tryptophan residues. Deep oxidative damage to proteins in this model help reduce the possibility of updating thymus tissue proteins that are likely associated with reduced protease activity of cellular systems.

**Keywords:** oxidative modification of proteins, thymus, ultrafine powders of copper

Новым направлением в современной науке стало исследование окислительной модификации белков (ОМБ) при патологических и адаптационных процессах. На сегодняшний день ОМБ признана одним из наиболее ранних и стабильных показателей поражения различных тканей организма при свободно-радикальной патологии [5, 6, 11].

Многочисленные экспериментальные исследования посвящены изучению окисления белков за счет  $\text{OH}^{\bullet}$ , который может образовываться при участии металлов переменной валентности [10, 12]. В настоящее время металл-катализируемое окисление рассматривается как посттранскрипционная окислительная модификация белков, которая может играть важную роль в тканях при физиологических условиях и при различных патологических состояниях. Окисление аминокислотных остатков происходит в присутствии металлов переменной валентности (железо, медь), кислорода и  $\text{H}_2\text{O}_2$  и затрагивает ту часть белковой молекулы, которая участвует в связывании металла [3].

Вышеперечисленные факты дают основание рассматривать ионы меди в качестве индукторов ОМБ. В свете данной проблемы 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], именно поэтому вызывает интерес изучение влияния УДПМ меди на биохимические показатели.

**Цель представленного исследования:** изучить окислительную модификацию белков тимуса крыс в условиях применения нанопорошков меди как модулятора биохимических процессов.

### Материалы и методы исследования

Исследование проводили на 18 конвенциональных крысах-самках линии Wistar массой 280–320 г.

Животным экспериментальных групп в течение 14 дней перорально вводили УДПМ меди (размер частиц 10–15 нм): группе 1 ( $n = 6$ ) в дозе  $10^{-4}$  мг/кг, а 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. 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 животного из эксперимента ткань тимуса помещали в холодный 0,25 М раствор сахарозы в соотношении 1/100 и гомогенизировали в течение 40 с при 900 об/мин в гомогенизаторе Potter S. Описанные процедуры проводили при температуре не выше 4°C.

Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали 15 мин при 14000 g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант – дополнительно при 20000 g в течение 30 мин для получения чистой цитоплазматической (неседиментируемой) фракции, в которой и определяли окислительную модификацию белков.

Окислительную модификацию белков оценивали по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [3] после осаждения нуклеиновых кислот 10%-м раствором стрептомицина сульфата. Оптическую плотность альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 при следующих длинах волн: 356 и 430 нм (АДНФГ), 370 и 530 нм (КДНФГ) [4, 8]. Степень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 г ткани.

Содержание битирозина и окисленного триптофана определяли флуориметрическим методом. Окислительная модификация тирозиновых остатков белков измерялась по образованию битирозина, который обладает характерной флуоресценцией [9]. Окисление триптофановых остатков сопровождается снижением флуоресценции, характерной для триптофана [14].

Статистический анализ данных проводили по U-критерию Манна–Уитни.

### Результаты исследования и их обсуждение

Окислительная деструкция белков является одним из признаков окислительного стресса. Уровень продукции карбонильных производных в тимусе крыс эксперимен-

тальных групп был сопоставим и превышал соответствующие значения спонтанной окислительной модификации белков интактной группы животных.

Важно отметить, что статистически значимое дозозависимое увеличение динитрофенилгидразонов при  $\lambda = 430$  и 530 нм для обеих экспериментальных групп, что свидетельствует о преимущественном образовании динитрофенилгидразонов основного характера. На длине волны 356 нм статистически значимые различия имеются для группы животных, которым вводили УДП меди в дозе 1 мг/кг, данный факт свидетельствует о преобладании образования альдегидных форм.

В ранних стадиях окислительного стресса преобладают АДНФГ (маркеры фрагментации белков), в поздних – КДНФГ (маркеры агрегации белков) [2, 8]. Из приведенных результатов следует, что в контрольной группе незначительно преобладают вторичные маркеры окислительного стресса. Тот факт, что в модифицированных группах белков выявлено преобладание АДНФГ над КДНФГ при введении УДП меди как в дозе  $10^{-4}$  мг/кг, так и в дозе 1 мг/кг, свидетельствует о том, что при данных дозировках процесс окислительного стресса не переходит в развитую стадию и носит обратимый характер. Также следует отметить, что преобладание альдегидных форм может свидетельствовать о наличии процесса фрагментации белков с образованием низкомолекулярных фрагментов.

Примером результата фрагментации в условиях данной модели служат конечные продукты разрыва пятичленной структуры индольного кольца триптофана в результате его гидроксирования. Об этом процессе свидетельствует прямая достоверная зависимость между вводимой дозой меди в ультрадисперсной форме и резким снижением флуоресценции триптофановых остатков (таблица).

Показатели окислительной модификации белков в гомогенате тимуса крыс контрольной и экспериментальных групп ( $M \pm s$ )

Показатель	Контроль (n = 6)	Группа 1 (n = 6)	Группа 2 (n = 6)
<i>Карбонильные производные белков (е.о.п. на 1 г ткани), спонтанная ОМБ</i>			
$\lambda = 356$ нм	2,402 ± 0,714	3,406 ± 0,952	4,093 ± 0,818*
$\lambda = 370$ нм	2,466 ± 0,362	2,456 ± 0,443	3,063 ± 0,958
$\lambda = 430$ нм	0,673 ± 0,058	1,678 ± 0,198*	2,990 ± 0,078*▲
$\lambda = 530$ нм	0,712 ± 0,02	0,839 ± 0,099*	2,406 ± 0,903*▲
Битирозин, интенсивность флуоресценции, ед. на 1 г ткани	5,36 ± 1,61	3,34 ± 0,59	3,69 ± 0,48
Триптофан, интенсивность флуоресценции, ед. на 1 г ткани	12,84 ± 3,19	5,70 ± 0,29*	4,24 ± 0,51*▲

Примечание: \* – статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ );  
▲ – статистически значимые отличия от группы 1 ( $p < 0,05$ ).

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 тимуса высокая концентрация практически нерепарируемых стабильных модификаций триптофана в белках, сопровождающееся выраженными и достоверными изменениями их флуоресценции.

Образование битиروزина в экспериментальных условиях незначительно снижалось (см. таблицу). Представленный факт подтверждает литературные данные о том, что ароматические аминокислоты редко входят в состав металл-связывающей поверхности белков, поэтому они меньше подвергаются воздействию металл-катализируемого окисления [13]. Кроме этого, незначительный уровень битиروزина свиде-

тельствует об отсутствии процессов агрегации и преобладании фрагментации белков.

Таким образом, можно говорить о напряжении процессов окислительной деструкции белков в тимусе крыс под влиянием меди в ультрадисперсном состоянии. Все это сопровождается изменениями интенсивности обменных процессов организма и, следовательно, отражается на возможности обновления белков тканей.

Оценка резервно-адаптационного потенциала производилась путем подсчета соотношения количества карбонильных производных белков при спонтанном и металл-катализируемом окислении протеинов. Полученную величину АДНФГинд. и КДНФГинд. принимали за 100%, т.е. за максимально возможное значение для данной группы животных. Рассчитывали процентное соотношение для АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера [7]. График зависимости полученных значений от вводимой дозы УДП меди представлен на рис. 1, 2.

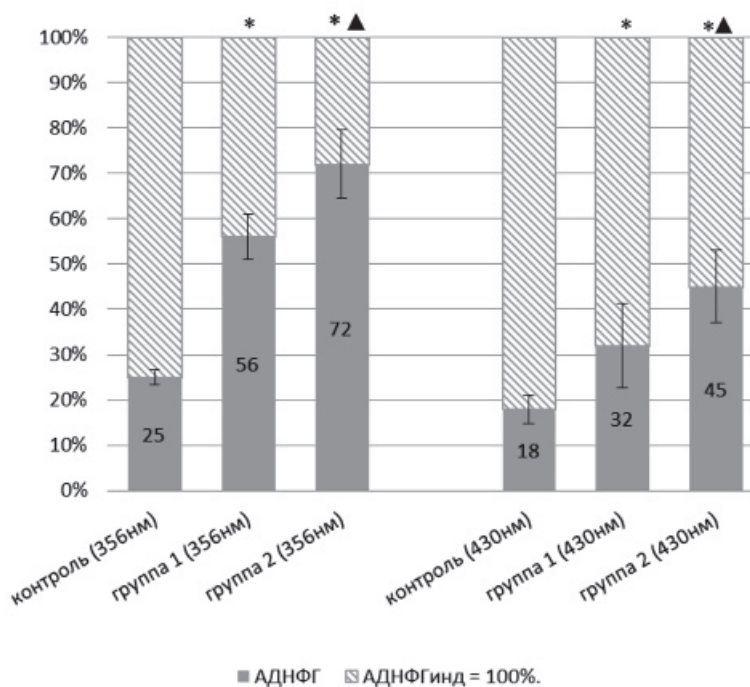


Рис. 1. Отношение значений альдегид-динитрофенилгидразонов, полученных при спонтанном окислении, к значениям, полученным при индуцированном окислении белка:  
 \* – статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ );  
 ▲ – статистически значимые отличия от группы 1 ( $p < 0,05$ )

Из представленных рис. 1, 2 следует, что для АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера наблюдается одинаковая тенденция: достоверное увеличение соотношения относительно контрольной группы животных по мере увеличения вводимой дозы порошков меди в ультрадисперсной форме, при этом

между экспериментальными группами также имеются статистически значимые различия. Следовательно, введение УДП меди дозозависимо приводит к накоплению модифицированных форм белков, что может иметь результатом истощение резервно-адаптационных возможностей клетки. Полученная зависимость отражает

снижение возможности обновления белков ткани тимуса, что приводит к накоплению поврежденных, имеющих слабую функци-

ональную активность белков, либо связано со снижением активности клеточных протеазных систем.

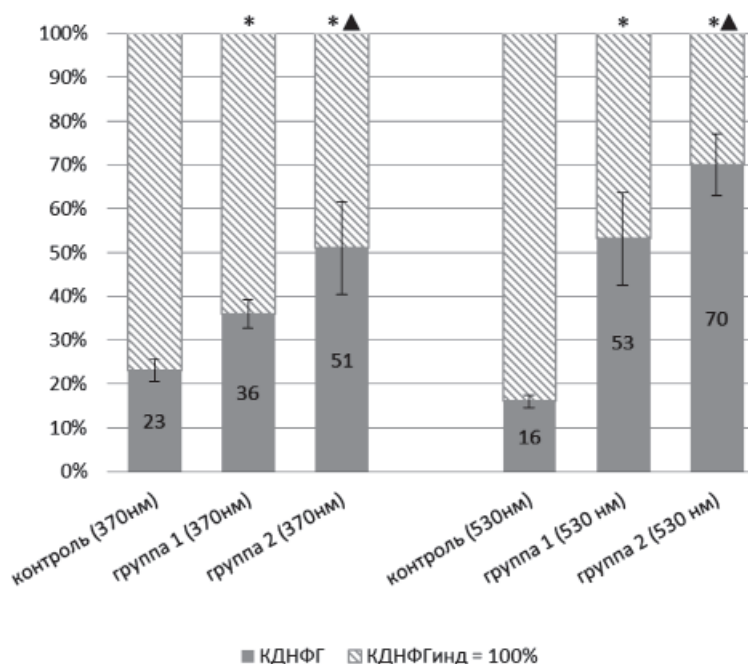


Рис. 2. Отношение значений кетон-динитрофенилгидразонов, полученных при спонтанном окислении, к значениям, полученным при индуцированном окислении белка:  
\* – статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ );  
▲ – статистически значимые отличия от группы 1 ( $p < 0,05$ )

Таким образом, изучив показатели окислительной модификации белков тимуса крыс, мы пришли к выводу, что пероральное введение УДП меди в дозе  $10^{-4}$  мг/кг и 1 мг/кг вызывает дозозависимое повышение образования динитрофенилгидразонов преимущественно основного характера. Согласно нашим данным соотношение АДНФГ и КДНФГ зависит от изменения уровня свободной меди в организме в сторону преобладания первичных маркеров окислительного стресса (АДНФГ). В целом патологическое влияние УДП меди в условиях данной экспериментальной модели связано с образованием окисленных форм триптофана, преобладанием процессов фрагментации белковых молекул, результатом чего является изменение физико-химического состояния белков, нарушение их функций, что в конечном итоге способствует истощению резервно-адаптационных возможностей обновления белков тимуса.

#### Список литературы

1. Глущенко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенность их биологического действия // Нанотехноло-

гии 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 // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т. 8, № 3 – С. 20–27.

3. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. – СПб.: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.

4. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Метод её определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Порогов // Вопросы мед. химии. – Т. 41, № 1. – 1995. – С. 24–26.

5. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: МАИК, 2001. – 343 с.

6. Муравлева Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74–78.

7. Никитина Ю.В., Мухина И.В. Изменение окислительных процессов в ткани головного мозга в раннем онтогенезе // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2009. – № 6(1). – С. 124–131.

8. Толочко З.С., Спиридонов В.К. Окислительная модификация белков в крови крыс при повреждении капсаициночувствительных нервов и изменении уровня оксида азота // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 1. – С. 77–84.

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

10. Aust S.D., Morehouse L.A., Thomas C.E. Role of metals in oxygen radical reactions // *Free Radic. Biol. Med.* – 1985. – Vol. 1, № 1. – P. 3–25.

11. Dalle-Donne I. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clinica Chimica Acta.* – 2003. – № 329. – P. 23–38.

12. Stadtman E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences // *Free Radic. Biol. Med.* – 1990. – Vol. 9, № 4. – P. 315–325.

13. Stadtman E.R. Role of oxidized amino acid in protein breakdown and stability // *Methods in Enzymol.* – 1995. – Vol. 258. – P. 379–393.

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

### References

1. Glushchenko N.N., Bogoslovskaja O.A., Ol'hovskaja I.P. Sravnitel'naja toksichnost' solej i nanochastic metallov i osobennost' ih biologicheskogo dejstvija // *Nanotehnologii i informacionnye tehnologii – tehnologii XXI veka: materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii. M., 2006.* pp. 93–95.

2. Gubskij Ju.I. Toksikologicheskie posledstvija oksislitel'noj modifikacii belkov pri razlichnyh patologicheskikh sostojanijah // *Sovremennye problemy toksikologii.* 2005. T. 8, no. 3 pp. 20–27.

3. Dubinina E.E. Produkty metabolizma kisloroda v funkcional'noj aktivnosti kletok. – SPb.: Medicinskaja pressa, 2006. 400 p.

4. Okislitel'naja modifikacija belkov syvorotki krovi cheloveka. Metod ejo opredelenija / E.E. Dubinina, S.O. Burmistrov, D.A. Hodov, I.G. Porotov // *Voprosy med. himii.* T. 41, no. 1. 1995. pp. 24–26.

5. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shhikova E.B. Okislitel'nyj stress: biokhimicheskij i patofiziologicheskij aspekt. M.: MAIK, 2001. 343 p.

6. Muravleva L.E. Okislitel'naja modifikacija belkov: problemy i perspektivy issledovanija // *Fundamental'nye issledovanija.* 2010. no. 1. pp. 74–78.

7. Nikitina Ju.V., Muhina I.V. Izmenenie oksislitel'nyh processov v tkani golovnogogo mozga v rannem ontogeneze // *Vestnik*

*Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo.* 2009. no. 6(1). pp. 124–131.

8. Tolochko Z.S., Spiridonov V.K. Okislitel'naja modifikacija belkov v krovi krys pri povrezhdenii kapsaicin-chuvstvitel'nyh nervov i izmenenii urovnja oksida azota // *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2010. T. 96, no. 1. pp. 77–84.

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

10. Aust S.D., Morehouse L.A., Thomas C.E. Role of metals in oxygen radical reactions // *Free Radic. Biol. Med.* 1985. Vol. 1, no. 1. pp. 3–25.

11. Dalle-Donne I. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clinica Chimica Acta.* 2003. no. 329. pp. 23–38.

12. Stadtman E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences // *Free Radic. Biol. Med.* 1990. Vol. 9, no. 4. P. 315–325.

13. Stadtman E.R. Role of oxidized amino acid in protein breakdown and stability // *Methods in Enzymol.* 1995. Vol. 258. pp. 379–393.

14. Teale F.W.J. Ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution // *Biochem. J.* 1960. Vol. 76, no. 2 pp. 381–388.

### Рецензенты:

Емельянова А.С., д.б.н., профессор кафедры технологии производства и переработки продукции животноводства ФГБОУ ВПО «Рязанский государственный агротехнический университет имени П.А. Костычева», г. Рязань;

Мажайский Ю.А., д.с.-х.н., профессор, главный научный сотрудник Государственного научного учреждения «Всероссийский НИИ гидротехники и мелиорации имени А.Н. Костякова», Мещерский филиал, г. Рязань.

Работа поступила в редакцию 07.12.2012.