



ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ШУМА И α_2 -АДРЕНОБЛОКАТОРОВ

Л.С. УНАНЯН¹, О.П. СОЦКИЙ¹, Л.Г. ХАЧАТРЯН¹,
Э.А. ШИРИНЯН², М.М. МЕЛКОНЯН¹

¹ЕМГУ им. М. Гераци, ²Институт тонкой органической химии НАН РА

Исследована степень окисления суммарных белков сыворотки крови белых крыс в норме, под влиянием шума и α_2 -адреноблокаторов. С помощью метода, основанного на реакции взаимодействия 2,4-ди-нитро-фенилгидразина (ДНФГ) с окисленными аминокислотными остатками белков, установлено, что исследуемые факторы по убыванию степени окисляемости суммарных белков сыворотки крови по данному маркеру располагаются в следующей последовательности: шум, идазоксан, бедитин. Пред-варительное внутрибрюшинное введение бедитина, 2 мг/кг массы, в отличие от идазоксана, препятствует повышению содержания нейтральных динитрофенилгидразонов в сыворотке крови крыс, подвергнутых воздействию шума в течение 2 ч.

*Стресс окислительная модификация белков α_2 -адреноблокаторы
динитрофенилгидразоны*

Նորմայում, աղմկային սթրեսի և α_2 -ադրենոբլոկատորների (իդազոքսան, բեդիտին) ներարկման պայմաններում, սպիտակ առնետների շիճուկում ուսումնասիրվել է գումարային սպիտակուցների օքսիդացման աստիճանը, որի մասին է վկայում օքսիդացված ամինաթթուներ պարունակող սպիտակուցների և 2,4-դինիտրոֆենիլհիդրազինի (ԴՆՖՀ) փոխադեցության արդյունքում առաջացած դինիտրոֆենիլհիդրազոնների քանակը: Հաստատվել է, որ ըստ արյան շիճուկում գումարային սպիտակուցների օքսիդացման աստիճանի նվազման, տրված գործոնները դասավորվում են հետևյալ հաջորդականությամբ՝ աղմուկ, իդազոքսան, բեդիտին: Բեդիտինի 2մգ/կգ չափաբաժնի նախնական ներորովայնային ներարկումը, ի տարբերություն իդազոքսանի, կանխում է երկու ժամ աղմկային սթրեսի ենթարկված առնետների շիճուկում չեզոք դինիտրոֆենիլհիդրազոնների պարունակության աճը:

*Մթես (սպիտակուցների օքսիդատիվ մոդիֆիկացում /
 α_2 -ադրենոբլոկատորներ, դինիտրոֆենիլհիդրազոններ*

The 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNFH) test was used for estimating the blood serum proteins' oxidation level in white mongrel rats' serum in norm, under the influence of (91 dBA, 2hr) noise and α_2 -adrenoblockers (beditin and idazoxan intraperitoneal injection). It was shown that oxidation intensity of proteins, particularly the level of dinitrophenylhydrazones, which are formed with the carbonyl groups of aminoresidues of proteins, decreased in the following sequence: noise, idazoxan, beditin. Preliminary intraperitoneal injection of beditin (2mg/kg), prevents the increase of the neutral dinitrophenylhydrazones content in serum of the rats, exposed to the noise.

Stress oxidative modification of proteins α_2 -adrenoblockers dinitrophenylhydrazones

Как известно, любое острое воздействие на живой организм сопровождается активацией систем защиты. Одной из таких систем адаптации клетки является многокомпонентная система, включающая образование активных форм кислорода (АФК) и регуляцию их содержания в клетке [6]. На ранних этапах изучения роли АФК в клетке исследователи считали, что свободные радикалы, образующиеся за счёт неполного восстановления O_2 , играют отрицательную роль, вызывая окислительную деструкцию липидов, и, что самое главное, белков, нарушая их функции [8,9,10,12,15,16,17]. В настоящее время установлено, что активные формы кислорода в физиологических концентрациях осуществляют передачу сигналов внешней и внутренней сред организма через регуляторные метаболические каскады [1]. Эти данные и послужили основой для расширенных исследований о роли АФК в функционировании белков и липидов в норме и патологии. Исследования, проводимые с начала 80-х годов в ЕрГМУ, продемонстрировали развитие выраженных изменений в процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушение дисбаланса в системе ПОЛ- антиоксидантная система в условиях воздействия шума высокого уровня (91-97 дБА), наиболее часто встречаемого на производствах, транспорте и быту, зависимость их от продолжительности воздействия и пола экспериментальных животных. Предварительное одноразовое (профилактическое, при одноразовом воздействии шума) и систематическое применение антиоксидантов природного (α -токоферол) происхождения и целого ряда синтетических препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, в условиях хронического эксперимента показало их различную эффективность в регуляции изученных параметров. Полученные в эксперименте результаты нашли свое подтверждение при изучении крови работников ткацкого цеха камвольного комбината (уровень шума 95 дБА) [4]. Вместе с тем, литературные данные о высоком уровне атеросклеротического поражения сосудов у рабочих предприятий с высоким уровнем шума, результаты собственных исследований интенсивности ПОЛ в крови, показателей атерогенности, нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы работников ткацкого цеха, послужили основанием для поиска соединений, обладающих как сосудистым, так и, возможно, антиоксидантными свойствами. Учитывая вышесказанное, мы поставили перед собой задачу изучить влияние шума (острый акустический стресс) и нового β_2 -адреноблокатора – бедитина, впервые синтезированного в ИТОХ НАН Армении, на окислительную модификацию белков (ОМБ) сыворотки крови. Выбор бедитина в качестве объекта исследования объясняется тем, что он обладает как сосудорасширяющим, так и антигипоксическим, антиагрегационным и антидотным эффектами, в механизмах развития которых важная роль отводится процессам свободнорадикального окисления, что подтверждается также его влиянием на метаболизм арахидоновой кислоты [5,13].

Материал и методика: Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 150-180 г, содержащихся на стандартном пищевом рационе. Подопытные животные подразделяли на 6 групп. Крысы 1-й группы (интактные) служили контролем. Крысы 2, 4, 6 групп подвергали воздействию шума уровнем 91 дБА с максимальной энергией в области средних и высоких частот в течение 2 ч. Животным 3,4,5,6 групп предварительно внутрибрюшинно вводили β_2 -адреноблокаторы бедитин или идазоксан в дозе 2 мг/кг массы. Идазоксан (“Reckitt Colman” Англия) использовали в качестве известного блокатора β_2 -адренорецепторов. Через 2 ч подопытных животных декапитировали и брали сыворотку крови на исследование.

Для оценки интенсивности спонтанной окислительной модификации белков сыворотки крови был использован метод, модифицированный Дубининой и соавт. [2], основанный на реакции взаимодействия карбонильных производных белков и шиффовых оснований с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Для проведения анализов брали сыворотку крови крыс, принятой в лабораторной диагностике [3], в количестве 0,05 мл на пробу. Осаждение белков сыворотки осуществляли 20%-ным раствором ТХУ. К денатурированным белкам приливали равный объём (1 мл) 0,1 М раствора 2,4-ДНФГ, приготовленного на 2 М растворе HCl. Контрольная проба вместо 2,4-ДНФГ содержала равный

объем 2 М раствора HCl. Инкубацию проб проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Для осаждения белков пробы центрифугировали при 3000 x g в течение 15-20 мин. Образовавшийся осадок промывали 3 раза смесью этанол-этилацетат (1:1) для экстракции липидов и непрореагировавшего с карбонильными группами окисленных белков 2,4-ДНФГ. Полученный осадок от оставшейся смеси этанолацетата подсушивали током N₂. Высушенный осадок растворяли в 2,5 мл 8 М раствора мочевины на кипящей водяной бане в течение 5 мин до полного растворения. Образовавшиеся 2,4-динитрофенилгидразоны регистрировали на спектрофотометре СФ-26 при следующих длинах волн: 356, 370 и 430 нм. Количество образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции, равный $21 \cdot 10^3$ моль⁻¹см⁻¹ [12].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы "Statistic for Windows ver. 7.0". Для количественных нормально распределённых признаков оценку статистической достоверности проводили при помощи критерия Стьюдента (*t*).

Результаты и обсуждение. В табл.1 представлены данные о степени ОМБ сыворотки крови крыс интактной группы и групп, подвергшихся воздействию шума, γ -блокаторов и их комбинированного воздействия.

Изучение карбонильных продуктов окисления белков сыворотки крови интактных животных с помощью ДНФГ выявило наличие алифатических кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального (регистрация при 356, 370 нм) и основного (регистрация при 430 нм) характера. Выявлено, что содержание алифатических кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера в 13-16 раз превышает содержание динитрофенилгидразонов основного характера (табл.1). Аналогичные данные были получены Дубининой и соавт. при исследовании ОМБ крови здоровых людей [2]. Анализ данных (табл.1) по оценке степени окисляемости белков сыворотки крови животных под воздействием шума, γ -адреноблокаторов и их комбинированного действия (2, 3, 4, 5, 6 группы) показал, что все эти факторы повышают содержание нейтральных и основных кетон-динитрофенилгидразонов в разной степени, но не влияют на их качественный состав. Наиболее высокий уровень карбонильных продуктов белков, оцениваемых с помощью ДНФГ, наблюдается в сыворотках крови животных 2-й и 6-й групп. γ -Адреноблокаторы также повышают уровни продуктов окисления белков сыворотки по сравнению с интактной группой, однако эффект бедитина выражен в меньшей степени, чем идазоксана. Так, если под действием бедитина содержание нейтральных кетондинитрофенилгидразонов, регистрируемых при длине волны 356 нм, увеличивается в 1,38 раза по сравнению с аналогичными динитрофенилгидразонами интактной группы, то под влиянием идазоксана - в 1.75 раза. Такая же картина наблюдается и при сравнении степеней повышения уровней карбонильных продуктов окисления белков сыворотки, регистрируемых при длине волны 370 нм под влиянием изучаемых γ -адреноблокаторов. Этот факт свидетельствует о том, что идазоксан, по сравнению с бедитином, в большей степени активизирует окислительные процессы, и следовательно с этой точки зрения является более токсичным (табл.1). Не исключено, что одной из причин менее выраженной окислительной деструкции белков сыворотки крови при введении бедитина, по сравнению с идазоксаном, является его способность подавлять образование супероксидного аниона $O_2^{\cdot -}$ [13]. Об этом также свидетельствуют полученные нами данные об интенсивности процессов перекисного окисления липидов в изученных образцах [11]. Это мнение подтверждается результатами исследований сравнительной токсичности γ -адреноблокаторов [7].

Важно отметить, что менее выраженная активация окислительных процессов при введении бедитина по сравнению с идазоксаном выявляется и на фоне шума (табл. 1). Так, у животных, находящихся под воздействием шума при предварительном введении бедитина, не отмечается достоверных отклонений в содержании нейтральных кетон-динитрофенилгидразонов от контрольного уровня.

Одновременно регистрируется уменьшение почти в 2 раза основных кетон-динитрофенилгидразонов по сравнению с группой, подвергающейся воздействию шума. Не исключено, что влияние бедитина на содержание нейтральных алифатических кетон-динитрофенилгидразонов и снижение содержания основных кетон-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови животных 4-й группы, возможно, является результатом влияния бедитина на функционирование антиоксидантной системы, в частности путем поддержания определённого равновесия между антиоксидантными и прооксидантными системами [2,7].

Другим важным фактом, выявленным в результате проведённых исследований, является выраженное увеличение основных кетон-динитрофенилгидразонов, регистрируемых при длине волны 430 нм. Так, например, если уровень нейтральных алифатических кетон-динитрофенилгидразонов, регистрируемых при длине волны 370 нм, при воздействии шума возрастает примерно в 2 раза по сравнению с интактной группой, то основных – в 19,9 раза. Возможно, столь существенные сдвиги в уровне основных кетон-динитрофенилгидразонов в условиях воздействия изученных факторов связаны с усиленным гликозилированием белков, что характерно для стрессовых состояний. Показано, что гликозилирование белков тесно связано со свободно-радикальными процессами, при этом содержание продуктов неферментативного гликозилирования белков в условиях окислительного стресса возрастает [14, 18].

Таблица 1. Содержание 2,4-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови белых крыс под влиянием шума и α -адреноблокаторов (в единицах оптической плотности в пересчете на 1 г белка, n = 6).

Группа животных	Условия опытов	356 нм	370 нм	430 нм
		На 1 г белка		
1.	Контроль	30,1 ± 0,9	35,0 ± 0,9	2,2 ± 0,3
2.	Шум	57,8 ± 5 p<0,001	64,4 ± 5 p<0,001	40,3 ± 3,4 p<0,001
3.	Бедитин	41,6 ± 2,5 p<0,001	45,8 ± 2,9 p<0,001	20,2 ± 1,6 p<0,001
4.	Бедитин +Шум	36,3 ± 1,9 p<0,001 p ₁ <0,01	39,8 ± 2,1 p<0,001 p ₁ <0,001	21,2 ± 1,5 p<0,001 p ₁ <0,001
5.	Идазоксан	52,7 ± 2,3 p<0,001	57,5 ± 2,7 p<0,001	26,2 ± 1,2 p<0,001
6.	Идазоксан + Шум	59 ± 6,8 p<0,001 p ₁ >0,05	66,9 ± 6,2 p<0,001 p ₁ >0,02	40,4 ± 4,2 p<0,001 p ₁ >0,05

Примечание: p – по сравнению с контролем
p₁ – по сравнению с шумом

Аналогичная картина просматривается и при анализе действия бедитина и идазоксана на исследуемые продукты окисления белков сыворотки.

Таким образом, проведенные исследования о влиянии шума, α -адреноблокаторов и их комбинированного воздействия на интенсивность окисления белков сыворотки крови белых крыс показали, что наиболее выраженное воздействие оказывает шум, а из α -адреноблокаторов – идазоксан. Предварительное внутрибрюшинное введение бедитина в дозе 2 мг/кг массы, в отличие от идазоксана, препятствует повышению содержания нейтральных динитрофенилгидразонов в сыворотке крови крыс, подвергнутых воздействию шума в течение 2 ч, что свидетельствует о его регуляторном воздействии в условиях акустического стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. Санкт-Петербург: Изд-во "Медицинская пресса", 276-282, 2006.
2. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. Вопросы мед. химии. 41, 1, 24–26, 1995.
3. Камышиников В.С. Справочник по клиничко-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва, 117, 2004.
4. Мелконян М.М. Перекисное окисление липидов и применение антиоксидантов при акустическом стрессе. Докт. диссертация, 49-52, 1988.
5. Паносян А.Г., Григорян Г.Х., Ширинян Э.А., Мартиросян О.М., Маркарян Э.А., Акопов С.Е., Габриелян Э.С. Синтез и исследование простагландиннов. Матер. IV конференции по простагландинам. Минск, 116, 1989.
6. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов–равнозначных участников метаболизма. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 3, 2-18, 2007.
7. Ширинян Э.А. Потенциальное лекарственное средство "Бедитин" – новая разработка ИТОХ. О связи между химическим строением и биологической активностью синтезированных в ИТОХ новых соединений. Ереван, 47-56, 1997.
8. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A.. Protein carbonylation in human diseases. Trends Mol. Med., 9, 169–176, 2003.
9. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A.. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin. Chem., 52, 601–623, 2006.
10. Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., et al.. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. Mass Spectrom. Rev., 24, 55–99, 2005.
11. Hunanyan L., Manukyan A., Minasyan A.*, Hakobyan N., Javroyan J., Melkonyan M.* The effects of selective alpha-adrenoblocker beditin in white rat tissues in acoustic stress conditions. Neurochemical Research, Abstracts Honoring the 100th Anniversary of H.Kh.Buniatian. 33, 6/June, pages 1163-1167, 2008.
12. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. J Biol Chem. Apr 25; 262, 12, 5488-91, 1987.
13. Panossian A., Grigorian G., Akopov S., Markarian E., Vartanian S., Gabtielian E.. Biochemical Pharmacology, 53, 11, 1753-1755, 1997.
14. Sathiyapriya V., Selvaraj N., Nandeesha H. et al. Munch G., Keis R., Wessels A. et al. Enhanced glycation of hemoglobin and plasma proteins is associated with increased lipid peroxide levels in non-diabetic hypertensive subjects. Arch Med Res. Nov; 38, 8, 822-6, 2007.
15. Stadtman, E.R.. Role of oxidant species in aging. Curr. Med. Chem., 11, 1105–1112, 2004.
16. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M.). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact., 160, 1–40, 2006.
17. Valko, M., Dieter, L., Jan, M., Mark, T.D., Milan, M., Joshua, T.. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Inter. J. Biochem. & Cell Biol., 39, 45-56, 2007.
18. Yim M.B., Kang S.-O., Chock P.B. Enzyme-like activity of glycated cross-linked proteins in free radical generation. Ann.N.Y.Acad.Sci. 899, 168-181, 2000.

Поступила 01.12.2009.