

8. Eastell R., Reid I.R., Boonen S., Cauley J.A., Cosman F., Lakatos P., Leung P.C. et.al. Once-Yearly Zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis // New England J. Medicine. – 2007. – Vol. 356. – P. 1809-1822.

9. R. Olivares, S.E. Rodil, H. Arzate: In vitro studies of the biomineralization in amorphous carbon films. Surf. Coat. Technol. – 2004. – №177,178. – P. 758-764.

УДК: 616.153.96 – 074:615.38

Н.В. Вавилов, А.П. Годовалов
ИЗУЧЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКА
СЫВОРОТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Кафедра иммунологии
Пермский государственный медицинский университет
им. акад. Е.А. Вагнера
Пермь, Российская Федерация

N.V. Vavilov, A.P. Godovalov
STUDY OF OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEIN IN
PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY DONORS

Department of immunology
Perm state medical university
Perm, Russian Federation

Контактный e-mail: nikione@yandex.ru

Аннотация. Изучено влияние возрастающих концентраций гидроксил-радикала на концентрацию окисленных белков в сыворотке крови. В ходе работы была разработана модификация методики определения концентрации окислительной формы белка. Показано дозозависимое влияние гидроксильного радикала на степень окисления белка сыворотки крови.

Annotation. The article is devoted to analyze the effect of increasing concentrations of hydroxyl-radical on concentration of modified proteins in blood serum. In operation, modification techniques of determine the concentration of oxidized proteins was developed. It was also demonstrated a dose-dependent effect of hydroxyl-radical on the serum proteins.

Ключевые слова: реакция Фентона, сыворотка, радикалы, перекись водорода, белок.

Keywords: Fenton reaction, serum, radicals, hydrogen peroxide, protein.

Окислительный стресс (оксидативный стресс) – процесс повреждения клетки в результате окисления, с последующим распространением повреждения во внеклеточную среду. Изучение данного вопроса началось с середины 50х

годов прошлого века, когда основным маркёром свободно-радикальных процессов служили продукты перекисного окисления липидов [2]. В живых системах атаке и дальнейшему повреждению свободных радикалов в основном подвергаются молекулы липидов, что запускает процесс, названный – перекисное окислением липидов (ПОЛ) [1]. Действию активных форм кислорода так же подвергаются молекулы ядерных и внеядерных нуклеиновых кислот [7]. Под действием оксидативного стресса меняется нативная конформация белковых молекул, вплоть до фрагментации, что отражается на их функции [5, 16]. С середины 80х годов появились методики по выявлению окисленных форм белковых молекул [5, 16], но до сих пор не появилось унифицированной методики для их измерения и не выявлены показатели, которые бы отражали уровень модификации белков.

В результате свободно-радикальных процессов могут образоваться активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота. Эти процессы стимулируют экзогенные факторы, такие как фотохимический смог, озон, пестициды, ксенобиотики, ультрафиолетовое излучение, х- и γ-лучи. (рис. 1) Кроме этого существенный вклад вносят эндогенные факторы: продукты метаболизма митохондрий, продукты микросомальных реакций, катализируемых цитохромом Р450, реакции катализируемые металлами, продукты метаболизма аргинина, продукция нейтрофилами и макрофагами, при воспалении АФК [4, 11, 15], ведущие к окислительной модификации белка (ОМБ) [3, 6].

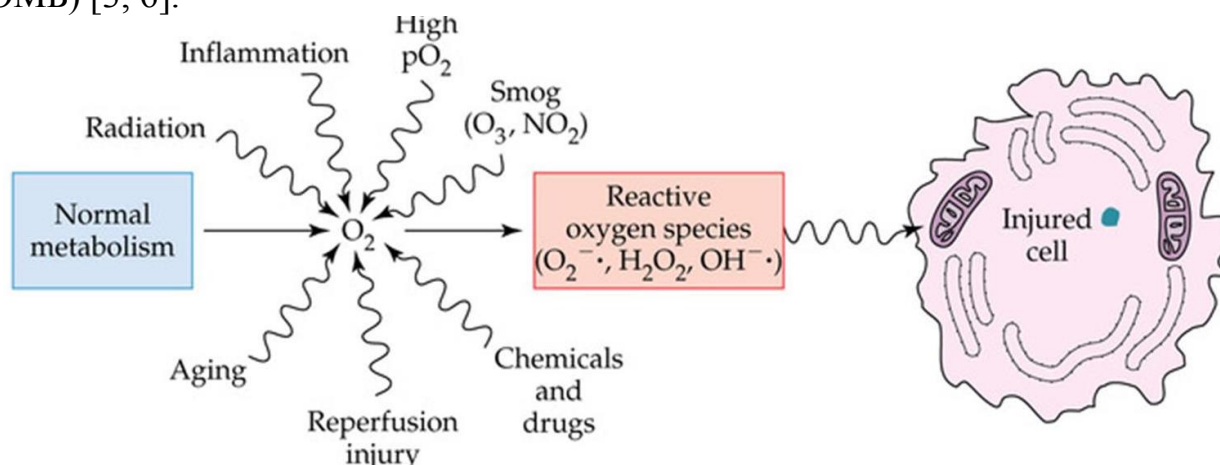
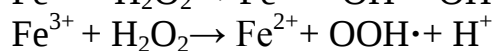
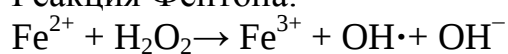


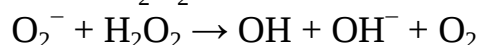
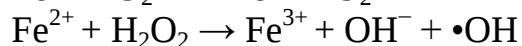
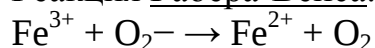
Рис. 1. Инициация свободно-радикальных процессов

В человеческом организме наиболее распространены реакции Фентона и Габера-Вейса, генерирующие гидроксил-радикалы [8, 10].

Реакция Фентона:



Реакция Габера-Вейса:



Гидроксильный радикал является одним из активаторов окислительного стресса и образуется из перекиси водорода. Физиологический уровень H_2O_2 в сыворотке крови составляет до 10 μM . Показано, что при некоторых формах заболеваний концентрация перекиси водорода в сыворотке крови увеличивается до 20-50 μM .

Под воздействием АФК на концах белковой цепи образуются карбонильные группы, в наибольшей степени это касается остатков: пролина, аргинина, лизина и тирозина. Эти фрагменты химически стабильны, что можно успешно использовать для детекции окисленных форм белка. Карбонильные производные белка, так же могут быть получены при окислительном расщеплении белковой цепочки, либо путём α -амидирования или окислением глутамил-конца белковой цепи, ведущих к образованию пептида, где N-конец блокирован карбонильной производной [3]. Кроме того, карбонильные группы могут быть введены в белковую цепочку, из-за вторичного воздействия продуктов ПОЛ (4-гидрокси-2-ноненаль, малоновый диальдегид, 2-пропеналь или акролеин) или реактивными карбонильными соединениями (кетоамины, кетоальдегиды), которые образуются в ходе реакций распада сахаров или их окисленных продуктов. Известно, что данные продукты тропны к остаткам лизина (реакции гликирования и гликозилирования). В ходе реакций гликозилирования образуются карбоксиметиллизин и пентозидин. При ПОЛ индуцированной ОМБ образуются малонилдиальдегид-лизин и 4-гидрокси-ноненаль-пептидные продукты [3, 6, 9, 14, 15].

Цель исследования – определение влияния возрастающих концентрация гидроксил-радикала на концентрацию ОМБ при помощи нашего микрометода.

Материалы и методы исследования

Исследована сыворотка периферической крови 10 практически здоровых доноров. В работе использовали следующие концентрации H_2O_2 0, 5, 10, 15, 50, 250, 500 μM . Инициацию реакции Фентона проводили с помощью 10 μM 100 μM $FeSO_4$. Время действия образовавшихся гидроксильных радикалов на сыворотку крови – 10 минут.

Оценку ОМБ проводили по методу Reznick *et al.* [12] в нашей модификации, сущность которой заключалась в пропорциональном уменьшении объемов участников реакции. Реакцию проводили с 0,1M раствором 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). В контрольной пробе использовали растворитель ДНФГ. Из данных литературы известно, что для алифатических альдегид-денитрофенилгидразонов (ДНФ) нейтрального характера спектр поглощения зарегистрирован в диапазоне 260-558 нм, основного характера 258-254 нм и 428-520 нм. Для алифатических кетон-ДНФ нейтрального характера спектр поглощения 363-370 нм, основного характера 430-434 и 524-535 нм. Образовавшиеся 2,4-ДНФ регистрировали при следующих длинах волн. При 370 нм нейтральные кетон-2,4-ДНФ, при 430 нм основные кетон-2,4-ДНФ и при 530 нм нейтральные альдегид-2,4-ДНФ. Содержание карбонилов вычисляли из пика поглощения при длинах волн:

370-430-530 нм, использовали коэффициент абсорбции (ϵ) равный $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Коэффициент молярной экстинкции ДНФ используется для расчета концентрации карбонильных производных ОМБ, где C – это концентрация ДНФ в нмоль/мл, A – показатель абсорбции:

$$\epsilon = 22,000/\text{M} = 22,000/10^6 \text{ нмоль/мл}$$

$$C = A/\epsilon = A (370-430-530 \text{ nm}) / 2.2 * 10^4/10^6$$

$$C = A (370-430-530 \text{ nm}) \times 45.45 \text{ нмоль/мл.}$$

Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка сыворотки, который определяли микробиуретовым методом.

Суммарную концентрацию окисленных белков считали путём складывания всех окисленных производных.

Для статистической обработки использовали t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследований установлено, что уровень нейтральных кетон-ДНФ сыворотки крови здоровых доноров составил $1,24 \pm 0,15$ нмоль/мг белка (контрольная проба $0,84 \pm 0,30$ нмоль/мг белка), что соответствует результатам, полученным как в классическом варианте реакции ($p > 0,05$) [12], так и литературным данным [13]. Уровень основных кетон-ДНФ составляет $0,74 \pm 0,11$ нмоль/мг белка (контрольная проба $0,60 \pm 0,25$ нмоль/мг белка), а нейтральных альдегид-ДНФ – $0,37 \pm 0,07$ нмоль/мг белка (контрольная проба $0,44 \pm 0,20$ нмоль/мг белка) (рис. 2). Таким образом суммарная концентрация окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров составляет $2,35 \pm 0,11$ нмоль/мг белка. Выявлено дозозависимое влияние перекиси водорода на концентрацию окисленных белков. При превышении концентрации перекиси водорода наблюдается статистически значимое увеличение концентрации нейтральных кетон-ДНФ и основных кетон-ДНФ в пробах с реактивами для реакции Фентона, по сравнению с пробами без данных реактивов (рис.2). Концентрация нейтральных альдегид-ДНФ при увеличении концентрации перекиси водорода статистически значимо не изменялась.

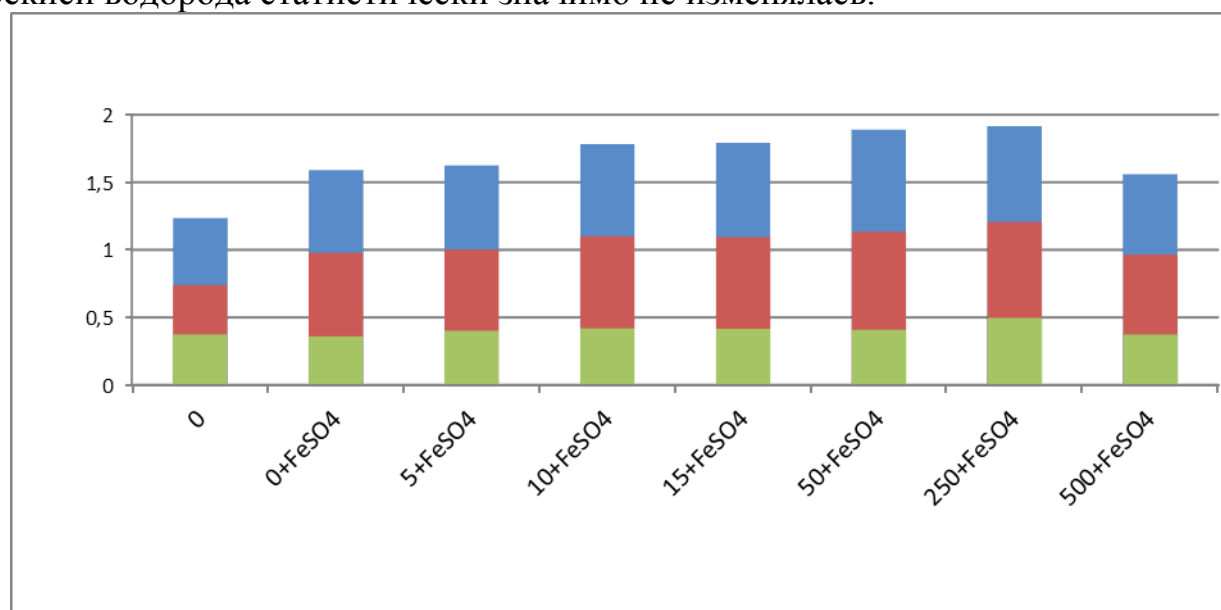


Рис. 2. Концентрация ОМБ (нмоль/мг белка) в зависимости от возрастающей концентрации перекиси водорода (μM), где синее – уровень нейтральные кетон-ДНФ, красное – основные кетон-ДНФ, зелёное – нейтральные альдегид-ДНФ

Выводы:

1. Показано, что при использовании микроварианта можно достичь снижения объема расходуемых реагентов и значительно снизить временные затраты. Результат при этом не отличается от такового в классическом варианте методики;

2. Установлено, что общая суммарная концентрация окисленных белков сыворотки крови здоровых – $2,35 \pm 0,11$ нмоль/мг белка;

3. Выявлено дозозависимое влияние гидроксильного радикала на степень окисления белков сыворотки крови.

Литература:

1. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков // – М.: Наука. – 1972. – 252 с.

2. Тарусов Б.Н. Радиобиология. – Т. 1. – 1961. – 150-151с.

3. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem. – 1997. – 272:20313– 6.

4. Chakravarti, B. & Chakravarti, D. N. (2007) Oxidative modification of proteins: age - related changes . Gerontology 53: – P. 128-139.

5. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects// J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262, № 20. – P. 9895-9901.

6. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J. – 1997; – 324:1 –18.

7. Floyd, R. A. & Carney, J. M. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress . Ann. Neurol. 32 Suppl : –1992. – 22-27.

8. Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G. The Fenton reagents // Free Radical Biology and Medicine. – 1993. – Vol. 15(4). – P. 435-445.

9. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. NY: Oxford Univ. Press; 1999.

10. Koppenol W.H. The Haber-Weiss cycle – 70 years later // Redox Report. – 2001. – Vol. 6(4). – P. 229-234.

11. Pacifici R. E., Davies K. J. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free - radical theory of aging revisited. Gerontology 37: – P. 166-180.

12. Reznick A.Z., L. Packer Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. METHODS IN ENZYMOLOGY. – Vol. 233. – 1994. – P. 357-363.

13. Sheth J.J. Genoprotective Effect of Indian Gentian in Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM): Comet Assay, Sister Chromatid Exchange and Protein Oxidation Studies. Int J Hum Genet, 11(2):2011. – P. 83-88.

14. Stadtman , E. R. Role of oxidant species in aging. Curr. Med. Chem. 11 – P. 1105-1112.
15. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radic Biol Med 2000;28:1685- 96.
16. Wolff, S.P., Dean, R.T. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. Biochem J. 1986 Mar 1;234(2). – P. 399-403.

УДК 616.893-053.8

А. В. Варданян, Д.С. Саркисян
ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА, АМИГДАЛИ И
ЯДРА МЕЙНЕРТА НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА,
ИНДУЦИРОВАННОЙ АБ 25-35

Институт физиологии Национальной академии наук республики Армении
им. Л.А. Орбели
Ереван, Республика Армения

A.V.Vardanyan, D.S. Sarkisyan
RESEARCH HIPPOCAMPAL NEURONS, THE AMYGDALA AND
THE NUCLEUS MEYNERT MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE,
INDUCED AB 25-35

Institute of physiology of National Academy of sciences
Yerevan, Armenia

Контактный e-mail: anahit5551786@mail.ru

Аннотация. В статье рассмотрено исследование относительной степени выраженности постстимульных проявлений активности ряда из ученых структур (в нейронах гиппокампа на высокочастотную стимуляцию ЭК, нейронах Ам и ЯМ на высокочастотную стимуляцию гиппокампа), в условиях более длительных сроков (13-28 нед) выдерживания животных, в сравнении с нормой, что привело к следующему заключению. ТД в подавляющем количестве случаев испытаний оказалась заниженной, а тетаническое возбуждение – во всех случаях, что полагает отсутствие восстановления соотношения возбудительных и депрессорных постстимульных эффектов с удлинением сроков испытаний и свидетельствует о истощении компенсаторных возможностей, обеспечиваемых постстимульными депрессорными эффектами. В ряде случаев отсутствие выраженной депрессии, полагаемой нами в качестве протекторной в настоящем исследовании, создает необходимость привлечения фармакологической интервенции с целью ее усиления, что является предметом последующих сообщений.