



Биол. журн. Армении, 3 (63), 2011

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ КРОВИ КРЫС ПО ТРИПТОФАНУ И ТИРОЗИНУ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВНЕШНЕГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Л.Г. ХАЧАТРЯН, Г.Г. АРЦРУНИ

Лаборатория биохимических и биофизических исследований, НИЦ, ЕГМУ

Исследовалась окислительная модификация белков плазмы крови белых беспородных крыс после воздействия внешнего электростатического поля (ЭСП) напряженностью 200 кВ/м длительностью 1 ч. При помощи флуоресцентного метода определения окисления тирозина и триптофана показано, что действие внешнего ЭСП указанных параметров приводит к интенсификации окисления исследованных аминокислот. Рассматриваются возможные механизмы влияния исследуемого фактора на окислительную модификацию белков.

Электростатическое поле – окислительная модификация белков

Ուսումնասիրվել է սպիտակ առնետների արյան պլազմայի սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացումը՝ 200 կՎ/մ 1-ժամյա արտաքին էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո: Տրիպտոֆանի և թիրոզինի օքսիդացման որոշման ֆլուորեսցենտային մեթոդի միջոցով ցույց է տրվել, որ նշված ցուցանիշերով արտաքին էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը բերում է հետազոտված ամինաթթուների օքսիդացման ինտենսիվացման: Դիտարկվում են հետազոտվող գործոնի հնարավոր մեխանիզմների ազդեցությունը սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացման վրա:

Էլեկտրաստատիկ դաշտ – սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացում

Oxidation of tryptophan and tyrosine amino acids has been studied in blood plasma proteins of white rats, under the influence of ESF at 200 kV/m during an hour. With the help of fluorescent method of estimation of tryptophan and tyrosine oxidation it was shown that the influence of external electrostatic fields of mentioned parameters intensifies the oxidation of studied amino acids (or brings to the intensification of oxidation of studied amino acids).

Possible mechanisms of the influences of studied factors on proteins oxidative modification are considered.

Electrostatic field - oxidative modification of proteins

Ранее показано, что воздействие внешних ЭСП выше фоновой напряженности приводит к интенсификации газообмена, увеличению снабжения тканей кислородом, стимулированию окислительно-восстановительных процессов, изменению структурно-функционального состояния белков [2, 3, 5, 11, 13]. Подобные эффекты ЭСП могут явиться как причиной, так и следствием окислительной модифика-

ции белков. В данной работе мы исследовали влияние ЭСП на окислительную модификацию триптофана и тирозина белков крови крыс.

Выявление окислительной модификации белков позволит объяснить определенные механизмы ответных реакций организма на воздействие исследуемого фактора.

Материал и методика. С целью выявления окислительно-модифицирующей роли ЭСП нами исследовано окисление ароматических аминокислот. Известно [6, 8, 10], что они обладают высокой чувствительностью к окислению и их рассматривают в качестве мар-керов окислительной модификации белков [7]. Для определения степени окисления триптофана и тирозина нами использована методика, в основе которой лежит факт окислительной модификации тирозиновых остатков, сопряженных с образованием битирозина, который обладает характерной флуоресценцией, и факт окисления триптофановых остатков, сопровождаемых снижением флуоресценции, характерной для триптофана [4].

Материалом для исследований служила плазма крови белых беспородных крыс массой 150-170г. Забор крови проводился всегда в одно и то же время суток методом кардиопункции [13] по 2 мл от каждого животного. Плазму выделяли из стабилизированной крови центрифугированием 3000 об/м в течение 10 мин. Опытные животные подвергались воздействию ЭСП напряженностью 200 кВ/м в течение одного часа при помощи установки конденсаторного типа [1]. Контролем служила плазма крови интактных животных. Как для контроля, так и для опыта использовано по 10 животных.

Пробы для исследований спонтанного окисления содержали 0,95 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН=7,4) и 0,05 мл плазмы, разбавленной физраствором в 10 раз для определения битирозина и 10000 раз для определения триптофана. Пробы для исследования индуцированного окисления содержали 0,85 мл 1/15М фосфатного буфера (рН=7,4), 0,05 мл плазмы, 0,05 мл смеси растворов FeSO_4 ($0,65 \cdot 10^{-4}$ М р-р) и ЭДТА ($0,85 \cdot 10^{-4}$ М р-р) в соотношении 1:1 и 0,05 мл раствора H_2O_2 ($0,6 \cdot 10^{-3}$ М). Контрольные и опытные пробы инкубировали при температуре 37 °С в течение 1-, 2 - и 24 -х ч для выявления битирозиновых сшивок и окисления триптофана. Инкубацию проводили как без индукции, так и с индукцией системой фентона. После инкубации регистрировали флуоресценцию битирозина и триптофана на спектрофлуорометре "Hitachi-MPF-4". Образовавшийся битирозин регистрировали при длине волны возбуждения 325 нм, длине испускания 415 нм, а триптофан - при 296 нм и 340 нм соответственно. Флуоресценцию выражали в условных единицах (у.е). Белок в пробах определяли по методу Лоури [9].

Оценку статистической достоверности полученных результатов проводили при помощи критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как следует из полученных данных (рис. 1,2), воздействие ЭСП изучаемых параметров приводит к интенсификации как спонтанного, так и фентон-индуцированного окисления триптофана и тирозина.

Об этом свидетельствует увеличение флуоресценции битирозина при исследованной разной длительности инкубации как при индуцированном окислении, так и при спонтанном (рис. 1).

После 1-часовой инкубации проб при спонтанном окислении воздействие ЭСП приводит к усилению флуоресценции битирозина на 64,8 %, а при индуцированном (на 44,8%. Та же закономерность наблюдалась при исследовании разной длительности инкубации. Так, после 24-часовой инкубации как при спонтанном, так и при индуцированном окислении усиление флуоресценции составляло 70,9 и 26,9 % соответственно.

Можно отметить, что эффект ЭСП при спонтанном окислении больше, чем при индуцированном. Судя по этим данным, воздействие ЭСП приводит к такой окислительной модификации тирозина, которая повышает его стойкость к окислению индуцируемой системой фентона.

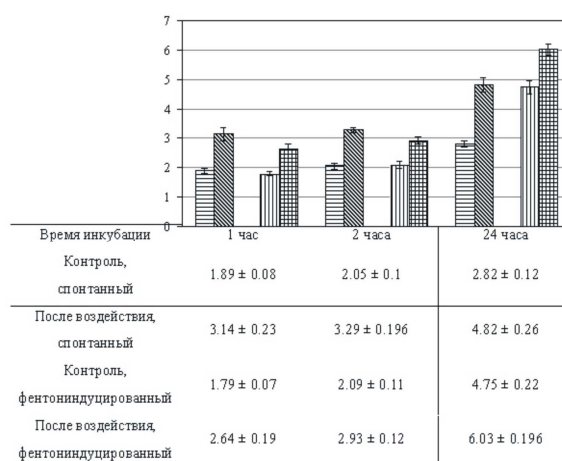


Рис. 1. Флуоресценция битирозина в плазме крови белых крыс после 1-часового воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м, в условных единицах (уе).

Об интенсификации окисления триптофана свидетельствуют данные об уменьшении его флуоресценции после воздействия ЭСП как при спонтанном, так и при фентон-индуцированном окислении (рис. 2). Как следует из приведенных данных, и в этом случае при воздействии ЭСП наблюдается ослабление окислительных потенциалов системы фентона, хотя и менее выраженное.

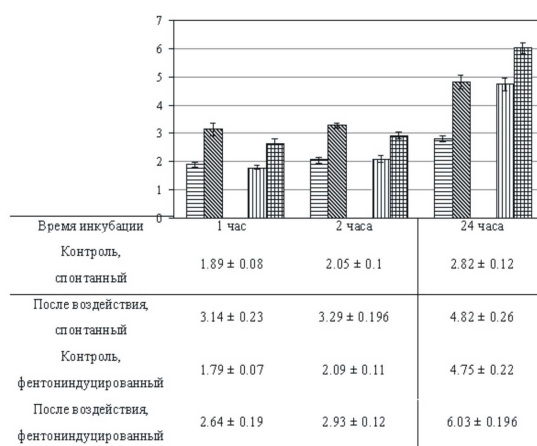


Рис 2. Флуоресценция триптофана в плазме крови белых крыс после 1-часового воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м, в условных единицах (уе).

Следовательно, механизмы интенсификации окисления исследованных аминокислот при воздействии ЭСП и системы фентона не симбатны.

Если сравнить увеличение флуоресценции битирозина между 1-часовой и 24-часовой инкубацией при спонтанном и фентон-индуцированном окислении до и после воздействия ЭСП, то можно заметить, что воздействие поля приводит к более интенсивному окислению в фентон-индуцированных пробах. Если те же сравнения проводить для выявления уменьшения флуоресценции триптофана, то наблюдается обратная картина, хотя и менее выраженная.

Так, падение флуоресценции триптофана после действия ЭСП при фентон-индуцированном окислении вдвое меньше, чем при спонтанном. Таким образом, изменения окисления при воздействии ЭСП для триптофана и тирозина хотя и однонаправлены, но различаются. Возможно, различия обусловлены спецификой положения триптофана в структуре белка. Возможно, наложение ЭСП приводит к такому изменению третичной структуры исследованных белков, которое делает их более уязвимыми для окисления триптофана.

Анализируя вышеприведенные данные, можно предположить, что интенсификация окисления исследованных аминокислот обусловлена и изменениями структуры белков плазмы крови, и интенсификацией окислительных процессов, вследствие увеличения снабжения крови кислородом. Притом в механизмах интенсификации окисления триптофана большое значение имеют структурные изменения белков. Эти наши предположения опираются на данные, приведенные в работах [5, 11, 13], где показано, что наложение внешних ЭСП может привести к структурным изменениям белков и интенсификации окислительных процессов.

Таким образом, резюмируя все вышеизложенное, можно констатировать, что *in vivo* воздействие ЭСП исследуемых параметров приводит к окислительной модификации белков плазмы крови вследствие интенсификации окисления триптофана и тирозина. Говорить о конкретных механизмах наблюдаемых модификаций на данном этапе исследований не представляется возможным. Однако можно предположить, что причиной интенсификации окисления исследованных аминокислот являются изменения структурного состояния белков плазмы и интенсификация окислительных процессов, вследствие избытка кислорода. Притом вклад этих факторов в интенсификацию окисления триптофана и тирозина неодинаков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцруни Г.Г. Камера для изучения действия ЭСП на мелкие лабораторные животные. Удост. на рац. предложение, N 134, 1983.
2. Арцруни Г.Г. К вопросу о действии электростатического поля на процессы биологического окисления. Вопр. биологии, 3, с.19-25, 1984.
3. Арцруни Г.Г. Механизмы биологической активности электростатических полей. Мед. наука Армении, XL, 3, с.70-80, 2000.
4. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода и функциональной активности клеток (жизнь и смерть, создание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. Санкт-Петербург, Изд-во "Медицинская пресса", 275-276, 2006.
5. Budi A, Legge FS, Treutlein H, Yarovsky I. Electric field effects on insulin chain-B conformation. J. Phys. Chem. B., 109, 47, 22641-22648, 2005.
6. Dougherty D. A. Cation- π interaction in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr and Trp. Science. 271, 5246. p.163-168, 1996.
7. Giulivi C., Davies K.J.A. Dityrosine: A marker of oxidatively modified proteins and selective proteolysis. Methods Enzymol. 233, p.363-371, 1994.
8. Kochar S., Dua R.D. Chemical modification of liquefying α -amylase: role of tyrosine residues at its active center. Arch. Biochem. Biophys. 240, 2, p.757-767, 1985.
9. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randal R. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 1, 265-275, 1951.
10. Stedman E. R. Role of oxidized amino acids in protein breakdowns and stability. Methods Enzymol. 258, p. 379-393, 1995.
11. Toschi F., Lugli F., Biscarinid F., Zerbetto F. Effects of Electric Field Stress on a β -Amyloid Peptide. J. Phys. Chem. B, 113, 1, 369-376, 2009.
12. Weis H.T., Baas E.Q. Cardiopuncture in the rat for repeated sampling of blood and injection. Z. Gesamle Exp. Med. 156, 4, 314-316, 1971.
13. Zhao W., Yang R. Effect of high-intensity pulsed electric fields on the activity, conformation and self-aggregation of pepsin // Food Chemistry, 111, 1, 136-142, 2006.

Поступила 20.04.2011