

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ  
МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ  
ТИМУСА КРЫС В УСЛОВИЯХ  
*IN VIVO* И *IN VITRO*  
МОДЕЛИРОВАННОМ ДЕФИЦИТЕ  
СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА (II)**

Ассистент кафедры биологической химии с  
курсом КЛД ФДПО РязГМУ им. И.П. Павлова:

**Абаленихина Юлия Владимировна**

Научный руководитель: к.м.н., доцент

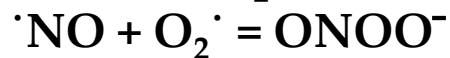
**Фомина Мария Алексеевна**

# Актуальность исследования

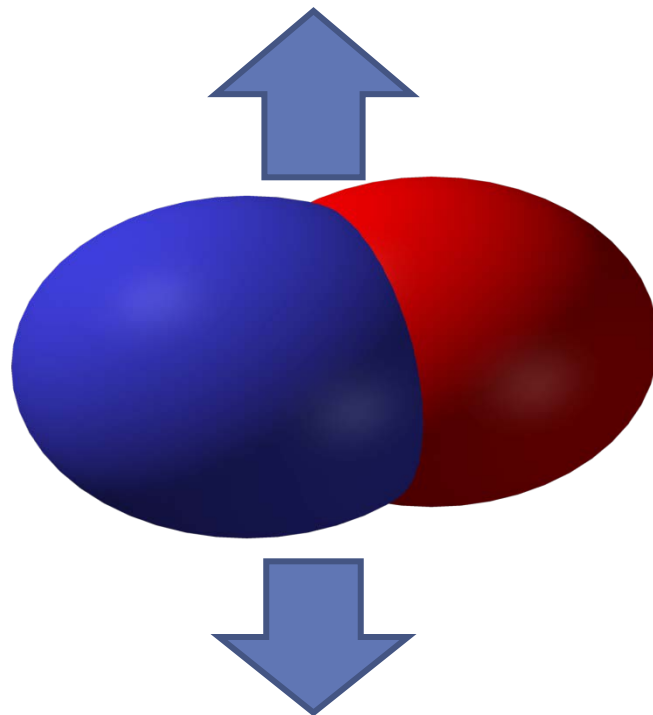
- Белки являются главными мишенями для активных форм кислорода и азота из-за своей высокой чувствительности к свободным радикалам (Ќolak E., 2008) и распространенности в биологических материалах (Hawkins C.L., Morgan P.E., Davies M.J., 2009; Hummel S.G., 2006), а также они ответственны за большинство функциональных процессов клетки, вследствие чего их окислительная модификация представляет значительный интерес.

# ПРООКСИДАНТ

Образование пероксонитрита



(Szabó C., Ischiropoulo H., Radi R., 2007)



Образование динитрозильных комплексов железа

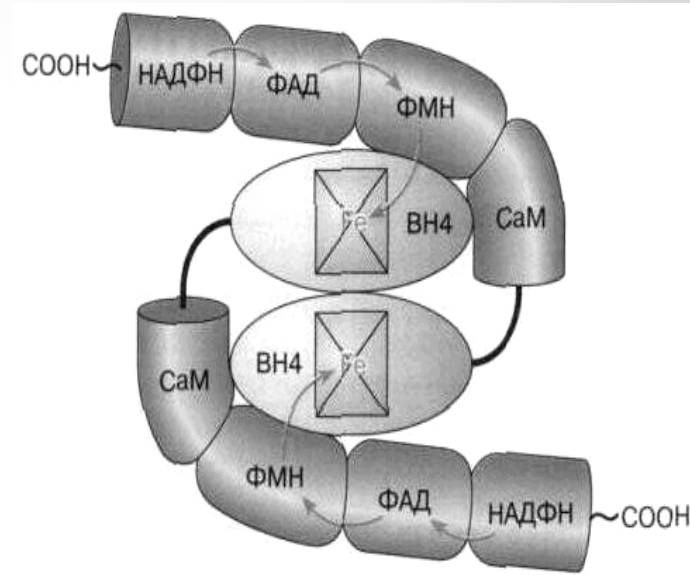
(Шумаев К.Б., 2010);

NO замедляет перекисное окисление липидов

(Hummel S.G., 2006 )

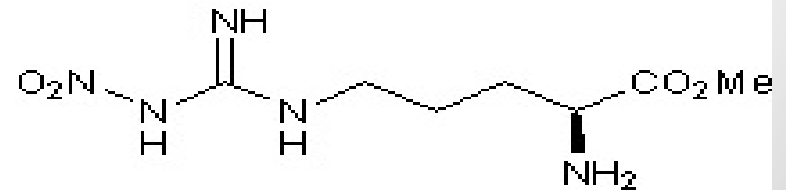
# АНТИОКСИДАНТ

Доказанным фактом является то, что индуцибельная NO-синтаза образуется в кортикомедулярном слое тимуса, в свою очередь нейрональная NO-синтаза активно образуется в корковом слое тимуса (Aiello S., 2000; Титова И.В. 2002).



Схематическое представление строения NO-синтазы (по А.А.Сосунову, 2000)

Одним из антагонистов синтеза оксида азота является N-нитро-L-аргининметилловый эфир (L-NAME), представляющий собой неселективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы (Граник В.Г., Григорьев Н.Б., 2004)



# Цель исследования - изучить влияние N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) на окислительную модификацию белков в условиях *in vivo* и *in vitro*.

## Задачи исследования:

- Провести комплексную оценку продуктов спонтанной окислительной модификации белков тимуса крыс под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг *in vivo* и 5 mM L-NAME *in vitro*.
- Определить глубину окислительного повреждения белков по концентрации стабильных модификаций триптофана и тирозина в белках.
- Оценить резервно-адаптационный потенциал клеток тимуса, используя показатель окислительной модификации белков, индуцируемой по реакции Фентона.

# Дизайн исследования

## Экспериментальный блок



Влияние L-NAME на окислительную модификацию белков *in vivo*



Объект исследования тимус крыс



Контрольная группа: крысы-самцы линии Wistar  
Внутрибрюшинное введение физиологического раствора (n=8)



Экспериментальная группа крыс-самцов линии Wistar (n=8),  
внутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней  
(Покровский М.В., 2008)

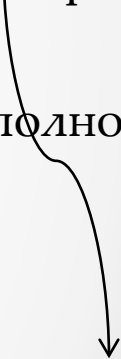
Влияние L-NAME на окислительную модификацию белков *in vitro*



Объект исследования тимоциты крыс



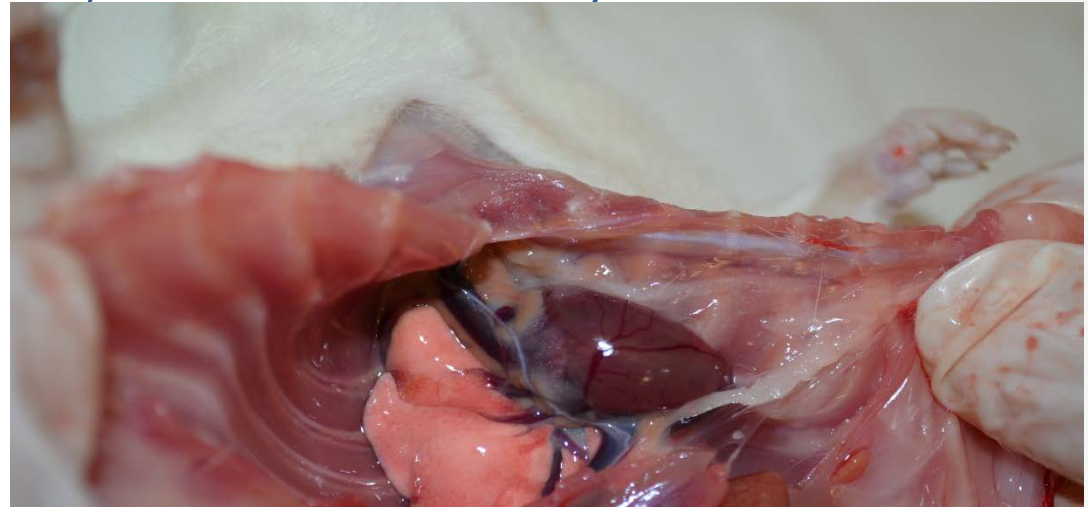
Тимоциты, инкубированные в полной питательной среде RPMI-1640 в течение 24 часов при t=37 (n=8)



Тимоциты (n=8), инкубированные в полной питательной среде RPMI-1640 с 5мМ L-NAME в течение 24 часов при t=37 (Стариков Ю.В., 2008)

# Приготовление гомогената тимуса

Крыс эвтанировали, извлекали тимус.



Тимус помещали в 0,25 М раствор сахарозы, очищали и взвешивали на электронных весах.



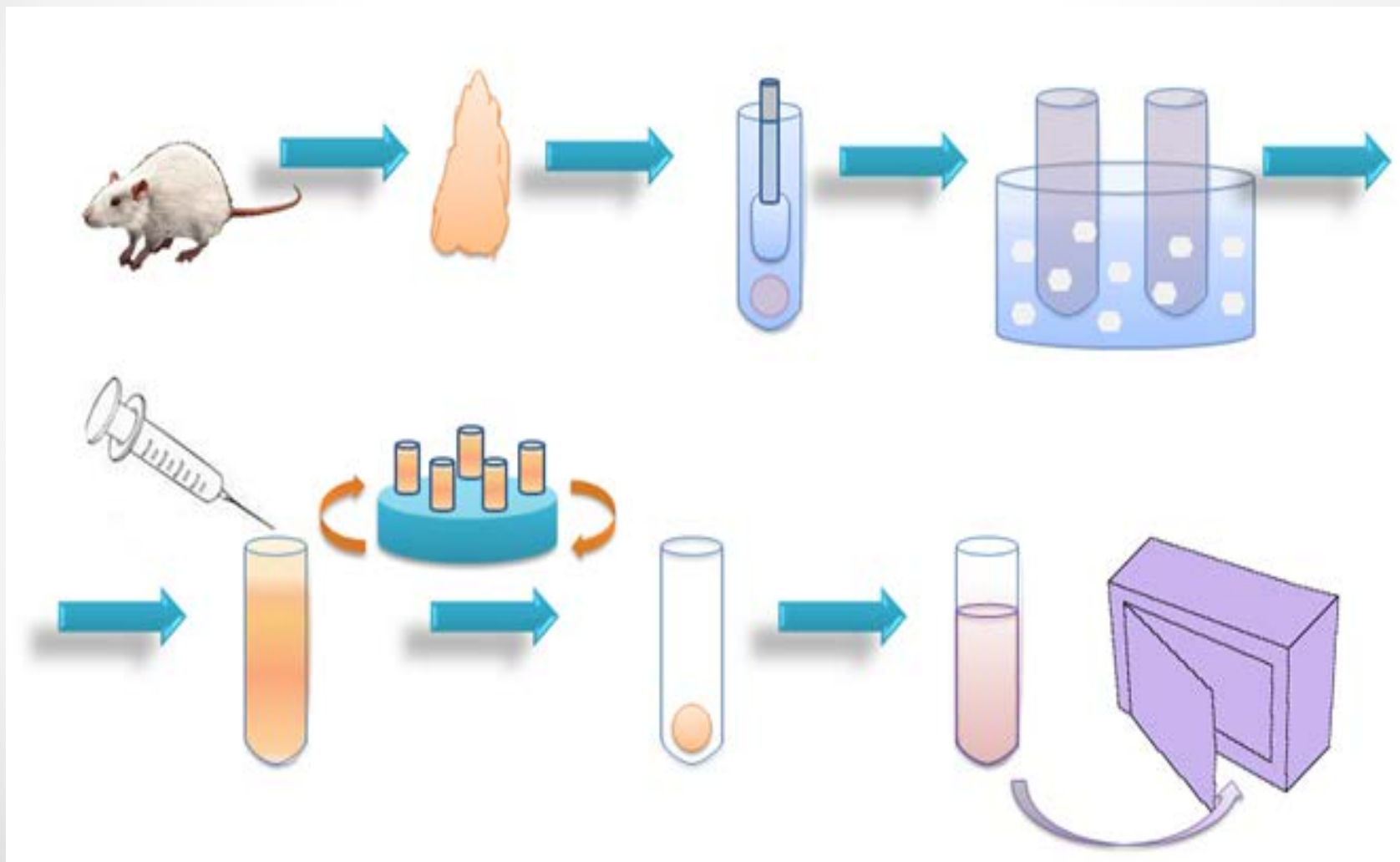
Гомогенизация тимуса в 0,25 М  
растворе сахарозы в гомогенизаторе  
Potter S  
40 секунд при 900 об/мин.



Из полученного гомогената  
ультрацентрифугированием удаляли  
органеллы клетки.  
Конечный супернатант представлял  
собой неседиментированную  
фракцию, в которой определяли  
окислительную модификацию белков.



# Выделение тимоцитов для инкубации (Лепихова Т.Н., 2001)



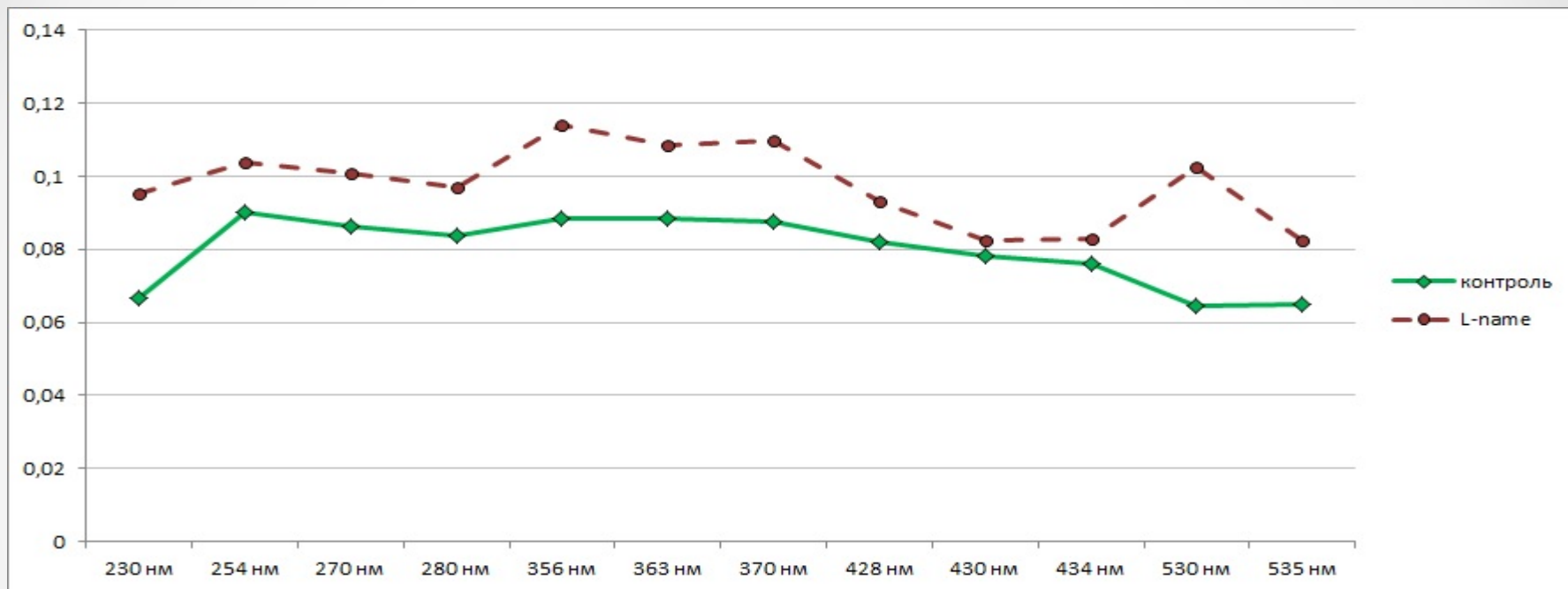
# Методы исследования

- Окислительную модификацию белков оценивали по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой , после осаждения нуклеиновых кислот 10%-ным раствором стрептомицина сульфата (Дубинина Е.Е., 2004)
- Содержание оксида азота определяли спектрофотометрией в видимой области спектра по реакции с реактивом Грисса (Метельская В.А., 2005)
- Окислительная модификация тирозиновых остатков белков измерялась по образованию битирозина, который обладает характерной флуоресценцией (Amado R., Aeschbach R., Neukom H., 1984)
- Окисление триптофановых остатков сопровождается снижением флуоресценции, характерной для триптофана (Teale F.W.J., 1960)
- Оценка резервно-адаптационного потенциала производилась путем подсчета соотношения количества карбонильных производных белков при спонтанном окислении протеинов к индуцированному по реакции Фентона (Никитина Ю.В., Мухина И.В. , 2009)

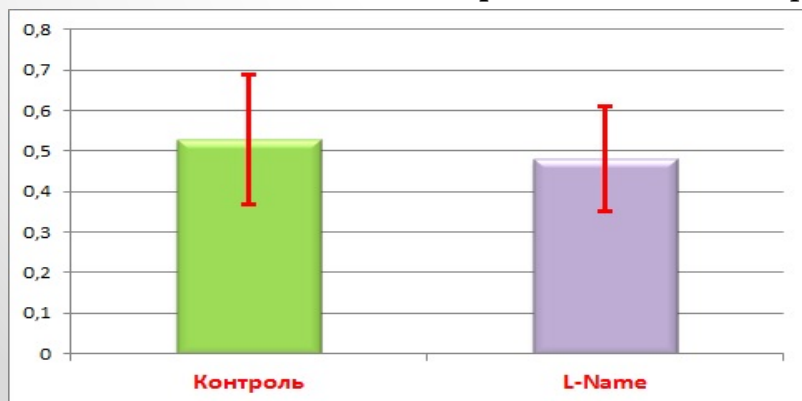
## Статистическая обработка результатов

Непараметрический метод - критерий Манна-Уитни

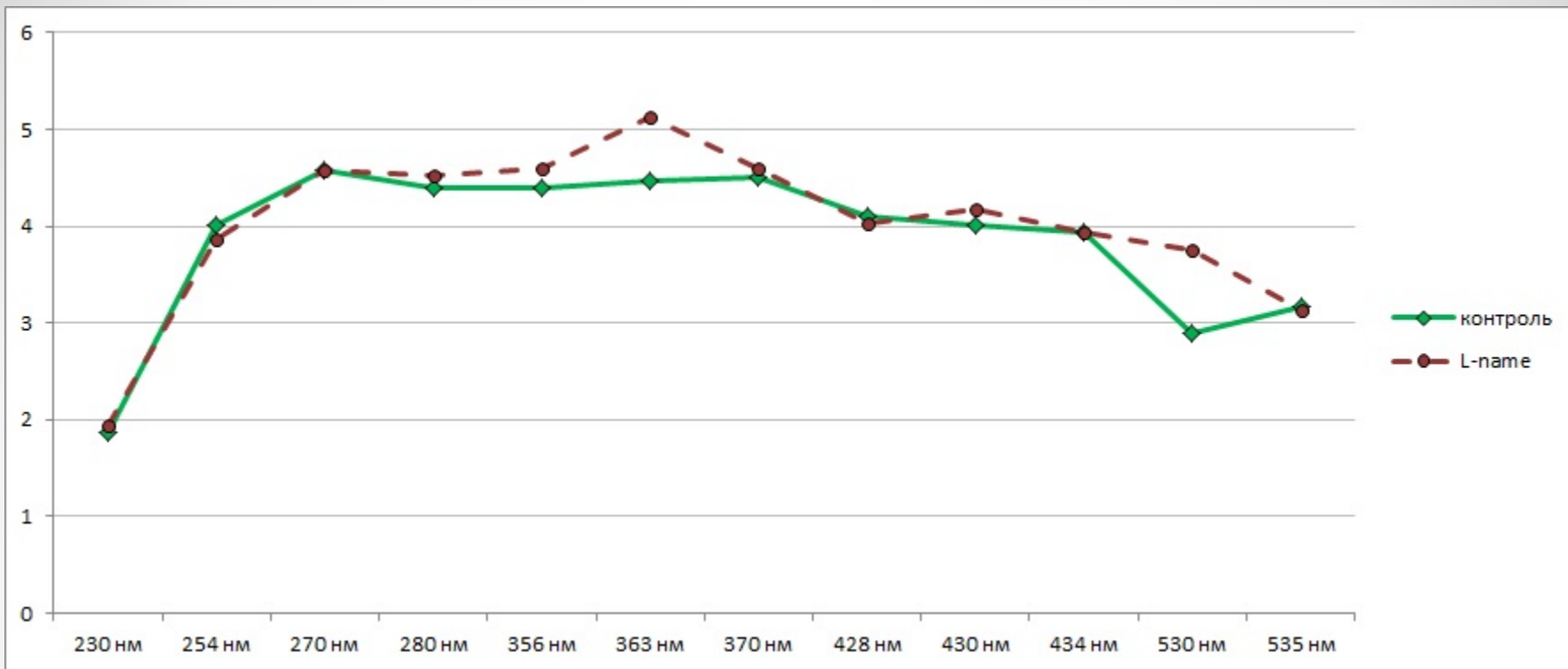
# Влияние L-NAME на спектр окислительной модификации белков тимуса крыс *in vivo*



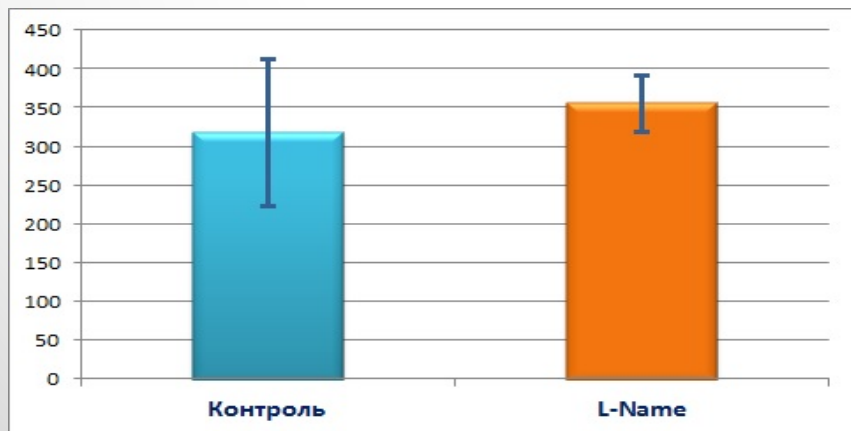
Окислительная модификация белка выражена в единицах оптической плотности на грамм белка



Количество белка (г/л) в контрольной и экспериментальной группе не изменяется

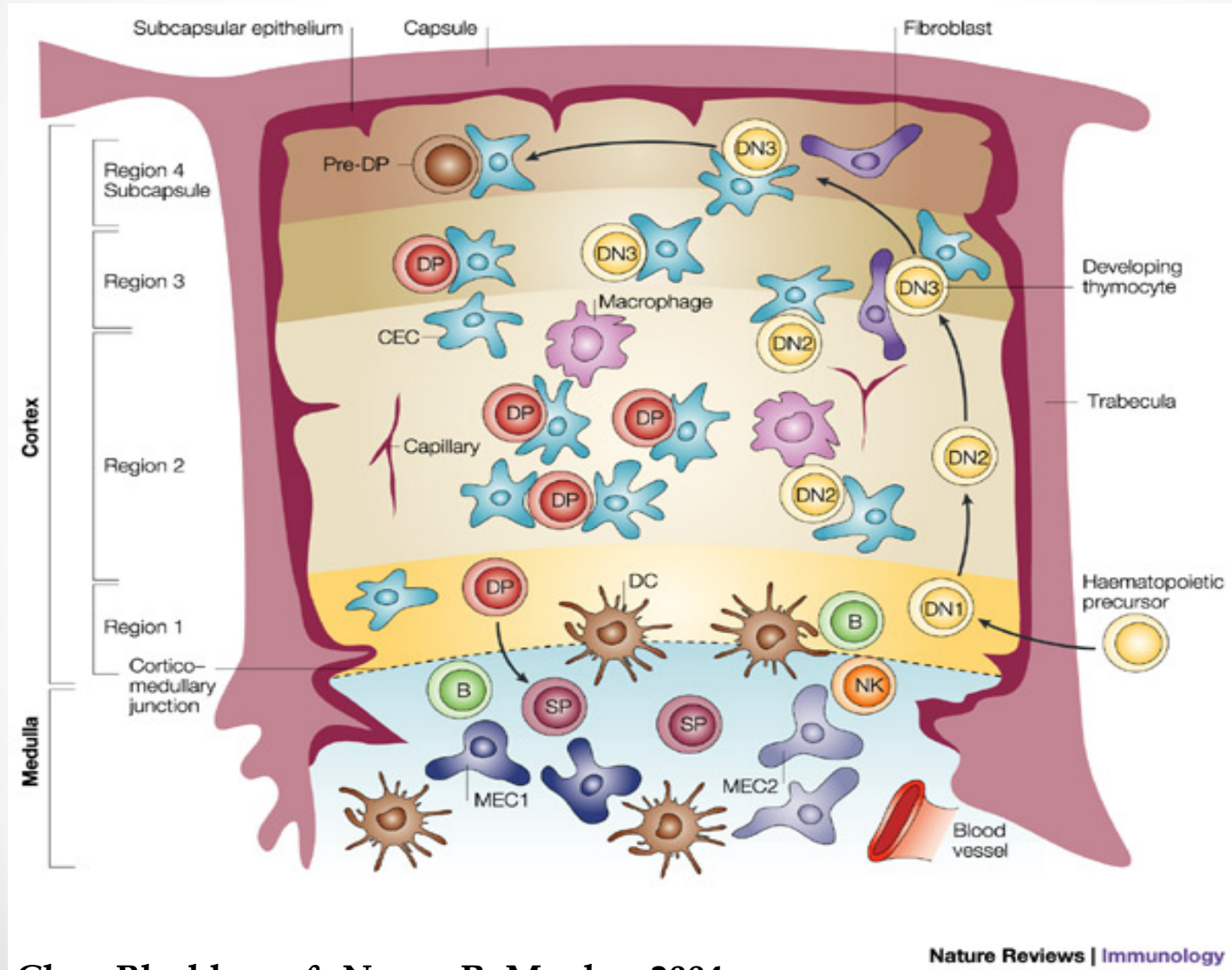


Окислительная модификация белка выражена в единицах оптической плотности на грамм ткани

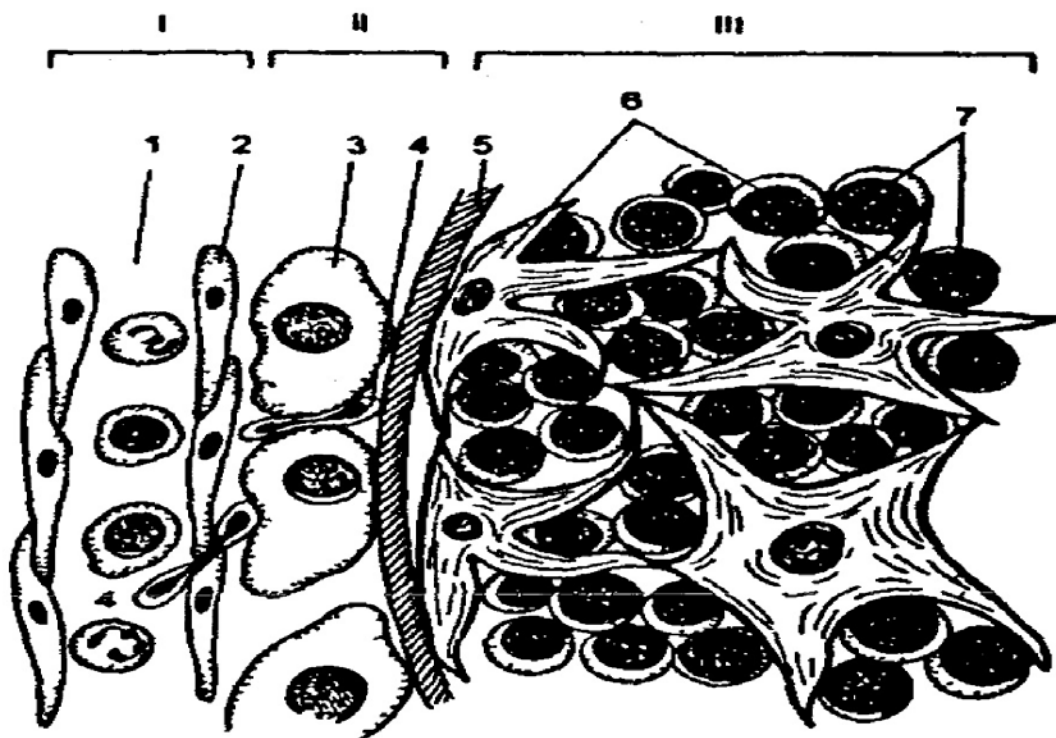


Масса тимуса (мг) в контрольной и экспериментальной группах статистически значимо не отличается

Зрелый тимус снаружи покрыт соединительнотканной капсулой, от которой отходят септы и разделяющих тимус на дольки.



Между сосудистым руслом и эпителиальным пространством тимуса имеется гематотимический барьер, который образован тремя клеточными слоями: эндотелием сосудов, окружающими их макрофагами и наружной эпителиальной выстилкой внутритимусного компартмента. Гематотимический барьер, препятствуя свободному обмену между кровью и корой тимуса(Полякова В.О., 2003)



Гематотимический барьер

I - кровеносный сосуд, II - периваскулярное пространство, III - «эпителиальное» («внутреннее») пространство тимуса, 1 - сосуд, 2 - эндотелиальная клетка, 3 - макрофаг, 4 - мигрирующие лимфоидные клетки, 5 - базальная мембрана, 6 - эпителиальные клетки, 7 - тимоциты

# Влияние L-NAME на концентрацию оксида азота (мкМ) в тимусе крыс *in vivo*

Контрольная группа 85,33 [62,34; 160,17]

Экспериментальная группа 81,31 [60,05; 102,07]  
(L-NAME 25 мг/кг)

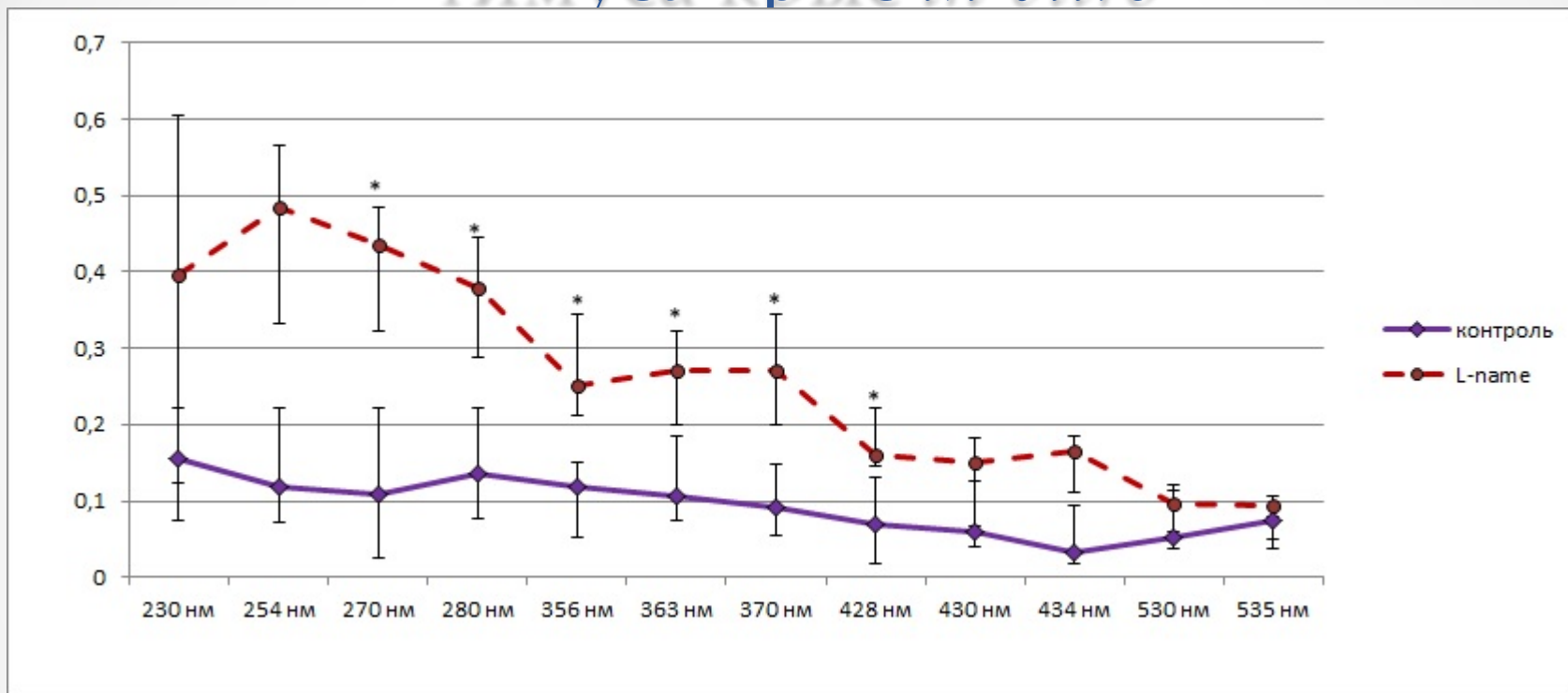
# Влияние L-NAME на концентрацию оксида азота (мкМ) в тимоцитах крыс *in vitro*

Контрольная группа 24,98 [20,3; 32,6]

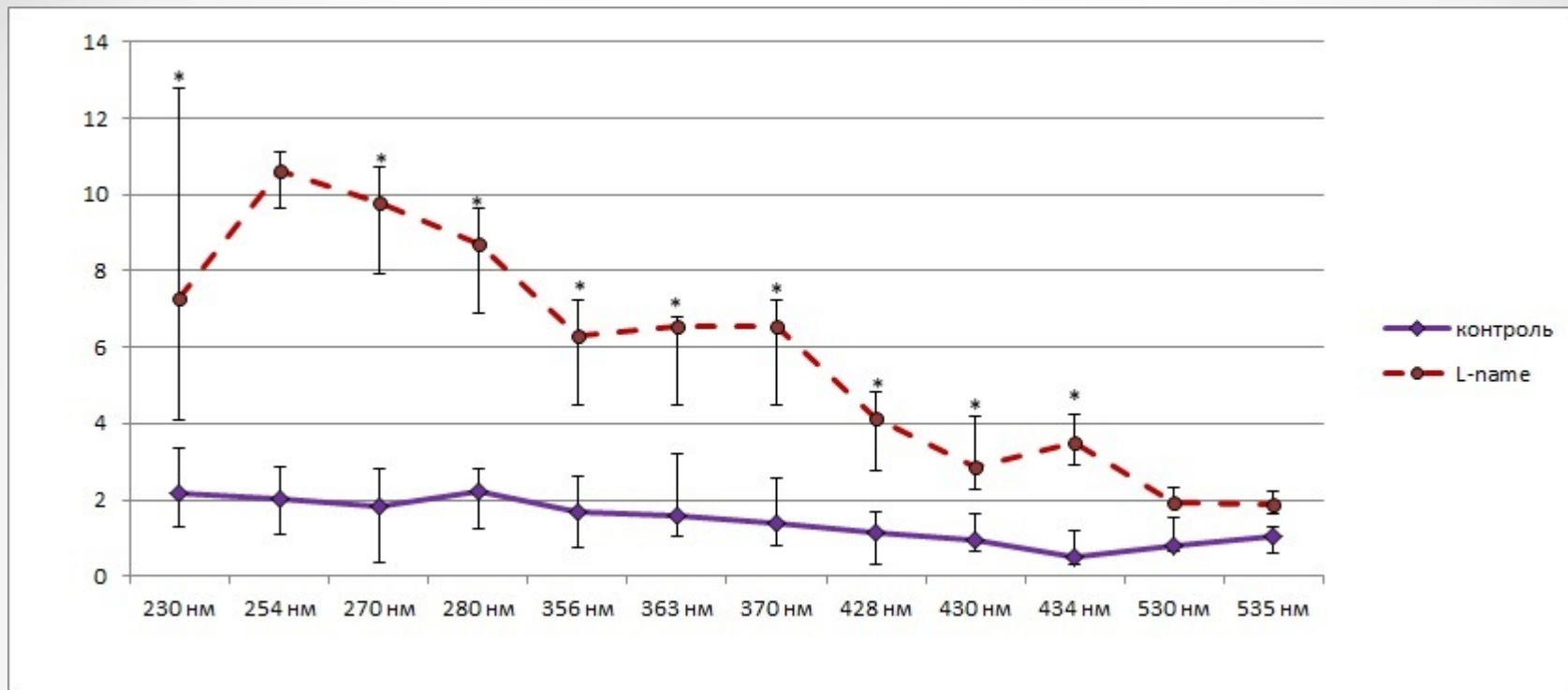
Экспериментальная группа 15,36 [12,6; 17,2]\*



# Влияние L-NAME на спектр окислительной модификации белков тимуса крыс *in vitro*

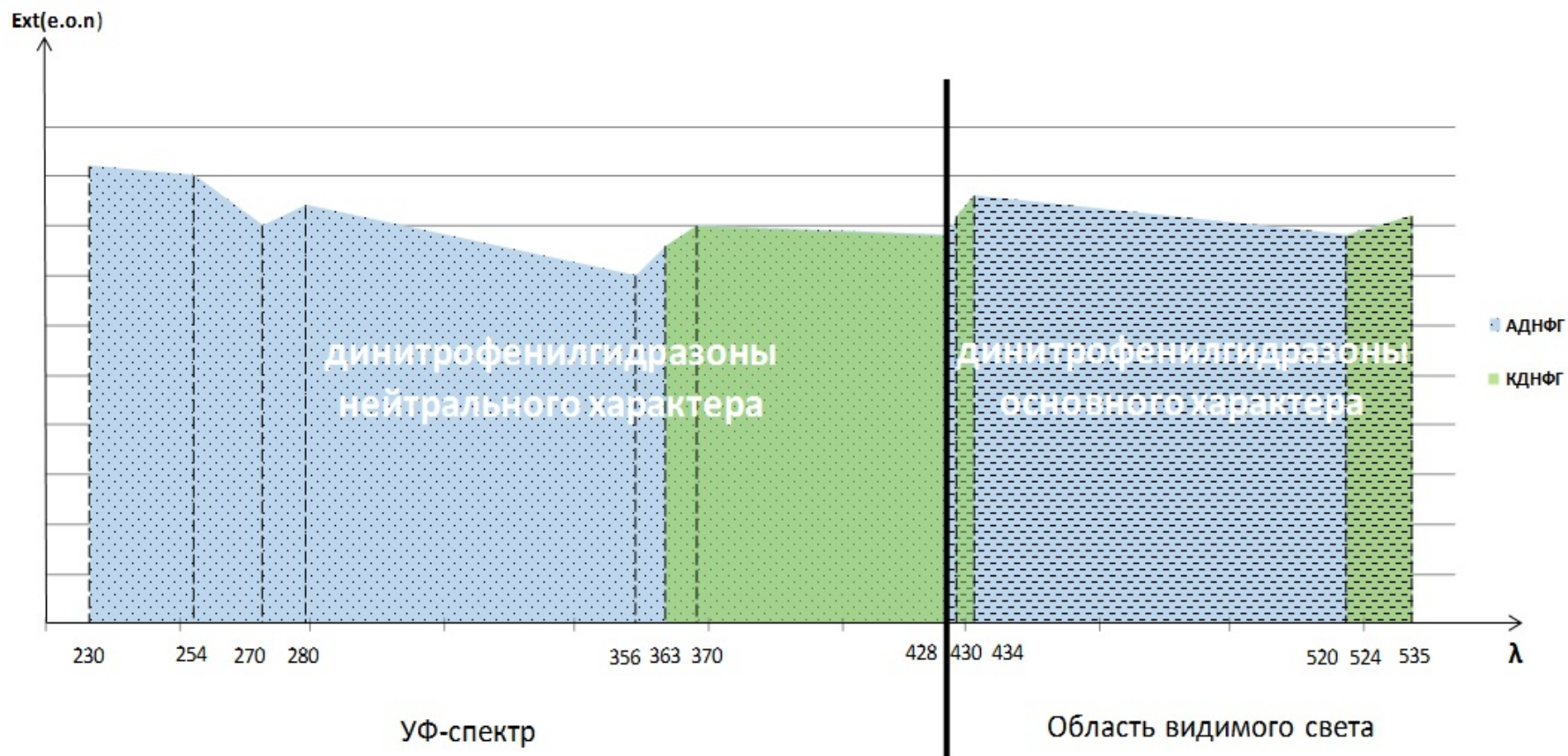


Окислительная модификация белка выражена в единицах оптической плотности на грамм белка

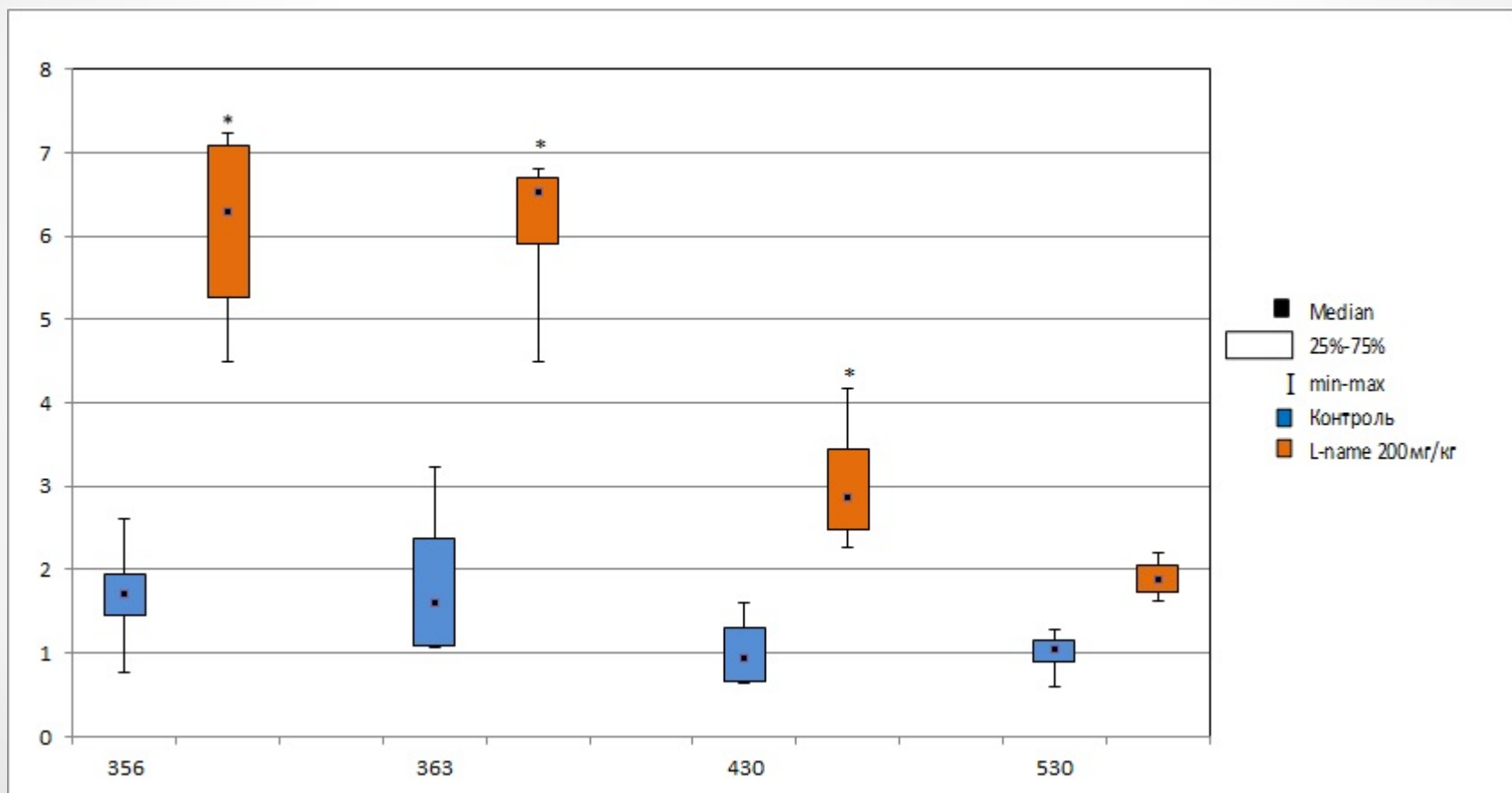


Окислительная модификация белка выражена в единицах оптической плотности  $\times 10^3$  на  $10^3$  клеток

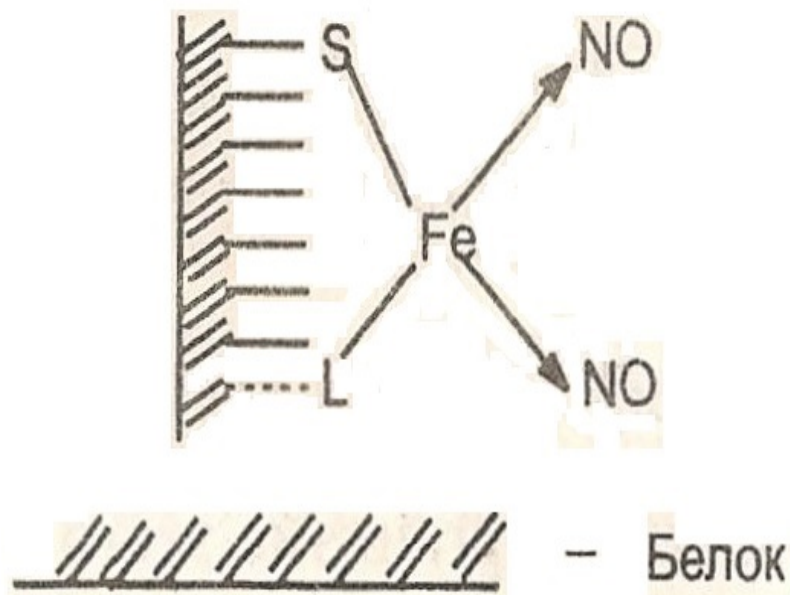
## Характеристика регистрации динитрофенилгидразонов в световом спектре



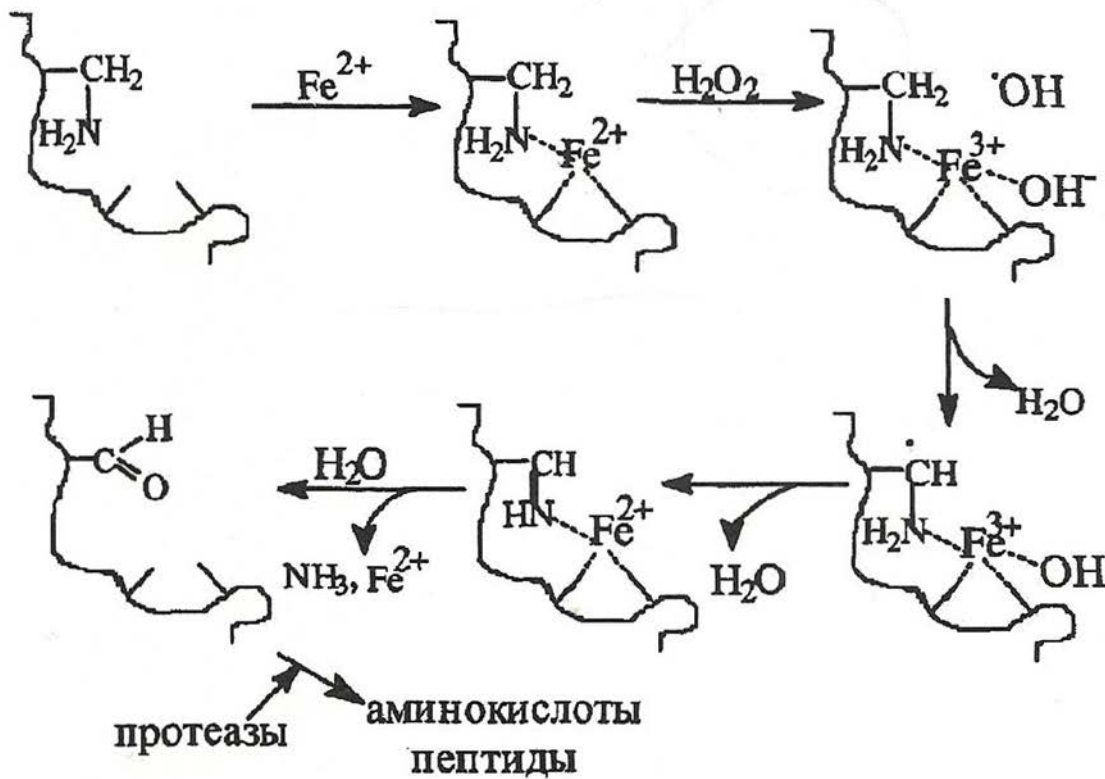
На длине волны 356 нм регистрируются АДНФГ нейтрального характера  
на длине волны 370 нм регистрируются КДНФГ нейтрального характера  
на длине волны 430 нм регистрируются АДНФГ основного характера  
на длине волны 530 нм регистрируются КДНФГ основного характера



Динитрозильные комплексы негемового железа (ДНКЖ) обнаружены в клетках и тканях, продуцирующих оксид азота. ДНКЖ являются стабильными депо оксида азота, низкомолекулярные ДНКЖ – переносчиками.

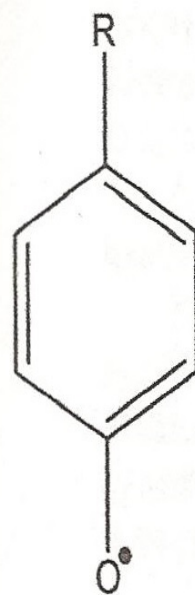
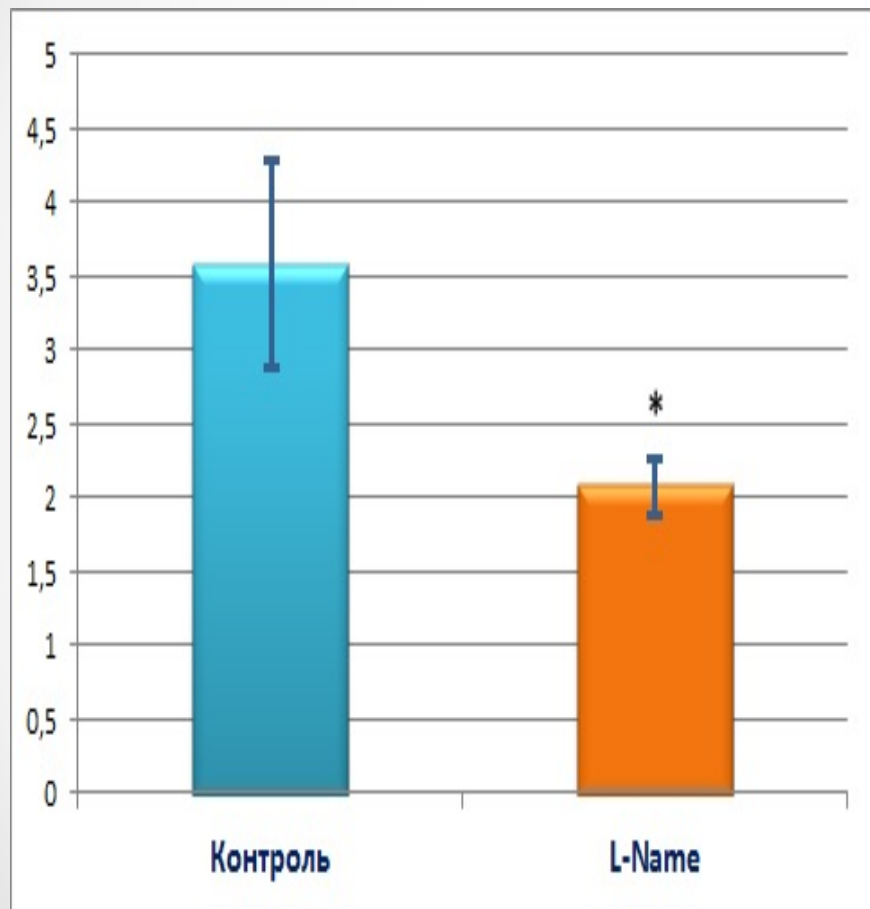


Граник В.Г., 2004

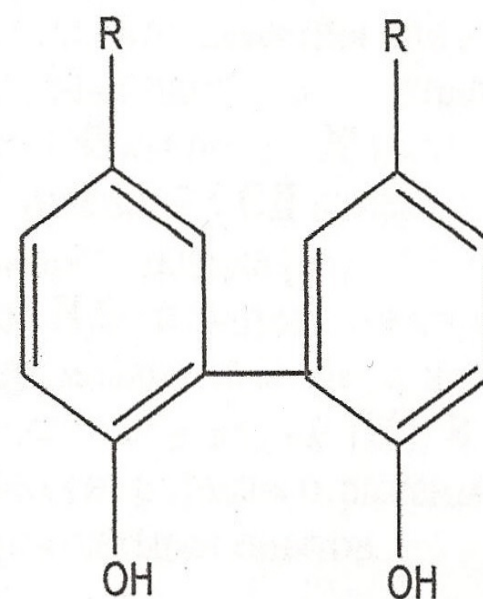


**Возможный механизм образования карбонилпроизводных  
(Stadtman, 1990)**

# Содержание окисленного тирозина



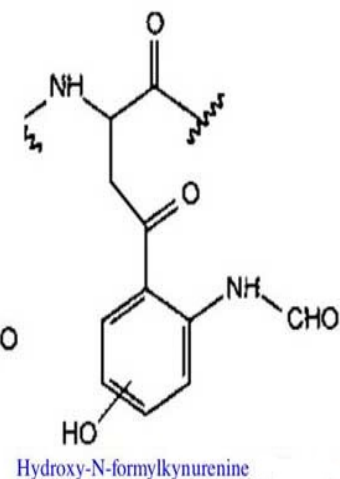
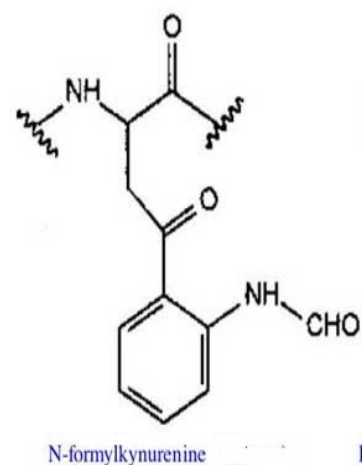
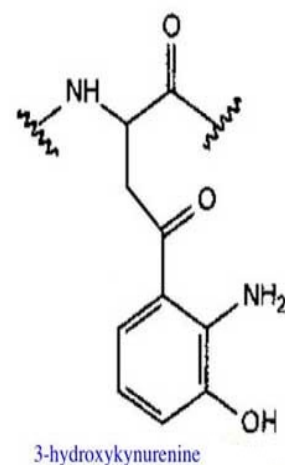
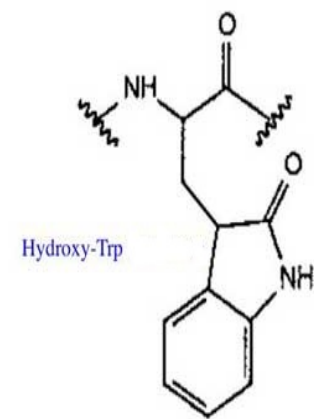
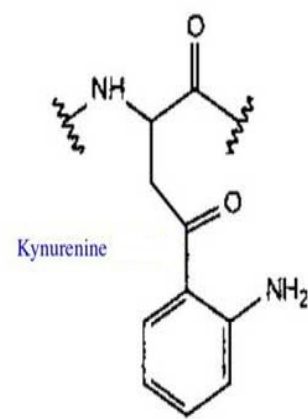
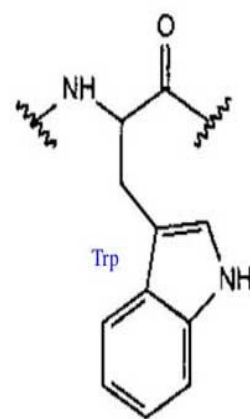
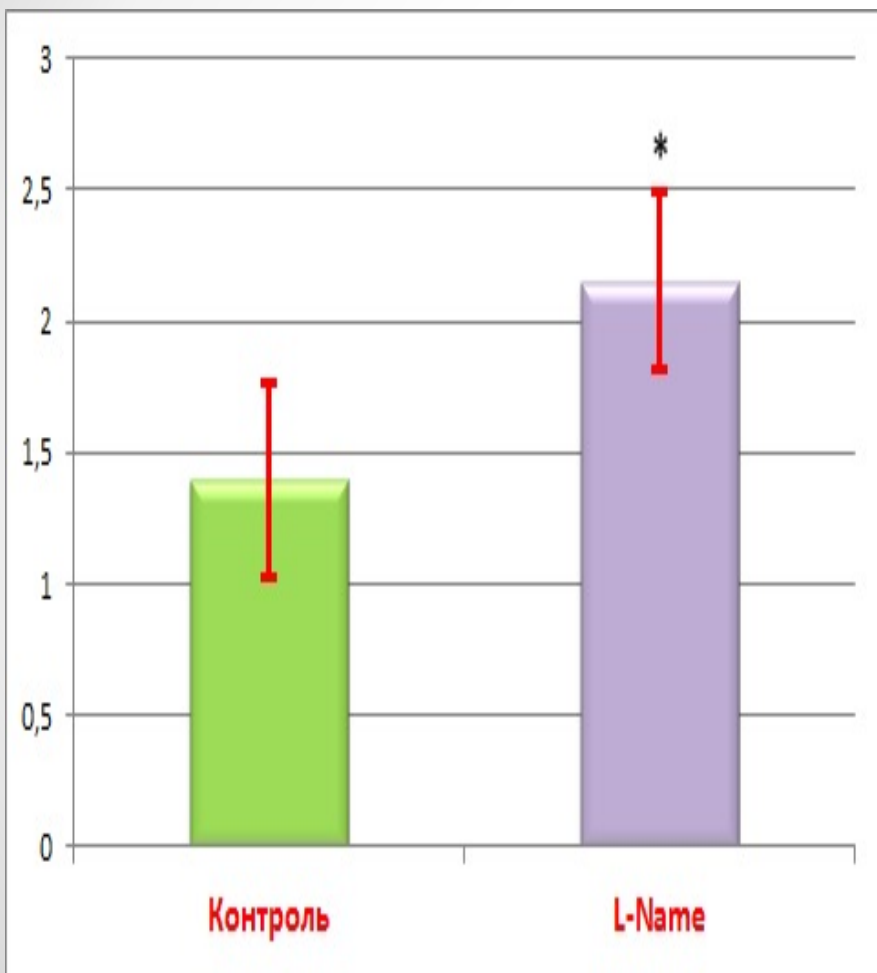
тирозил-радикал



битирозин

Дубинина Е.Е., 2002

# Содержание окисленного триптофана

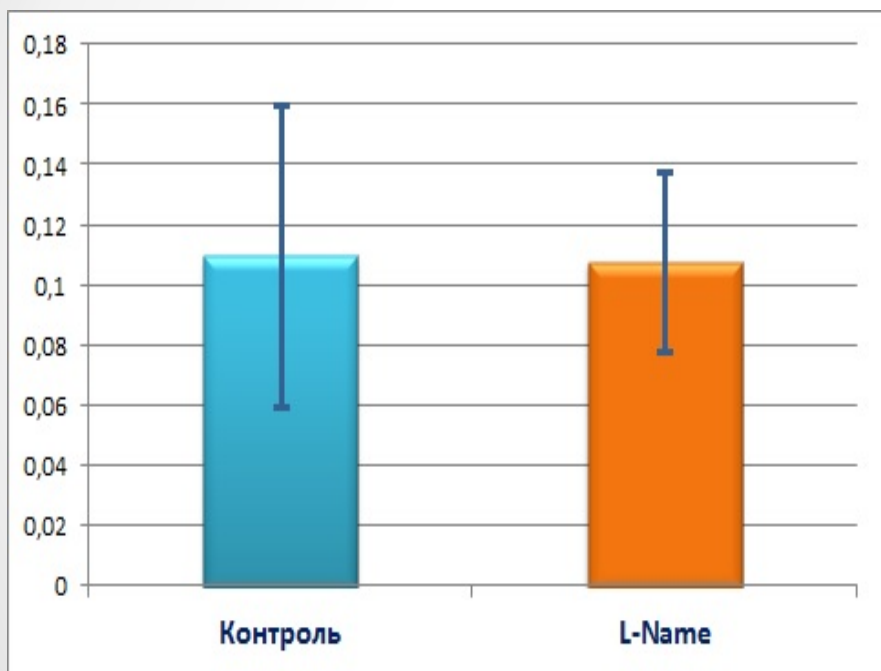




# Содержание окисленного тирозина и триптофана *in vivo*

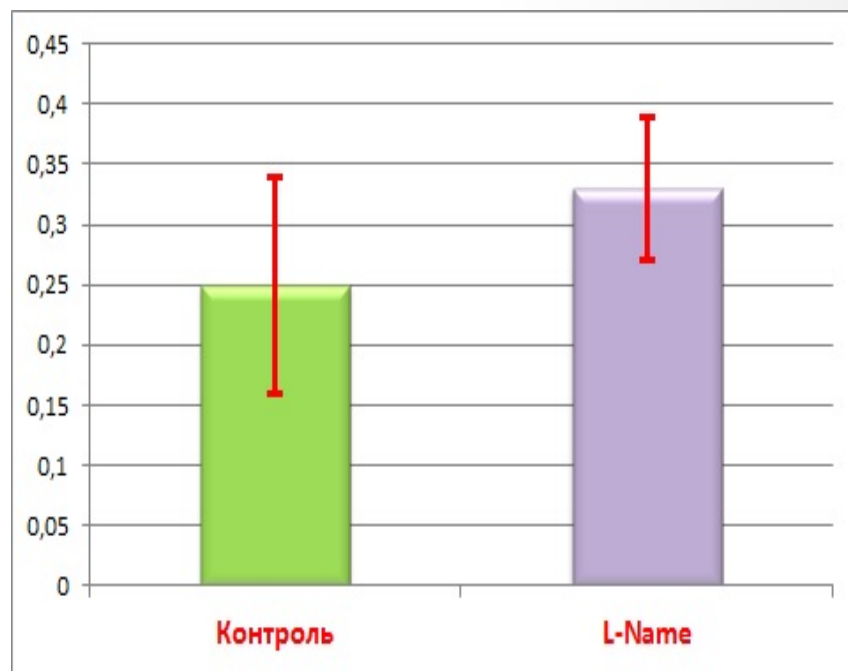
## битирозин

(ед. флуоресценции/ г белка)



## окисленный триптофан

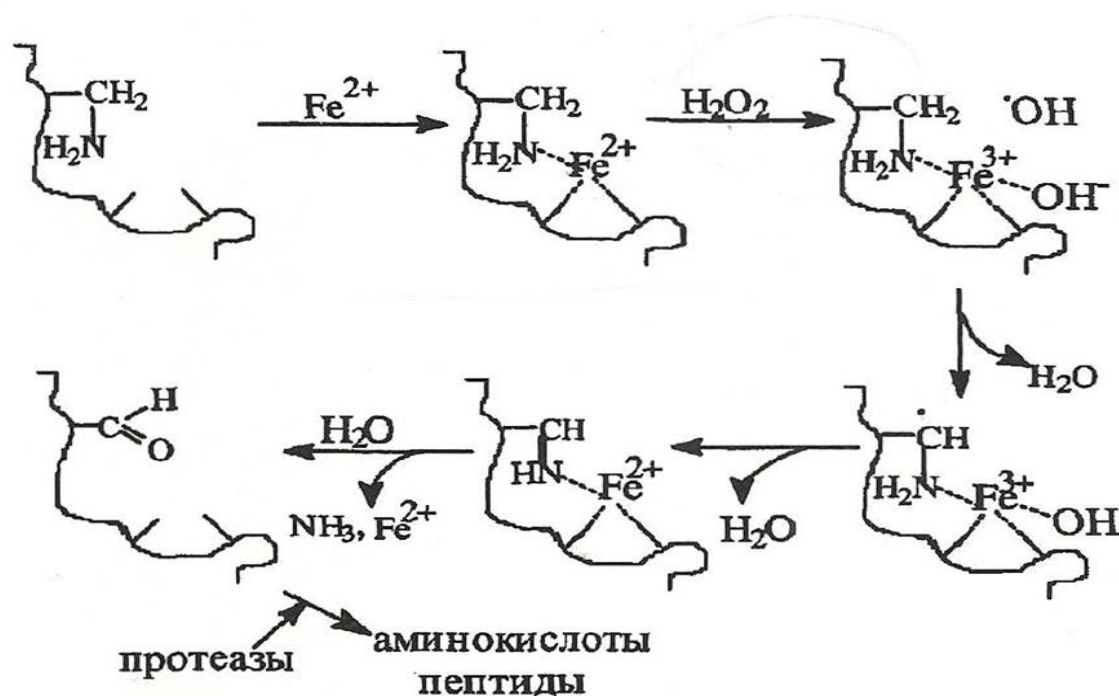
(ед. флуоресценции/ г белка)



# Окисление $\text{Fe}^{2+}$ в присутствии $\text{H}_2\text{O}_2$ составляет сущность реакции Фентона



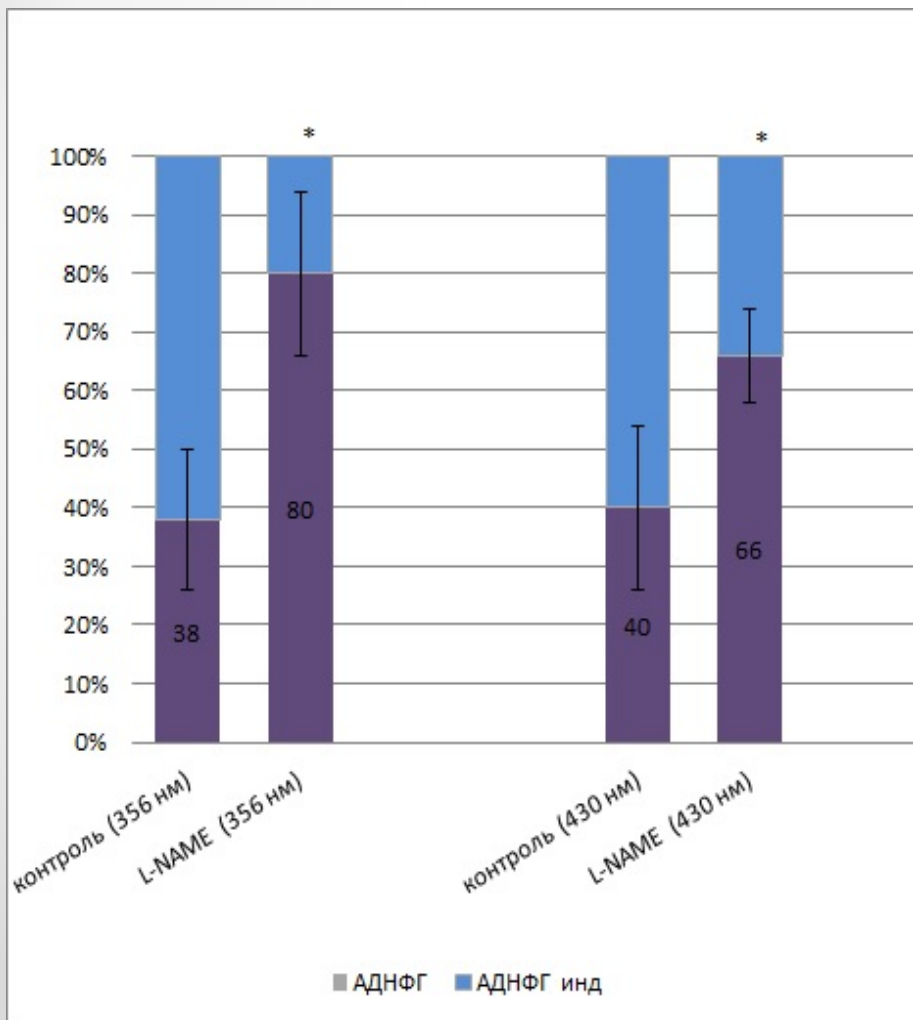
(Stadtman E.R., 1990)



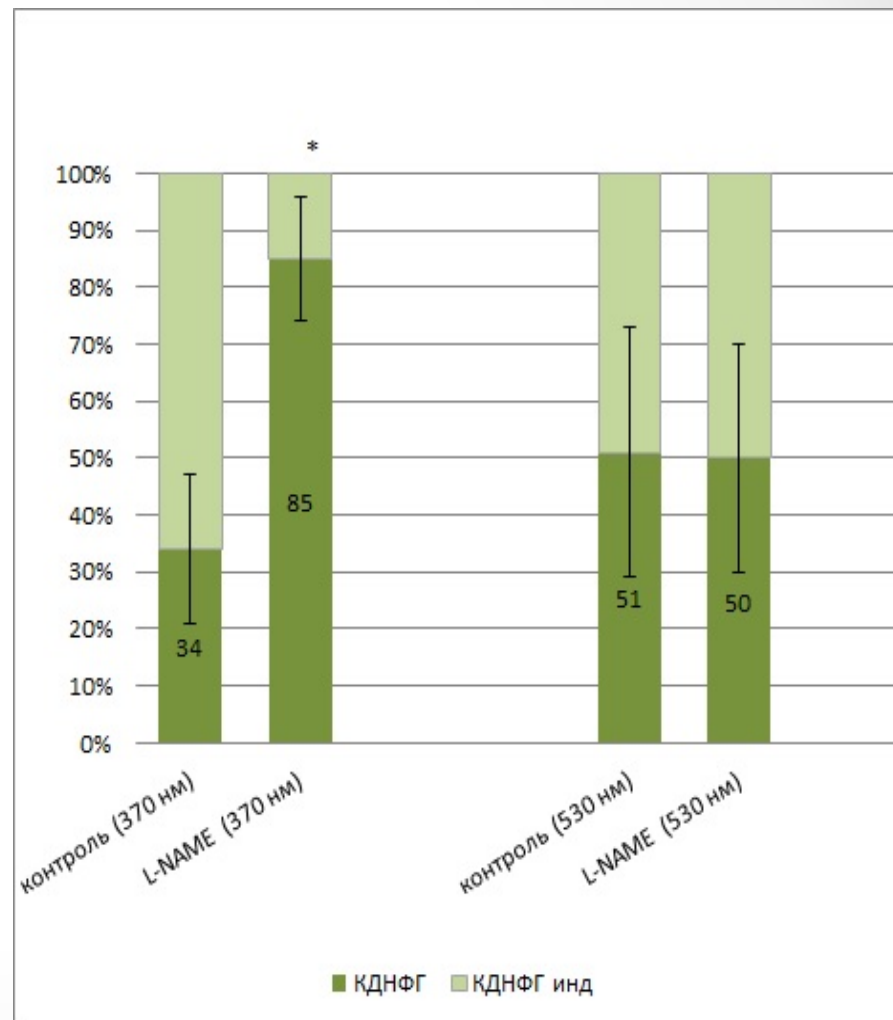
Возможный механизм образования карбонилпроизводных  
(Stadtman, 1990)

# Оценка резервно-адаптационного потенциала *in vitro*

## Альдегид-динитрофенилгидразоны

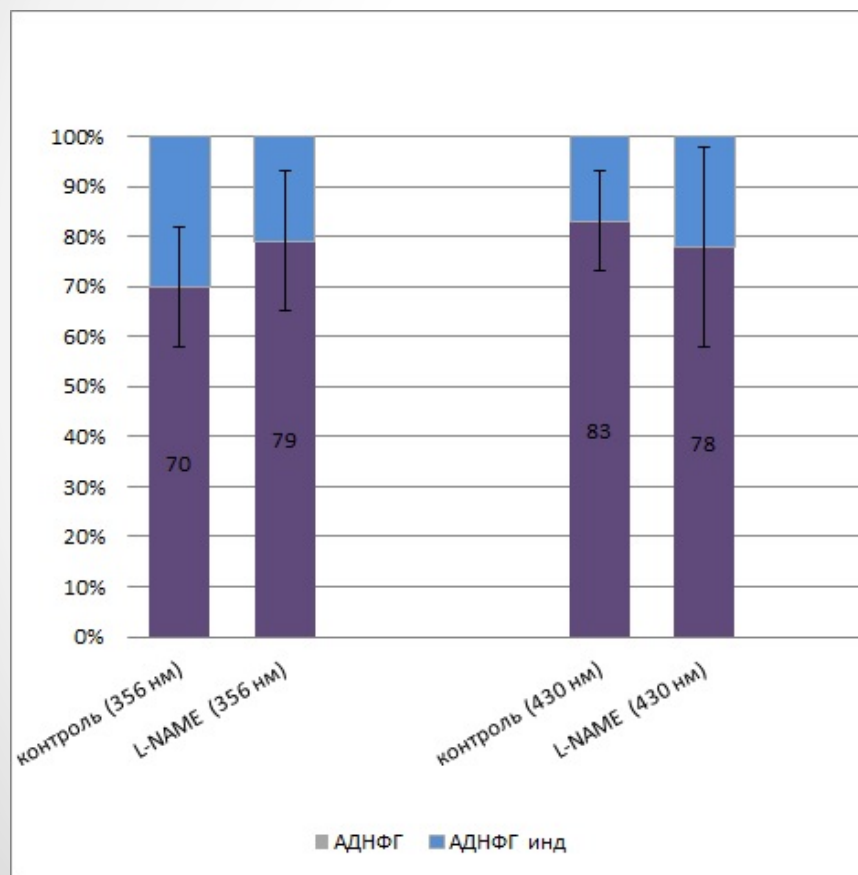


## Кетон-динитрофенилгидразоны

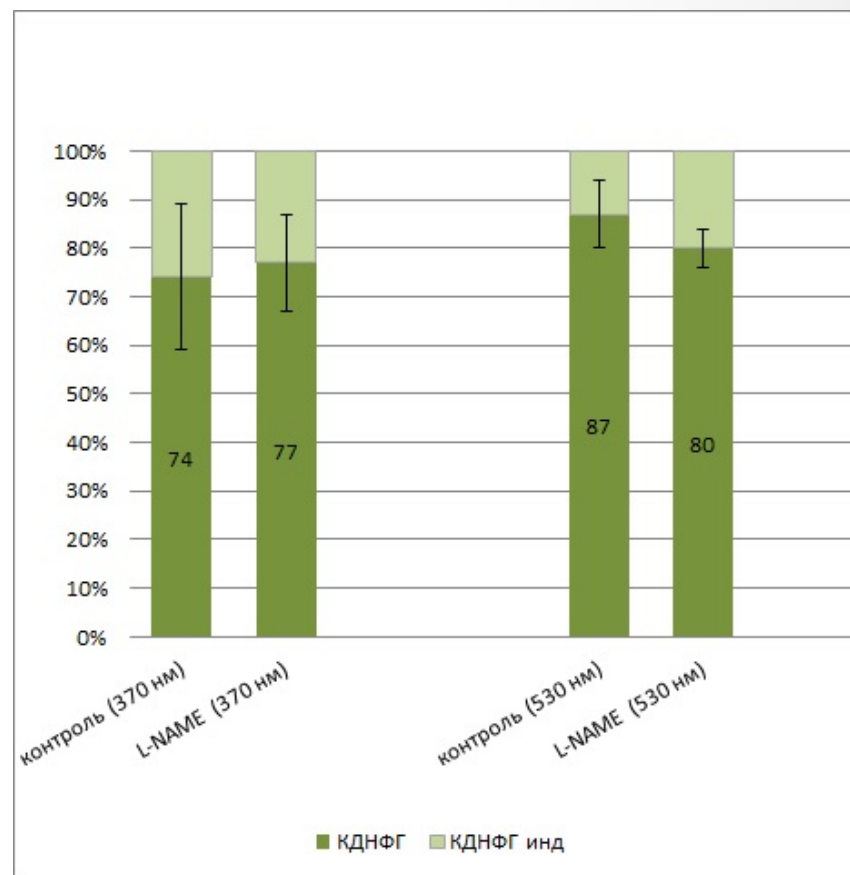


# Оценка резервно-адаптационного потенциала *in vivo*

## Альдегид-динитрофенилгидразоны



## Кетон-динитрофенилгидразоны



# Выводы:

- внутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг не влияет на концентрацию оксида азота в тимусе, что может быть связано с низким уровнем доставки ингибитора синтеза NO не только из-за наличия соединительнотканной капсулы тимуса, но и вазоконстрикции сосудов, приносящих кровь к данному органу. В связи с этим при моделировании дефицита синтеза NO *in vivo* статистически значимых изменений окислительной модификации белков не отмечается.

- при моделировании дефицита синтеза оксида азота *in vivo* концентрация NO снизилась, возможно, в связи с ЭТИМ повысилась окислительная модификация белков.
  - L-NAME способствует образованию АДНФГ нейтрального и основного характера и КДНФГ нейтрального характера;
  - моделирование дефицита синтеза оксида азота препятствует образованию битирозина и окисленного триптофана;
  - под действием N-нитро-L-аргининметилового эфира происходит истощение резервно-адаптационного потенциала.

**СПАСИБО  
ЗА  
ВНИМАНИЕ**