

УДК 616.72-002: 577.122.8

К. Дворщенко, д-р біол. наук, О. Берник, канд. біол. наук,
Є. Тіхова, асп., А. Вовк, студ., О. Корокий, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАПАЛЕННЯ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ ЩУРІВ

Досліджено продукти вільнорадикально окиснення білків у сироватці крові щурів за умов локального гострого запалення задньої кінцівки, та при застосуванні хондропротектора. Встановлено зниження вмісту тіолових груп білків та накопичення альдегід і кетон-динітрофенілгідрозонів. Застосування хондропротектора "Драстоп" призводило до зростання рівня білкових тіолових груп та зниження ступеня окисної модифікації білкових молекул.

Ключові слова: окисна модифікація білків, тіолові групи, захворювання суглобів, хондропротектори.

Вступ. До поширених захворювань опорно-рухового апарату належать хвороби суглобів, патологія яких складається з двох основних форм: артритів (запальні ураження суглобів) та артрозів (дистрофічно-дегенеративні ураження). Запалення супроводжує обидва типи захворювань, але при артриті запалення є первинним, а при артрозі спочатку відбувається деформація суглобу, до якої поступово приєднується запальний процес [1].

Важливу роль у розвитку та прогресуванні запалення у суглобах відіграє оксидативний стрес, який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами та за рахунок гіпоксичних процесів при роботі суглобів, що призводить до пошкодження синовіальних клітин, деструкції хрящової тканини, ерозії кісток та суглобових поверхонь. Крім того, зниження антиоксидантного захисту клітин також сприяє формуванню патології суглобів [2].

В зв'язку з вище наведеним, важливим питанням є пошук засобів для відновлення суглобів. На сьогоднішній день встановлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту хондроїтин сульфату, який є природнім компонентом міжклітинної речовини хряща поряд з гіалуроновою кислотою та глюкозаміном сульфатом. Хондроїтин сульфат являє собою сульфатований протеоглікан, в якому сульфат ковалентно приєднаний до молекули хондроїтину. Він підтримує пружність та щільність хряща [3]. Тому дослідження препаратів, основу яких складає хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. В наших експериментах було досліджено препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтин сульфат.

Метою роботи було дослідити дію препарату "Драстоп" на окисну модифікацію білків та рівень сульфгідрильних груп у сироватці крові при гострому локальному запаленні задньої кінцівки щурів.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділяли на три експериментальні групи. Моделювання набряку кінцівки щурів викликали субплантарним введенням 0,1 мл 1% розчину каррагі-

нану у задню праву кінцівку тварини [4]. Третій групі тварин за одну годину до введення каррагану внутрішньом'язово вводили у терапевтичній дозі 3 мг/кг препарат "Драстоп" (об'єм речовини складав 1 мл/кг). Контрольна група щурів отримувала еквівалентну кількість фізіологічного розчину.

Вміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) та олігопептидів визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції з 2,4-динітрофенілгідрозоном [5]. Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних (SH)-груп вимірювали за методом Елмана [6]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [7]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Згідно даних літератури [8, 9], в умовах окисного стресу одним з ранніх індикаторів ураження клітин є окисна модифікація білків. Індукторами продукції ОМБ виступають активні форми кисню, збільшення вільного заліза, продукти переокисного окиснення ліпідів на фоні зниження системи антиоксидантного захисту. Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи не тільки первинну, але і вторинну та третинну їх структуру, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули. Інтенсивність окисної модифікації білків визначається особливостями амінокислотного складу білків. Акцепторними групами, що здатні перехоплювати електрони, взаємодіючи з активними формами кисню та утворювати аніон-радикали, можуть бути дисульфідні, сульфгідрильні, карбонільні, карбоксильні та аміногрупи білків. Накопичення таких модифікованих білків порушує нормальне функціонування клітини та сприяє розвитку різних патологічних станів в організмі в цілому [10].

Встановлено, що у щурів при гострому запаленні задньої кінцівки, індукованого карраганом, у сироватці крові спостерігається збільшення рівня окисно-модифікованих білків (табл. 1). Зокрема, зростає рівень нейтральних альдегідних продуктів (макс. абсорбції при 356 нм) – в 1,8 раза та нейтральних кетонних продуктів ($E_{max} = 370$ нм) відповідно – в 1,7 раза порівняно з контролем. За тих же умов експерименту у сироватці крові кількість основних альдегідних продуктів (максимум поглинання при 430 нм) збільшується в 1,6 раза відносно контрольної групи тварин, при цьому вміст основних кетонних продуктів ($E_{max} = 530$ нм) залишається на рівні контролю (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора, ум.од. × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 4)

Показник	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
	356 нм, альдопохідні	370 нм, кетопохідні	430 нм, альдопохідні	530 нм, кетопохідні
Контроль	0,134 ± 0,014	0,114 ± 0,012	0,092 ± 0,009	0,043 ± 0,005
Каррагінан	0,232 ± 0,021*	0,193 ± 0,021*	0,141 ± 0,015*	0,051 ± 0,005
Каррагінан + Драстоп	0,161 ± 0,015#	0,132 ± 0,013#	0,113 ± 0,012#	0,052 ± 0,006

* – p < 0,05 відносно контролю; # – p < 0,05 відносно групи тварин, яким вводили каррагінан

При введенні препарату "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові спостерігається зниження ступеню окисної модифікації білків (табл. 1): знижується вміст нейтральних альдегідних продуктів – в 1,4 раза, нейтральних кетонних продуктів – в 1,5 раза та основних альдегідних продуктів – в 1,3 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю гострого локального запалення.

Другим важливим критерієм білкової модифікації є окиснення їх сульфгідрильних груп, яке може відбуватися як прямим, так і ферментативним шляхом за участю глутатіонпероксидази та гідроперекисей ліпідів.

Швидкість і характер окиснення сульфгідрильних груп залежать від багатьох чинників: концентрація реагентів, рН, температура, рКа, просторове розташування SH-груп у білку та їх мікрооточення [11].

Встановлено, що за умов гострого запалення у сироватці крові щурів вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 1,5 раза, білкових та загальних SH-груп – в 1,7 раза відносно контролю (табл. 2). Встановлене зниження вмісту сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов гострого запалення, індукованого каррагінаном, свідчить про накопичення ковалентних зв'язків за участю цистеїну та метіоніну, а також про окиснення SH-груп.

Таблиця 2. Вміст сульфгідрильних (SH-) груп у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора, мкмоль × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 4)

Показник	Контроль	Каррагінан	Каррагінан + хондропротектор
небілкові SH-групи	0,23 ± 0,02	0,15 ± 0,01*	0,17 ± 0,01*
білкові SH-групи	4,11 ± 0,24	2,43 ± 0,25*	3,76 ± 0,29#
загальні SH-групи	4,34 ± 0,27	2,58 ± 0,26*	3,93 ± 0,32#

* – p < 0,05 відносно контролю; # – p < 0,05 відносно групи тварин, яким вводили каррагінан

При введенні хондропротектора тваринам з каррагінан-індукованим запаленням у сироватці крові рівень білкових та загальних сульфгідрильних груп зростає в 1,5 раза відносно групи щурів, яким вводили лише каррагінан. За даних експериментальних умов вміст небілкових тіолових груп залишається на рівні групи щурів при гострому запаленні задньої кінцівки (табл. 2).

Отримані результати свідчать, що в умовах гострого локального запалення задньої кінцівки у сироватці крові зростає рівень вільних радикалів, що призводить до порушення нативної конформації білків з утворенням білкових агрегатів або фрагментів білкової молекули. Утворення карбонільних похідних білків у сироватці крові щурів при каррагінановому запаленні може відбуватися декількома шляхами. По-перше, за участю залишків проліну, аргініну, лізину, треоніну з утворенням аддуктів Міхаеля, при цьому карбонілювання аргініну та лізину супроводжується втратою одного або декількох атомів азоту. По-друге, карбонільні похідні білків можуть формуватись за участю амінокислотних залишків лізину, цистеїну та гістидину с продуктами перекисного окиснення ліпідів. Карбонільні групи білків, які утворились внаслідок перетворення карбоксильних груп під дією вільних радикалів, можуть взаємодіяти з аміногрупами, утворюючи шиффові основи, які є баластом для клітин, що дестабілізує мембрани та сприяє деструкції клітин [12].

Виявлене нами зниження сульфгідрильних груп пов'язане з виснаженням рівня небілкових низькомолекулярних тіолів (цистеїну, глутатіону, дигідролипоевої кислоти та ін.) та порушенням нативної структури і пригніченням активності тіолових ферментів за рахунок

блокування їх сульфгідрильних груп (глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази, АТФази, дегідрогенази). Крім того, зменшення рівня тіолових груп може порушувати процеси транспорту та пасивної проникності іонів крізь мембрану, а в крові зміна нативного стану тіолових груп може призвести до порушення функціонування гемоглобіну [13].

Отже, окисна модифікація викликає зміни структурної організації білків, їх агрегацію та денатурацію, що може призвести до порушення або втрати функціональної активності протеїнів (каталітичної, регуляторної, транспортної, рецепторної та ін.). Крім того, утворений пул модифікованих білків робить їх більш чутливими до протеолізу, що сприяє подальшій інтенсифікації деструктивних процесів. Окиснені білки здатні виступати в якості джерела вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів (глутатіон, аскорбінова кислота). У молекулярних механізмах вільнорадикальних процесів окисна модифікація білків може спричинити деструкцію інших молекул (ліпіди, ДНК) клітини, що сприятиме розвитку та прогресуванню захворювань [14, 15]. Відповідно, окиснені білки є не тільки показниками ступеня вільнорадикального пошкодження клітини, але і його активними співучасниками.

Виявлене зниження рівня окиснення білкових молекул у сироватці крові при введенні хондроїтин сульфату щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення пов'язано з антизапальними, антирадикальними та регенераційними властивостями препарату "Драстоп" на хрящову тканину. Хондроїтин сульфат є одним з основних компонентів екстрацелюлярно-

го матрикса хряща та є складовою протеогліканових комплексів основної речовини хрящової тканини. Він володіє вираженою гідрофільністю за рахунок наявності карбоксильної та сульфатної груп, що сприяє нормальному функціонуванню хряща та збереженню його еластичності. Хондроїтин сульфат активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також пригнічує синтез ферментів деструкції хряща (металопротеїнази 3, 9, 13, 14; катепсину-бета, лейкоцитарної еластази) [16].

Висновки. Таким чином, при гострому локальному запаленні задньої кінцівки, індукованого введенням карагану, у сироватці крові зростає рівень окисно-модифікованих білків та знижується вміст сульфгидрильних, що свідчить про загальне зміщення редокс-балансу крові у прооксидантний бік. Встановлено, що при введенні хондропротектора "Драстоп" шурам з експериментальною моделлю локального запалення в сироватці крові відбувається відновлення досліджуваних показників білкової модифікації, що пов'язано з антизапальною та антиоксидантною дією досліджуваного препарату.

Список використаних джерел

1. Man G.S. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint/ Man G.S., Mologhianu G. // Journal Medicine Life. – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 37-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Ziskoven C. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction / Ziskoven C., Jäger M., Kircher J. et al. // Cancer Journal Physiological Pharmacology. – 2011. – Vol. 89, №7. – P. 455-466. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Muzzarelli R.A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review/ Muzzarelli R.A., Greco F., Busilacchi A. et al // Carbohydrate Polymers Journal. – 2012. – Vol. 89, №3. – P. 723-739. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse/ Morris C.J. // Methods in Molecular Biology. – 2003. – Vol. 225. – P. 115-121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>
5. Дубинина Е.Е. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод ее определения/ Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О.,

Ходов Д.А., Поротов И.Г. // Вопросы медицинской химии. – 1995. – № 1. – С. 24–26. Available from: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/index.php/ru/article/PBMC-1995-41-1-24-ru>

6. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups / G. Ellman // Archives Biochemistry Biophysics. – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70–77. Available from: <http://aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/01B06.pdf>

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. Available from: <http://www.twirpx.com/file/1440496/>

8. Dahl J.U. Protein quality control under oxidative stress conditions/ Dahl J.U., Gray M.J., Jakob U. // Journal Molecular Biology. 2015. – Vol. 427, №7. – P. 1549-1563. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

9. Pajares M. Redox control of protein degradation/ Pajares M., Jiménez-Moreno N., Dias I.H. et al. // Redox Biology. – 2015. – Vol. 6. – P. 409-420. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. Breusing N. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view/ Breusing N., Grune T. // Experimental Gerontology. – 2010. – Vol. 45, №10. – P. 733-737. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Vázquez-Torres A. Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress/ Vázquez-Torres A. // Antioxidant Redox Signaling – 2012. – Vol. 17, №9. – P. 1201-1214. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Domingues R.M. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms?/ Domingues R.M., Domingues P., Melo T. et al. // Journal Proteomics. – 2013. – Vol. 92. – P. 110-131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. Meyer A. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups / A. Meyer, R. Hell // Photosynthesis Research. – 2005. – Vol. 86. – P. 435-457. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

14. Cecarini V. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism/ Cecarini V., Gee J., Fioretti E. et al. // Biochemistry Biophysics Acta. – 2007. – Vol. 1773, №2. – P. 93-104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

15. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease/ Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. // International Journal Biochemistry Cell Biology – 2007. – Vol. 39. – P. 44-84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

16. Martel-Pelletier J. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate/ Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E. et al. // Molecules. – 2015. – Vol. 20, №3. – P. 4277-4289. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 03.12.15

К. Дворщенко, д-р биол. наук, О. Берник, канд. биол. наук, Е. Тихова, асп., А. Вовк, асп., А. Короткий, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СИРОВАТКИ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ КРЫС

Исследованы продукты свободнорадикального окисления белков в сыворотке крови крыс в условиях локального острого воспаления задней конечности, и при введении хондропротектора. Установлено снижение содержания тиоловых групп белков и накопление альдегид и кетон-динитрофенилгидразонив. Применение хондропротектора "Драстоп" приводило к повышению уровня белковых тиоловых групп и снижению степени окислительной модификации белковых молекул.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, тиоловые группы, заболевания суставов, хондропротекторы.

K. Dvorshchenko, DSc., O. Bernuk, PhD., E. Tihova, PhD stud., A. Vovk, PhD stud., A. Korotkiy, PhD
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kyiv, Ukraine

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS OF BLOOD SERUM OF RATS IN EXPERIMENTAL INFLAMMATION OF RAT HIND LIMBS

It was studied products of free radical oxidation of proteins in the rat's serum under acute local inflammation of the posterior limbs and with injection of chondroprotectors. We established decrease level of protein's SH-groups and the accumulation of aldehyde and keton-dinitrophenylhydrazoniv. Administration of chondroprotector "Drastop" led to increase level of protein SH-groups upon decrease oxidative modification of protein molecules.

Keywords: oxidative modification of proteins, SH-groups, joint diseases, chondroprotectors.