

© Коллектив авторов, 2013
УДК 616.12-001-073.97:615.894.19

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА L СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЕФИЦИТА СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина, С.А. Исаков

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

Изучено влияние ингибитора NO-синтазы на окислительную модификацию белков и активность катепсина L в селезенке крыс. Установлено, что в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота снижается количество альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера, при этом увеличивается количество кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера. Указанные изменения сопровождаются увеличением активности катепсина L.

Ключевые слова: окислительная модификация белка, катепсин L, ингибитор NO-синтазы.

Катепсин L относится к группе лизосомальных цистеиновых протеиназ, которые участвуют не только в деградации белковых молекул, но и в формировании иммунного ответа [11]. Одним из важнейших иммунокомпетентных органов является селезенка, в ней концентрируются супрессорные, хелперные и часть эффекторных клеток, здесь же происходят процесс активного антителообразования и продукция гуморальных медиаторов [7].

В формировании защитных эффектов адаптации вовлечены практически все основные системы организма, в том числе и иммунная. Одним из регуляторов физиологических процессов организма является оксид азота (NO) [2]. При взаимодействии NO с супероксидным анион-радикалом (O_2^-) образуется высокоактивное соединение пероксинитрит ($ONOO^-$), который может реагировать с белками и изменять их свойства [13]. Модифицированные формы протеинов деградируют быстрее, чем их нативные аналоги под действием протеиназ [3].

Угнетение синтеза NO при некоторых патологических состояниях должно приво-

дить к уменьшению его повреждающего действия на клетки. Одним из антагонистов синтеза оксида азота является N-нитро-L-аргининметилловый эфир (L-NAME), представляющий собой неселективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы.

В связи с этим актуальным представляется изучение активности катепсина L селезенки в сочетании с оценкой окислительной модификации белков в условиях дефицита синтеза оксида азота.

Материалы и методы

Исследование проводили на 16 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280-320 г. Экспериментальной группе крыс (n=8) в течение 7 дней внутрибрюшинно вводили L-NAME в дозе 25 мг/кг [9]. Контрольной группе животных (n=8) в те же сроки осуществляли внутрибрюшинное введение физиологического раствора. Содержание и выведение животных из 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 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Немедленно после выведения животного из эксперимента точную навеску ткани селезенки помещали в холодный 0,25 М раствор сахарозы в соотношении 1/100 и гомогенизировали в течение 35 секунд при 900 об/мин в гомогенизаторе Potter S. Описанные процедуры проводили при температуре не выше 4°C.

Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали 15 мин при 14000 g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант – дополнительно при 20000 g в течение 30 мин для получения чистой цитоплазматической (неседиментируемой) фракции. Осадок, представляющий собой грубую фракцию лизосом (седиментируемая фракция), ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1%.

Активность катепсина L определяли спектрофлуориметрическим методом по A.J. Barrett и H. Kirschke [10] в седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогената и обозначали как седиментируемую и неседиментируемую активность (СА и НСА). Общую активность (ОА) рассчитывали как сумму СА и НСА. Данный показатель использовался для расчёта коэффициента лабильности лизосомальной мембраны ($K_{\text{лаб}}$), представляющего собой процентное соотношение НСА/ОА.

Для определения степени аутокаталитической активации катепсина L реакционную смесь, включающую 8 мМ ДТТ, 2 мМ ЭДТА и 0,1 мл гомогената селезенки, преинкубировали в течение 15 минут при 37°C, после чего к ней добавляли 20 мкМ N-CBZ-Phe-Arg-7-амидо-4-метилкумарина и инкубировали 60 минут при 37°C [1]. Степень аутокаталитической активации катепсина L оценивалась по коэффициенту отношения значения активности фермента после прекаталитической инкубации к параллельно определяемому значению активности без преинкубации (коэффициент активации).

Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой [2], после осаждения нуклеиновых кислот 10%-ным раствором стрептомицина сульфата. Степень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 грамм белка в пробе.

Статистический анализ данных проводили по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Изменение активности катепсина L селезенки крыс под влиянием ингибитора NO-синтазы. При сопоставлении активности катепсина L контрольной и экспериментальной группы была отмечена однонаправленная тенденция увеличения активности и коэффициента лабильности (табл. 1).

Таблица 1

Значения активности катепсина L селезенки крыс контрольной и экспериментальной групп (M±s)

		нмоль/с*г белка	нмоль/с*г ткани
контроль (n = 8)	НСА	1,516±0,444	0,135±0,015
	СА	8,222±2,271	0,166±0,008
	ОА	9,738±2,613	0,300±0,015
	$K_{\text{лаб}}$ (%)	15,701±2,696	44,769±3,183
L-NAME (n = 8)	НСА	3,606±1,119*	0,312±0,043*
	СА	12,064±2,875*	0,166±0,011
	ОА	15,669±3,429*	0,478±0,040*
	$K_{\text{лаб}}$ (%)	23,059±5,083*	65,167±3,870*

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05).

Из приведенных данных следует, что под действием L-NAME общая активность катепсина L возрастает преимущественно за счёт внелизосомальной фракции.

Коэффициент лабильности характеризует проницаемость лизосомальной мембраны и косвенно говорит о распределении катепсина L между первичными и вторичными лизосомами. Данный показатель в экспериментальной группе статистически значимо повышается по сравнению с контрольной. Поэтому представляется вероятным, что увеличение неседиментируемой активности объясняется увеличением уровня секреции катепсина L.

К настоящему времени аутокаталитический механизм активации был описан для многих цистеиновых протеиназ, в том числе и для катепсина L [9]. Результаты изучения активации катепсина L в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота, показывают, что L-NAME в дозе 25 мг/кг оказывает влияние на аутопроцессинг данного катепсина. Оценка аутокаталитической акти-

вазии катепсина L продемонстрировала однонаправленную тенденцию: коэффициент активации для экспериментальной группы оказался статистически значимо ниже показателя контрольной группы как для HCA ($0,667 \pm 0,064$ против $1,275 \pm 0,185$ соответственно, $p < 0,05$), так и для CA ($0,357 \pm 0,097$ и $1,037 \pm 0,082$ соответственно $p < 0,05$). На основании полученных данных можно предположить, что большая по сравнению с контролем часть молекул катепсина L при данной модели находится в активной форме.

Оценка степени окислительной модификации белка в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота.

На рисунке 1 представлены данные об уровне спонтанной ОМБ в контрольной и экспериментальной группах. Статистически значимые различия отмечены на длинах волн 530 нм, 254 и 270 нм, что свидетельствует об увеличении кетондинитрофенилгидразонов и снижении алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов [5].

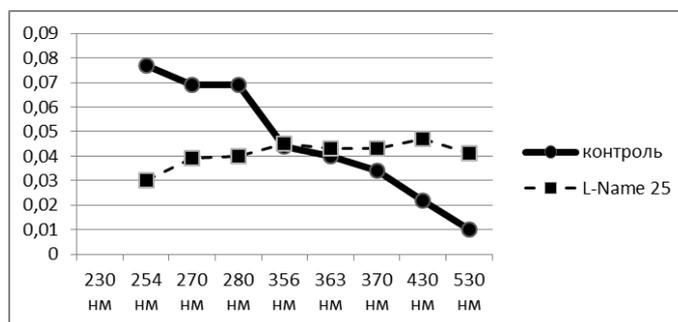


Рис. 1. Значения спонтанной ОМБ в контрольной и экспериментальной группах

Карбонильные производные белков – это стабильные продукты, которые образуются при участии аминокислотных остатков лизина, цистеина и гистидина [6], наиболее реактивные из них альдегидные формы [12]. Важным следствием окислительной модификации белков является инактивация ферментов альдегидами. Отмечено, что альдегиды способны связываться с остатками цистеина в со-

ставе ряда ферментов, что приводит к утрате их активности [6]. Таким образом, увеличение активности цистеиновой протеиназы катепсина L может объясняться снижением ингибирующего воздействия альдегидных форм.

В последние годы было обнаружено, что NO[•] при низкой концентрации вызывает гиперполяризацию клеточной мембраны. В результате наблюдается увели-

чение уровня цитозольного Ca^{++} , что сопровождается активацией протеолитических ферментов [2]. Активность ферментов, в том числе и протеолитических, сильно меняется при изменении состава микроокружения. Активность протеаз изменяется в присутствии ряда катионов и анионов, среди активаторов наибольшее внимание уделяют катионам кальция [4]. Повышение уровня цитозольного Ca^{++} и неконтролируемый запуск каскада Ca^{++} -зависимых реакций вызывает гибель клетки (апоптоз и некроз) [2].

Таким образом, возможно, что наблюдаемое нами повышение активности катепсина L является ответом на развитие воспалительных процессов и апоптоза клеток, причём мишенью действия катепсина L при данной модели являются окисленные белки. Это приводит к быстрому устранению поврежденных макромолекул и усилению их обновления за счет синтеза.

Выводы

Воздействие ингибитора синтеза NO приводит к повышению активности катепсина L преимущественно за счет внелизосомальной фракции, с увеличением доли активных молекул. Указанные изменения могут объясняться снижением инактивирующего влияния продуктов окислительной модификации белков.

Литература

1. Борискина М.А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания: дис. ... канд. мед. наук / М.А. Борискина. – Рязань, 1996. – С. 45-46.
2. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е.Е. Дубинина. – СПб.: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
3. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, №6. – С. 5-15.
4. Лысенко Л.А. Протеолитическая регуляция биологических процессов / Л.А. Лысенко, Н.Н. Немова, Н.П. Канцерова. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. – 482 с.
5. Окислительная модификация белков и олигопептидов у больных хроническими дерматозами с синдромом эндогенной интоксикации / Т.В. Копытова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2009. – №6. – С. 25-29.
6. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. – №1. – С. 74-78.
7. Шапкин Ю.Г. Значение селезенки в иммунном статусе организма / Ю.Г. Шапкин, В.В. Масляков // Анналы хирургии. – 2009. – №1. – С. 9-12.
8. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота / М.В. Покровский [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т. 71, №2. – С. 29-31.
9. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro / R. Menard [et al.] // J Biol Chem. – 1998. – Vol. 273, №8. – P. 4478-4484.
10. Barrett A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, cathepsin L / A.J. Barrett., H. Kirschke // Methods in Enzymol. – 1981. – Vol. 80. – P. 535-561.
11. Conus S. Cathepsins and their involvement in immune responses / S. Conus, S. Hans-Uwe // Swiss medical weekly. – 2010. – P. 1-12.
12. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes / P.A. Grimsrud [et al.] // The journal of biological chemistry. – 2008. – Vol. 283, № 32. – P. 21837-21841.
13. Glyanko A.K. Physiological role of nitric oxide (NO) at vegetative organisms / A.K. Glyanko, N.V. Mitanova, A.V. Stepanov // Journal of stress physiology & biochemistry. – 2009. – Vol. 5, №3. – P. 33-52.

**OXIDIZING UPDATING OF PROTEINS AND CHANGE
OF ACTIVITY CATHEPSIN L RATS SPLEEN IN THE CONDITIONS
OF MODELING DEFICIENCY OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS**

J.V. Abalenihina, M.A. Fomina, S.A. Isakov

Influence inhibitor synthesis NO-synthase on activity cathepsin L and oxidising updating of proteins in a spleen of rats is studied. It is established that in the conditions deficiency of nitrogen oxide synthesis the quantity aldehyde-dinitrofenilgidrazons of neutral and basic character decreases, the quantity keton-dinitrofenilgidrazons neutral character with one-stage increase in activity cathepsin L thus increases.

Keywords: oxidative modification of protein, cathepsin L, nitrogen oxide.

Абаленихина Ю.В. – ассист. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9.
E-mail: abalenihina88@mail.ru.

Фомина М.А. – к.м.н., доц. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.