

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНА Н ТИМОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* МОДУЛИРОВАНИЯ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА (II)

Юлия Владимировна Абаленихина, Мария Алексеевна Фомина*

Рязанский государственный медицинский университет

Реферат

Цель. Изучение *in vitro* влияния субстрата синтеза оксида азота (L-аргинина) и неселективного ингибитора NO-синтазы (N-нитро-L-аргинин-метилового эфира) на окислительную модификацию белков в сочетании с оценкой изменений активности катепсина Н тимоцитов.

Методы. Исследование проводили на крысах-самцах линии Wistar с массой тела 280–320 г. Свежевыделенные тимоциты инкубировали *in vitro* в полной питательной среде, содержащей 5 мМ N-нитро-L-аргинин-метилового эфира (n=8) или 5 мМ L-аргинин, 24 ч при температуре 37 °C (n=8). Контрольная группа представляла собой тимоциты, инкубированные в тех же условиях в полной питательной среде (n=8) 24 ч. Содержание метаболитов оксида азота определяли с помощью спектрофотометрии в видимой области спектра по реакции с реактивом Грисса. Активность катепсина Н определяли спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke. Окислительную модификацию белков оценивали по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой, с последующим количественным анализом спектра поглощения карбонильных производных.

Результаты. В условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота увеличивалась степень окислительной модификации белков, в основном за счёт количества альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера. Указанные изменения сопровождались увеличением активности катепсина Н. В условиях стимуляции синтеза оксида азота количество окислительно-модифицированных белков снижалось в большей степени за счёт уменьшения вклада производных нейтральных аминокислотных остатков, при этом активность катепсина Н не изменялась.

Вывод. *In vitro* неселективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метилового эфира стимулирует окислительную модификацию белков с повышением активности катепсина Н, субстрат синтеза оксида азота L-аргинин проявляет антиоксидантные свойства.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, катепсин Н, L-аргинин, N-нитро-L-аргинин-метилового эфира.

PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION AND CATHEPSIN H ACTIVITY IN RATS' THYMOCYTES AT NITROGEN OXIDE (II) SYNTHESIS MODULATION *IN VITRO*

Yu.V. Abalenikhina, M.A. Fomina

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Aim. To study the influence of substrate for nitrogen oxide (II) synthesis – L-arginine – and non-selective NO-synthase inhibitor – N-nitro-L-arginine-methyl ester – on protein oxidative modification in combination with rats' thymocytes cathepsin H activity estimation *in vitro*.

Methods. The study was performed on male Wistar rats with body weight of 280–320 g. Freshly-separated thymocytes were incubated *in vitro* in the full nutrient medium containing 5 mM of N-nitro-L-arginine-methyl ester (n=8) or 5 mM of L-arginine for 24 hours at the temperature of 37 °C (n=8). Control group consisted of thymocytes incubated in the same conditions in the full nutrient medium (n=8) for 24 hours. Nitric oxide metabolites levels were measured by spectrophotometry in the visible spectrum using the reaction with Griess reagent. Cathepsin H activity was estimated by Barrett&Kirschke spectrofluorimetry. Protein oxidative modification was measured by R.L. Levine method in E.E. Dubinina modification followed by carbonyl derivatives absorption spectrum quantitative analysis.

Results. In nitrogen oxide (II) synthesis deficiency model, protein oxidative modification degree increased, mainly due to basic and neutral aldehyde- and ketone-dinitrophenylhydrazones level increase. Those changes were accompanied by increased activity of cathepsin H. In nitrogen oxide (II) synthesis stimulation model, level of oxidative-modified proteins decreased, mainly due to lower levels of neutral amino acid derivatives, cathepsin H activity didn't change.

Conclusion. *In vitro* nonselective inhibitor of inducible NO-synthase – N-nitro-L-arginine-methyl ester – stimulates protein oxidative modification and increases activity of cathepsin H; substrate of NO synthesis – L-arginine – shows antioxidant effect.

Keywords: protein oxidative modification, cathepsin H, L-arginine, N-nitro-L-arginine-methyl ester.

В настоящее время в качестве маркера окислительного повреждения рекомендовано использование количественной оценки уровня карбонильных производных белков. Данный показатель позволяет одновременно оценить повреждение аминокислотных остатков свободными радикалами кислорода и/или азота, а также продуктами пере-

кисного окисления липидов [12].

Повреждённые вследствие окисления белки способны формировать устойчивые к протеолизу токсичные агрегаты, что может приводить к апоптозу или некрозу клетки [3]. Также существует мнение, что окисленные формы белков более чувствительны к действию протеаз, чем их нативные аналоги [8]. Модифицированные белки, разрушенные протеасомами или протеазами до

Адрес для переписки: abalenikhina88@mail.ru

пептидов и/или аминокислот, могут стать источником синтеза новых необходимых клетке протеинов [7]. Именно поэтому окисление протеинов является неотъемлемой составляющей обмена белков в организме при участии тканевых протеиназ.

Важно отметить, что лизосомальные протеиназы тесно связаны с формированием иммунного ответа [6], в регуляции которого также принимает участие оксид азота [13]. В свете этого актуальным представляется изучение прямого воздействия стимуляторов и ингибиторов синтеза оксида азота на цистеиновый протеолиз и окислительную модификацию белков иммунокомпетентных клеток.

Целью данного исследования стало изучение *in vitro* влияния субстрата синтеза оксида азота (L-аргинина) и неселективного ингибитора NO-синтазы (N-нитро-L-аргинин-метилового эфира) на окислительную модификацию белков в сочетании с оценкой изменений активности катепсина Н тимоцитов.

Исследование проводили на конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar с массой тела 280–320 г. Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли в соответствии с правилами, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Для получения клеточного биологического материала животных вводили в глубокий наркоз, производили обескровливание и стерильно извлекали вилочковую железу, погружали в охлажденную среду RPMI 1640 и освобождали от крови, жира и соединительной ткани. Очищенную ткань помещали в стеклянный гомогенизатор (150×25 мм), содержащий среду RPMI 1640 в соотношении 1:10, и измельчали, вращая пестик вручную. Полученную взвесь клеток переносили в центрифужную пробирку и оставляли для оседания клеточных агрегатов на ледяной бане в течение 1 ч. После этого отбирали шприцем одиночные клетки и осаждали тимоциты центрифугированием в течение 10 мин при 600 g (центрифуга CM-6M ELM1, Латвия). Клеточный осадок ресуспендировали при комнатной температуре в 5 мл полной питательной среды. Тимоциты инкубировали *in vitro* в полной питательной среде, содержащей 5 мМ N-нитро-L-аргинин-

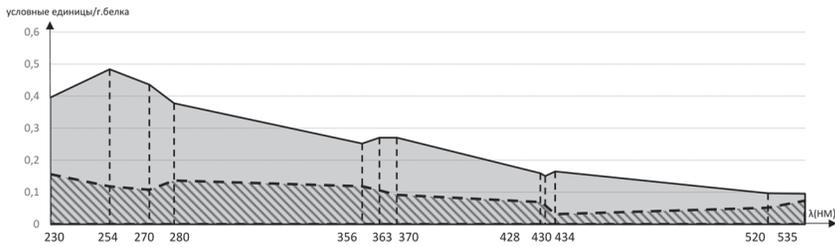
метилового эфира (L-NAME, «Sigma», США), n=8, или 5 мМ L-аргинин («Sigma», США) 24 ч при температуре 37 °С, n=8. Контрольная группа представляла собой тимоциты, инкубированные в тех же условиях в полной питательной среде (n=8) 24 ч.

Состав полной питательной среды: среда RPMI 1640, содержащая 2 мМ L-Gln, по 2 мг/мл стрептомицина и пенициллина, а также 5 мМ L-аргинин или 5 мМ L-NAME в зависимости от экспериментальной модели.

После инкубации полученные клетки осаждали при 600 g (центрифуга CM-6M ELM1, Латвия) и ресуспендировали в 0,25 М растворе сахарозы. В полученный материал добавляли Тритон X-100 в конечной концентрации 0,1%, и отбирали аликвоты для определения общей активности катепсина Н и окислительной модификации белков.

Активность катепсина Н определяли через количественное измерение 7-амидо-4-метилкумарина (АМС), высвобождающегося в результате энзиматического гидролиза пептидной связи Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) [5]. Количество свободного АМС регистрировали на спектрофлуориметре «System 3 Scanning Spectrofluorometr» («Optical technology devices», inc. Elmstord, New York, 10523) при длинах волн возбуждения (λ_{ex}) 360 нм и эмиссии (λ_{em}) 440 нм. Активность фермента выражали в нмоль АМС/схг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури с использованием коммерческого набора НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург).

Окислительную модификацию белков оценивали по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [1] после осаждения нуклеиновых кислот 10% раствором стрептомицина сульфата. Карбонильные производные окисленных белков регистрировали на спектрофотометре (СФ 2000, Санкт-Петербург) при следующих длинах волн: 254, 270, 280, 356 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера), 363 и 370 нм (кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера), 428 и 520 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера) и 430, 434 и 520, 535 нм (кетон-динитрофенилгидразоны основного характера) [1]. По полученным значениям экстинкций строили спектр поглощения продуктов окислительной модификации белков и подсчитывали значения площадей под кривой для различных его компонентов, а также суммарную площадь [заявка на патент №2013 102618 (003624) от 21.01.2013; реше-



	S альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера= =S _{230,254} +S _{254,270} +S _{270,280} +S _{280,356} +S _{356,363}	S кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера= =S _{363,370} +S _{370,428}	S альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера= =S _{428,430} +S _{434,520}	S кетон-динитрофенилгидразоны основного характера= =S _{430,434} +S _{520,535}	Общая площадь под кривой
--- контроль	15,5 [12,1; 25,1]	5,5 [3,3; 8,1]	5,2 [3,1; 11,6]	1,03 [0,8; 1,9]	27,5 [20,9; 44,8]
— L-Name	48,3 [34,2; 58,1]* p=0,03	14,3 [11,3; 18,7]* p=0,03	12,2 [9,3; 14,4]* p=0,03	2,1 [1,1; 2,2]* p=0,03	77,1 [56,1; 93,4]* p=0,03

Рис. 1. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков и их компонентов в тимocyтaх при *in vitro* воздействии 5 мМ N-нитро-L-аргинин-метилового эфира; *статистически значимые различия с контролем (p ≤ 0,05).

ние о выдаче патента от 05.05.2014], выражая полученные данные в условных единицах на грамм белка (у.е./г белка).

Содержание метаболитов оксида азота определяли спектрофотометрически в видимой области спектра по реакции с реактивом Грисса [2] с регистрацией на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 («Awareness Technology», США) при длине волны 540 нм и выражали в мкМ/10⁶ клеток.

Статистический анализ результатов исследования проведён с использованием программ «Microsoft Office Excel 2010» и «Statistica 10.0». Для каждой выборки вычисляли медиану, минимальное и максимальное значения, результаты представляли в формате Me [min; max]. Поскольку отмечалось отсутствие согласия данных с нормальным распределением (W-критерий), для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест).

Как показывают результаты выполненных исследований, концентрация метаболитов оксида азота тимocyтoв крыс после инкубации в среде с 5 мМ L-NAME снижалась и составила 15,4 [12,7; 17,3] мкМ/10⁶ клеток, что статистически значимо ниже контрольного значения 24,9 [20,4; 32,7] мкМ/10⁶ клеток (p=0,03).

В условиях *in vitro*-моделирования дефицита синтеза оксида азота зарегистрировано увеличение количества карбонильных производных белков за счёт повышения уровня альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера (рис. 1).

Известно, что существует несколько пу-

тей образования карбонильных производных белков, один из которых — прямое воздействие активных форм кислорода и/или азота на аминокислотные остатки боковых цепей [12]. Генерация активных форм кислорода в условиях угнетения синтеза оксида азота (II) может происходить за счёт подавления антиоксидантной системы, а именно каталазы и α-токоферола [9]. Следует отметить, что подавление активности каталазы приводит к токсическому эффекту из-за возможного накопления водорода пероксида (перекиси водорода) в клетках. Кроме того, не обезвреженный H₂O₂ при наличии металлов переменной валентности способен участвовать в неферментативном окислении белков, имеющих металл-связывающую поверхность, что приведёт к формированию карбонильных производных белков [3].

Важно отметить, что, помимо вышеуказанного прямого повреждения аминокислотных остатков в условиях дефицита синтеза оксида азота, возможно, возрастает содержание продуктов перекисного окисления липидов [9], что влечёт за собой формирование карбонильных производных за счёт взаимодействия малонового диальдегида и 4-гидрокси-2-ноненаля со свободными аминокислотами и их остатками в составе белков [3].

Протеолитические системы способны удалять повреждённые белки, именно поэтому их рассматривают как вторичные антиоксидантные системы [7]. Изучение активности протеаз в условиях окислительного стресса важно для понимания процесса обновления белков.

В условиях экспериментальной модели

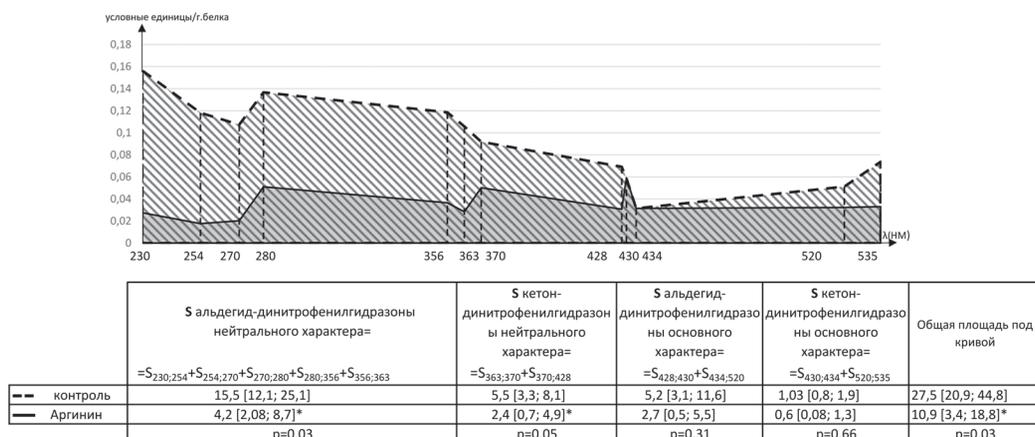


Рис. 2. Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков и их компонентов в тимоцитах при *in vitro* воздействии 5 мМ L-аргинина; *статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).

дефицита синтеза оксида азота общая активность катепсина Н статистически значимо возросла: для контрольной группы составила 25,9 [18,2; 28,5] нмоль АМС/схг белка, а для экспериментальной группы – 30,5 [26,1; 35,2] нмоль АМС/схг белка ($p=0,022$). Активация лизосомальной протеазы на фоне увеличения содержания карбонильных производных белков предположительно свидетельствует об участии катепсина Н в деградации окислительно-модифицированных белков.

Концентрация метаболитов оксида азота тимоцитов крыс после инкубации в среде с 5 мМ L-аргинином составила 40,0 [35,1; 42,1] мкМ/10⁶ клеток, что статистически значимо выше контрольного значения 24,9 [20,4; 32,7] мкМ/10⁶ клеток ($p=0,01$).

В условиях моделирования дополнительного синтеза оксида азота в тимоцитах окислительная модификация белков снижалась преимущественно за счёт уменьшения вклада производных нейтральных аминокислотных остатков (рис. 2).

Полученные данные укладываются в представления о роли оксида азота и его метаболитов как антиоксидантных агентов [11]. В частности, особое место среди метаболитов занимают динитрозильные комплексы железа, необходимые для транспорта и депонирования NO [4], в результате чего снижается вероятность образования карбонильных производных белков по металл-зависимому механизму.

Хотя известно, что NO в результате взаимодействия с супероксид-анион радикалом может образовывать пероксонитрит (ONOO⁻) – сильный окислитель, были описаны пути

его детоксикации через эндогенные антиоксидантные механизмы [10].

Активность катепсина Н в условиях моделирования дополнительного синтеза оксида азота в экспериментальной группе (25,6 [19,0; 27,5] нмоль АМС/схг белка) статистически значимо не отличалась от значений контрольной группы (25,9 [18,2; 28,5] нмоль АМС/схг белка). Полученный результат может быть обусловлен отсутствием функциональной потребности в дополнительном протеолизе на фоне уменьшения окислительного повреждения белков и прямого подавления L-аргинином лизосомального цистеинового протеолиза.

ВЫВОДЫ

1. В условиях *in vitro* ингибирование синтеза оксида азота в тимоцитах вызывает увеличение степени окислительной модификации белков за счёт формирования альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера, сопровождаемое активацией катепсина Н.

2. В условиях *in vitro* воздействия субстрата синтеза оксида азота L-аргинина на тимоциты происходит снижение уровня карбонильных производных белков за счёт альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера без изменения активности катепсина Н.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Е.Е., Бурмистров О.С., Ходов Д.А., Порохов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, №1. – С. 24–26. [Dubinina E.E.,

Burmistrov O.S., Khodov D.A., Porotov I.G. Oxidative modification of human serum proteins and the method of their determining. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1995; 41 (1): 24-26. (In Russ.)]

2. Метельская В.А., Гуманов Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клини. лаб. диагн. — 2005. — №6. — С. 15-18. [Metelskaya V.A., Gumanov N.G. The screening method for determining the nitric oxide level in serum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2005; 6: 15-18. (In Russ.)]

3. Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А. и др. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // Фундамент. исслед. — 2010. — №1. — С. 74-78. [Muravleva L.E., Molotov-Luchansky V.B., Klyuyev D.A. et al. Protein oxidative modification: problems and research prospects. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2010; 1: 74-78. (In Russ.)]

4. Селиванов Е.А., Ремизова М.И., Гербут К.А. и др. Влияние динитрозильного комплекса железа с глутатионом на течение геморрагического шока при его инфузионной терапии // Мед. академ. ж. — 2012. — Т. 12, №2. — С. 84-89. [Selivanov E.A., Remizova M.I., Gerbut K.A. et al. Effect of dinitrosyl iron complex with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2012; 12 (2): 84-89. (In Russ.)]

5. Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H,

cathepsin L // *Methods in Enzymol.* — 1981. — Vol. 80. — P. 535-561.

6. Conus S. Cathepsins and their involvement in immune responses. — *Swiss Medical Weekly*, 2010. — P. 1-12.

7. Grimm S., Höhn A., Grune T. Oxidative protein damage and the proteasome // *Amino Acids*. — 2012. — Vol. 42, N 1. — P. 23-38.

8. Kim C.J., Lee D.I., Lee C.H., Ahn I.S. A dityrosine-based substrate for a protease assay: application for the selective assessment of papain and chymopapain activity // *Anal. Chim. Acta*. — 2012. — Vol. 20, N 723. — P. 101-107.

9. Kumar S., Kumar M.S., Raja B. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxidants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats // *Int. J. Res. Pharm. Sci.* — 2010. — Vol. 1, N 3. — P. 300-307.

10. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant // *J. Biol. Chem.* — 2013. — Vol. 288, N 37. — P. 26 464-26 472.

11. Vittorio C., Cornelius C., Rizzarelli E. et al. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule // *Antioxid. Redox Signal.* — 2009. — Vol. 11, N 11. — P. 2717-2739.

12. Wall S.B., Oh J.Y., Diers A.R., Landar A. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling // *Front Physiol.* — 2012. — Vol. 14, N 3. — P. 369.

13. Wink D.A., Hines H.B., Cheng R.Y. et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response // *J. Leukocyte Biol.* — 2011. — Vol. 89. — P. 873-891.

УДК 612.084: 615.322: 615.272.3: 615.252.349.7: 615.036.8

E02

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ

Римма Фуатовна Ерёмко*, Людмила Николаевна Малоштан, Елена Юрьевна Яценко

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Реферат

Цель. Изучение гипогликемической активности экстракта из травы люцерны посевной у здоровых крыс и крыс с глюкозной нагрузкой.

Методы. На первом этапе исследования определяли гипогликемическую активность экстракта из травы люцерны посевной у здоровых крыс. В качестве препаратов сравнения использовали метформин в дозе 50 мг/кг и растительный противодиабетический сбор «Арфазетин» в дозе 18 мг/кг. На втором этапе исследования была определена гипогликемическая активность экстракта из травы люцерны посевной у крыс с нагрузкой декстрозой (глюкозой). Пробы крови для анализа отбирали до и через 15, 30, 60 и 120 мин после нагрузки. Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом.

Результаты. Установлена гипогликемическая активность экстракта из травы люцерны посевной у здоровых животных и у животных с нагрузкой декстрозой (глюкозой). В дозе 25 мг/кг экстракт из травы люцерны посевной через 4, 6 и 8 ч снижал уровень глюкозы в крови здоровых животных в 1,04, 1,14 и 1,11 раза по отношению к исходным данным на уровне гипогликемического действия «Арфазетина» и уступал по этому показателю действию метформина. Экстракт из травы люцерны посевной при однократном введении в дозе 25 мг/кг проявлял гипогликемическую активность на фоне нагрузки декстрозой (глюкозой) и достоверно снижал концентрацию глюкозы в крови через 15, 30, 60 и 120 мин в сравнении с контролем.

Вывод. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования экстракта из травы люцерны посевной в дозе 25 мг/кг в комплексной терапии сахарного диабета 2-го типа в качестве фитопрепарата с гипогликемическими свойствами.

Ключевые слова: сахарный диабет, люцерна посевная, гипогликемическая активность.

EXPERIMENTAL STUDY OF HYPOGLYCEMIC EFFECT OF MEDICAGO SATIVA LEAVES EXTRACT

R.F. Eremenko, L.N. Maloshtan, E.Yu. Yatsenko

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

Aim. To study the hypoglycemic effect of the *Medicago Sativa* leaves extract in intact rats and in rats with a glucose load.

Methods. At the first stage, hypoglycemic effect of *Medicago Sativa* leaves extract was determined in intact rats. 50 mg/kg of metformin and 18 mg/kg of herbal anti-diabetic «Arfazetin» tea were used as comparator drugs. At the second stage, hypoglycemic effect of *Medicago Sativa* leaves extract was determined in rats with glucose load. Blood samples for glucose analysis were taken before and in 15, 30, 60 and 120 minutes after loading. Blood glucose level was determined by glucose oxidase method.