

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС
ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ
НИТРИТА НАТРИЯ И *m* – ТОЛУИДИНА ПО
КОНЦЕНТРАЦИИ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ И МУЦИНОВ**

АВТОРЕФЕРАТ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

Студентки 5 курса 531 группы

Специальности 06.05.01

Биоинженерия и биоинформатика

Биологического факультета

Самойловой Екатерины Сергеевны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

А.А. Галицкая

подпись, дата

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

С.А. Коннова

подпись, дата

Саратов 2018

Введение. В современном мире производство продуктов питания, сельскохозяйственная деятельность не обходятся без применения различных химических веществ, среди которых помимо безвредных пищевых добавок есть и токсичные вещества. К таким токсикантам относятся, например, нитраты и нитриты, используемые в виде удобрений для растений, консервантов в мясной продукции, а также амины, которые образуются, например, при копчении продуктов. Опасность заключается во взаимодействии данных веществ, приводящем к образованию канцерогенных нитрозаминов и нитрозамидов, воздействие которых способно вызвать различные патологии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в том числе и рак.

Рак желудка является широко распространенным тяжелым онкологическим заболеванием во всем мире. В связи с этим важной задачей является контроль состояния слизистой оболочки ЖКТ как фактора устойчивости или подверженности раку желудка и предшествующим ему заболеваниям. С этой точки зрения важными показателями являются концентрация муцинов и сиаловых кислот, поскольку при различных изменениях слизистой оболочки желудка наблюдается нерегулируемая экспрессия определенных муцинов и изменение количества сиаловых кислот.

Целью данной работы являлся анализ содержания сиаловых кислот, муцинов и общих гликопротеинов в сыворотке крови, содержимом желудка и стенках желудка крыс при введении в рацион питания нитрита и *m*-толуидина.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие задачи:

1. Оценить изменение концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови, содержимом желудка и стенках желудка крыс при введении в рацион питания 0,2%-го раствора нитрита натрия и *m*-толуидина.

2. Определить влияние 0,2%-го раствора нитрита натрия и *m*-толуидина на концентрацию муцинов в содержимом желудка и стенках желудка крыс.

3. Оценить изменение концентрации общих гликопротеинов в содержимом желудка и стенках желудка крыс при введении в рацион питания 0,2%-го раствора нитрита натрия и *m*-толуидина.

4. Провести визуализацию пространственных структур муцинов человека с помощью биоинформатических ресурсов.

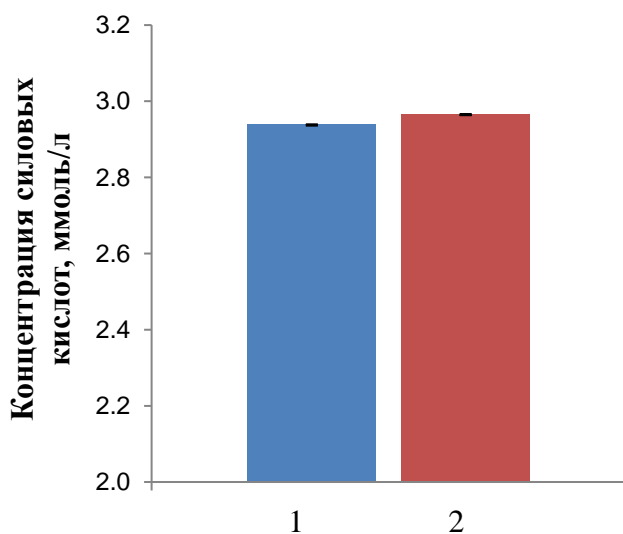
Основное содержание работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников и приложения. Основная часть включает обзор литературы по теме исследования, в котором рассмотрены вопросы, связанные общей характеристикой муцинов, их роли в патофизиологии желудочно-кишечного тракта. Уделено внимание биоинформатическому анализу муцинов человека. Описаны методы диагностики состояния слизистой оболочки желудка, роль сиаловых кислот, влияние нитритов и аминов как факторов, вызывающих патологии желудочно-кишечного тракта.

В разделе «Материалы и методы исследования» подробно описаны все использованные методики. Для биоинформатического анализа муцинов были использованы ресурсы VMD (Visual Molecular Dynamics) и Clustal Omega. Определение концентрации сиаловых кислот проводили с помощью набора "СиалоТест" (НПЦ "Эко-Сервис", Россия), определение концентрации муцинов – по методу Е. В. Стрелец и Е. Н. Егоровой (2005 г.), определение концентрации общих гликопротеинов – по методу Е. Г. Романенко и И. А. Клениной (2012 г.). Объектом исследования служили самцы белых беспородных крыс, которые подвергались химическому стрессу нитритами и *m*-толуидином в течение 9 месяцев. Все животные были разделены на 4 группы. Контрольная группа включала 10 животных, которых содержали при стандартном рационе. Экспериментальная группа (n=21) подвергалась интоксикации путем введения в рацион питания *m*-толуидина (25 мг/ 1 кг живого веса) в сочетании с раствором нитрита натрия в воде (0,2 %). В эту группу вошли животные среднего возраста 1,5 года. Дополнительно были

выделены 2 группы животных: молодые возрастом до года ($n= 11$), и старые возрастом более двух лет ($n= 10$).

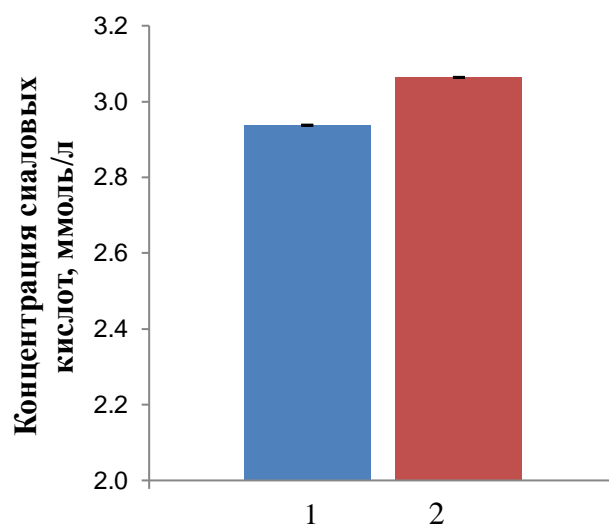
Для исследования использовали сыворотку крови, содержащее желудков и желудка животных, полученные после выведения их из эксперимента.

На первом этапе исследования определяли изменение концентрации сиаловых кислот после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина спектрофотометрическим методом. Было показано, что в контрольной группе концентрация сиаловых кислот в сыворотке крови составила $2,938 \pm 0,059$ ммоль/л. При сравнении контроля с опытной группой достоверного различия нет, что соответствует литературным данным. У старых животных концентрация сиаловых кислот в сыворотке крови возросла на 4% по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты представлены на рисунке 1 и рисунке 2.



1 – Концентрация сиаловых кислот в контрольной группе животных;
2 – Концентрация сиаловых кислот в опытной группе животных.

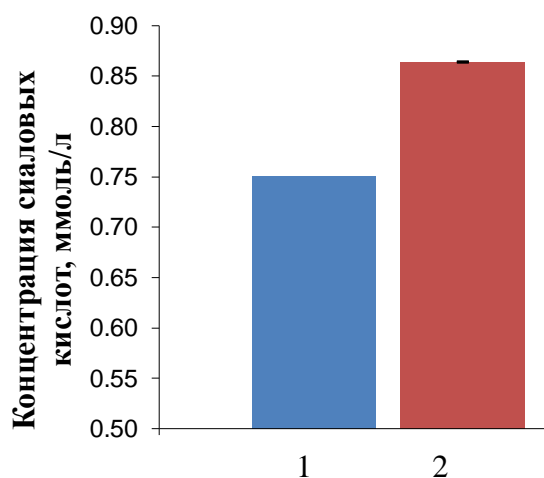
Рисунок 1 – Изменение концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.



1 – Концентрация сиаловых кислот в контрольной группе животных;
2 – Концентрация сиаловых кислот в группе старых животных.

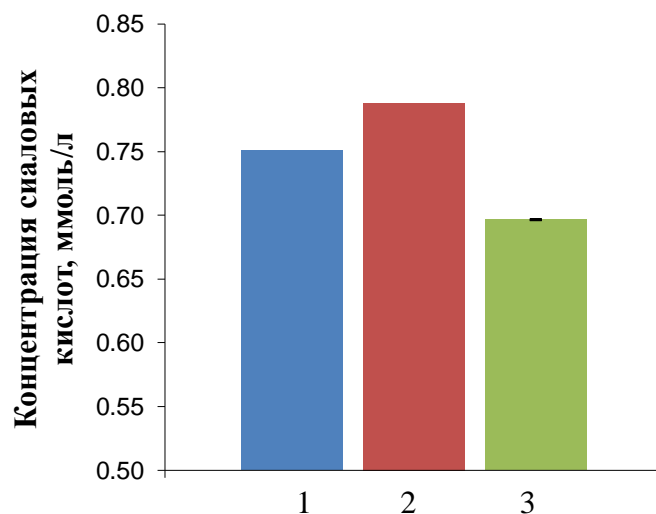
Рисунок 2 – Изменение концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови старых крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.

Нарушения структуры слизистой оболочки желудка (СОЖ) способствуют развитию патологических процессов. Эти нарушения могут сопровождаться десиалированием муцинов. Поэтому далее мы определяли изменение концентрации сиаловых кислот в содержимом желудка и в стенках желудка после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина. В содержимом желудка концентрация сиаловых кислот в контрольной группе составила $0,751 \pm 0,021$ ммоль/л. В опытной группе концентрация повысилась на 15% (рисунок 3). У старых животных концентрация увеличилась на 5%, а у молодых уменьшилась на 7% по сравнению с контролем (рисунок 4). Вероятно, с возрастом уменьшается стабильность СОЖ, она становится более подвержена воздействию внешних факторов, легче разрушается, что сопровождается высвобождением сиаловых кислот в просвет желудка. Уменьшение концентрации сиаловых кислот у молодых животных требует дальнейшего исследования.



1 – Концентрация сиаловых кислот в контрольной группе животных;
 2 – Концентрация сиаловых кислот в опытной группе животных.

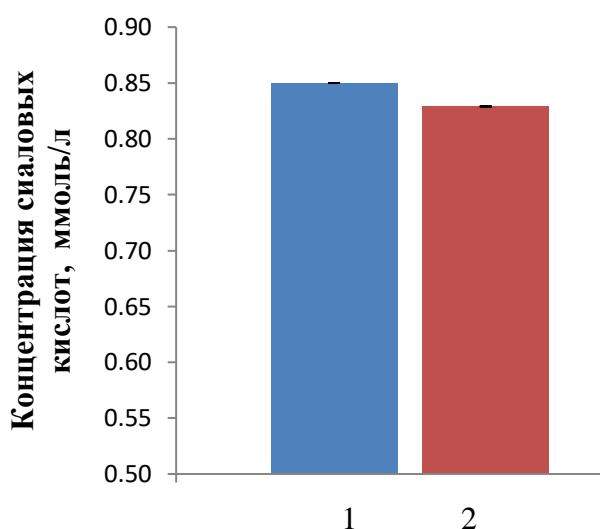
Рисунок 3 – Изменение концентрации сиаловых кислот в содержимом желудка крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.



1 – Концентрация сиаловых кислот в контрольной группе животных;
 2 – Концентрация сиаловых кислот в группе старых животных;
 3 – Концентрация сиаловых кислот в группе молодых животных.

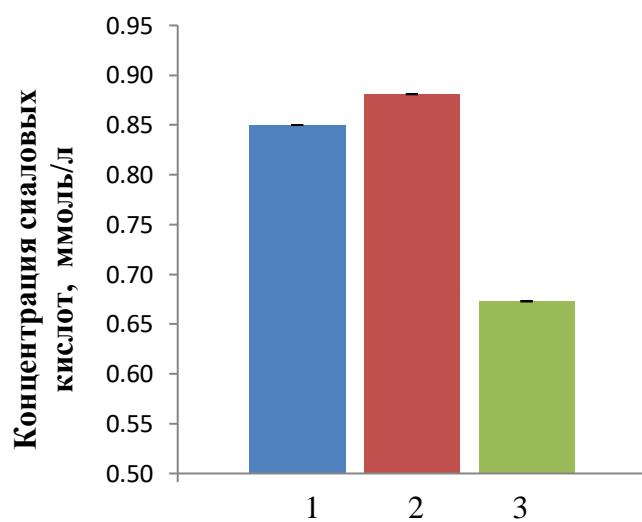
Рисунок 4 – Изменение концентрации сиаловых кислот в содержимом желудка старых и молодых крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.

В стенках желудка концентрация сиаловых кислот в контрольной группе составила $0,850 \pm 0,046$ ммоль/л. В опытной группе концентрация уменьшилась на 2,5% (рисунок 5). Вероятно, при интоксикации нитритом натрия и *m*-толуидином происходит разрушение и десиалирование муцинов в зоне воспаления, в результате чего сиаловые кислоты выходят в просвет желудка. У старых животных концентрация увеличилась на 4%, а у молодых уменьшилась на 21% по сравнению с контрольной группой (рисунок 6). С возрастом происходят нарушения в экспрессии муцинов, появляется экспрессия муцинов нехарактерных для данного органа, вероятно, что эти муцины имеют более высокую степень сиалирования.



1 – Концентрация сиаловых кислот в контрольной группе животных;
2 – Концентрация сиаловых кислот в опытной группе животных.

Рисунок 5 – Изменение концентрации сиаловых кислот в стенках желудка крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.

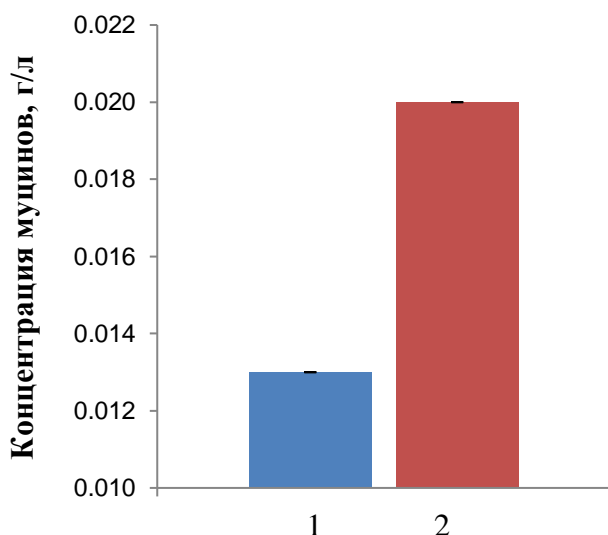


1 – Концентрация сиаловых кислот в контрольной группе животных;
2 – Концентрация сиаловых кислот в группе старых животных;
3 – Концентрация сиаловых кислот в группе молодых животных.

Рисунок 6 – Изменение концентрации сиаловых кислот в стенках желудка старых и молодых крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.

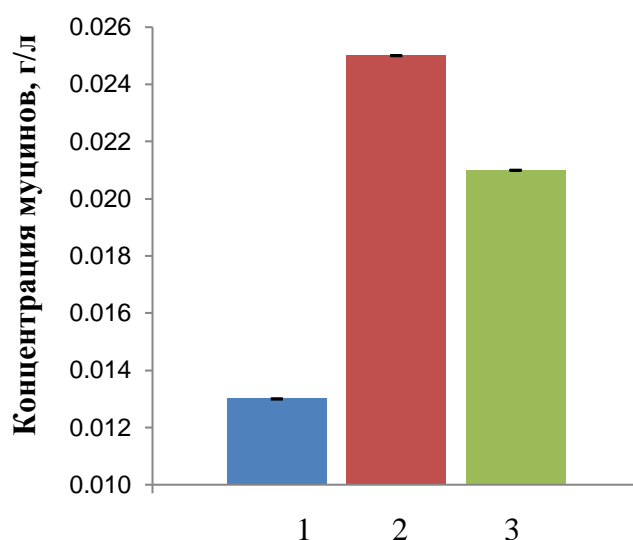
На следующем этапе исследования мы определяли изменение концентрации муцинов в содержимом желудка и стенках желудка после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина спектрофотометрическим методом. Было показано, что в контрольной группе концентрация муцинов в содержимом желудка составила $0,013 \pm 0,004$ г/л. В

опытной группе концентрация повысилась на 54% (рисунок 7). У старых и молодых животных концентрация увеличилась на 92% и 61,5% соответственно, по сравнению с контрольной группой (рисунок 8). Вероятно, сочетанное действие нитрита натрия и *m*-толуидина способствует развитию патологических процессов в СОЖ, что приводит к увеличению экспрессии муцинов в ответ на интоксикацию.



1 – Концентрация муцинов в контрольной группе животных;
2 – Концентрация муцинов в опытной группе животных.

Рисунок 7 – Изменение концентрации муцинов в содержимом желудка крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.



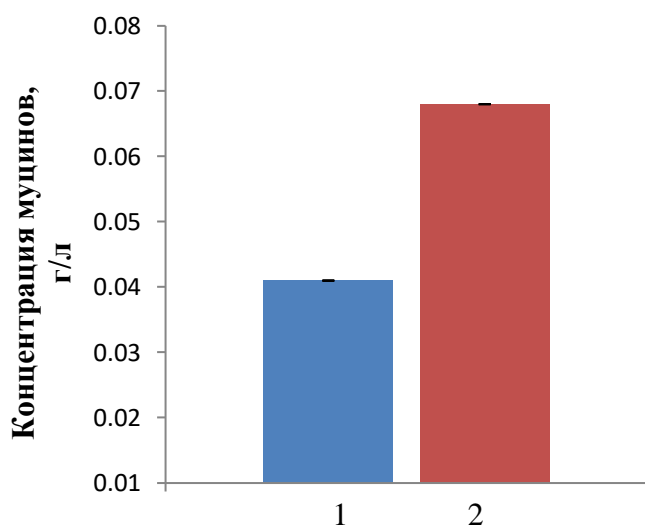
1 – Концентрация муцинов в контрольной группе животных;
2 – Концентрация муцинов в группе старых животных;
3 – Концентрация муцинов в группе молодых животных.

Рисунок 8 – Изменение концентрации муцинов в содержимом желудка старых и молодых крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.

В стенках желудка концентрация муцинов в контрольной группе составила $0,041 \pm 0,006$ г/л. В опытной группе концентрация увеличилась на 66% (рисунок 9). Видимо, в результате развития патологического процесса после токсического воздействия нитрита и амина происходит увеличение экспрессии муцинов. У старых и молодых животных концентрация уменьшилась на 42% и 32% соответственно, по сравнению с контрольной группой (рисунок 10). Механизм подобных изменений требует дальнейшего изучения.

На следующем этапе исследования мы определяли изменение концентрации общих гликопротеинов в содержимом желудка и стенках желудка после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина спектрофотометрическим методом. Было показано, что в контрольной группе концентрация общих гликопротеинов в содержимом желудка составила $0,126 \pm 0,012$ мг/мл. В опытной группе концентрация повысилась на 48% (рисунок 11). У старых и молодых животных концентрация увеличилась на 90% и 91% соответственно, по сравнению с контрольной группой (рисунок 12).

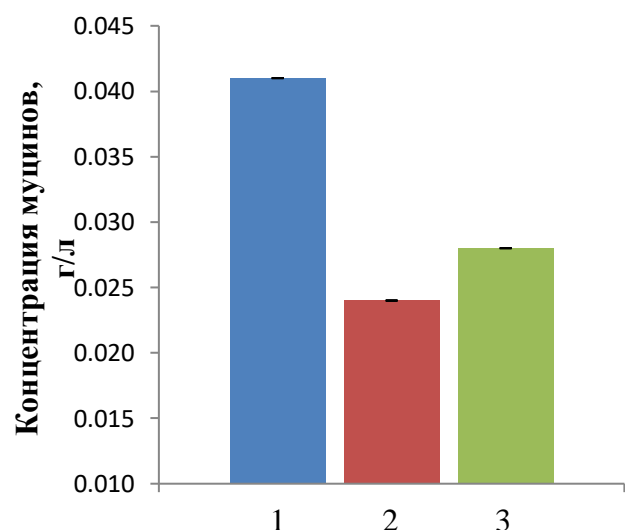
Видимо, токсическое действие нитрита и амина способствует развитию патологического процесса, в результате которого происходит увеличение синтеза общих гликопротеинов, что, очевидно, является защитной реакцией организма на интоксикацию.



1 – Концентрация муцинов в контрольной группе животных;

2 – Концентрация муцинов в опытной группе животных.

Рисунок 9 – Изменение концентрации муцинов в стенках желудка крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.



1 – Концентрация муцинов в контрольной группе животных;

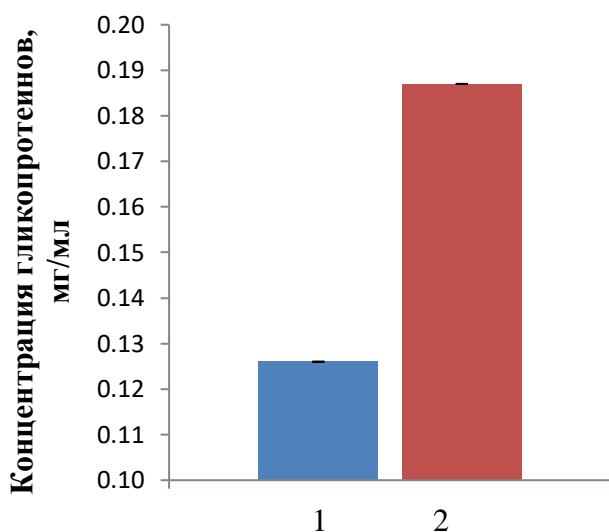
2 – Концентрация муцинов в группе старых животных;

3 – Концентрация муцинов в группе молодых животных.

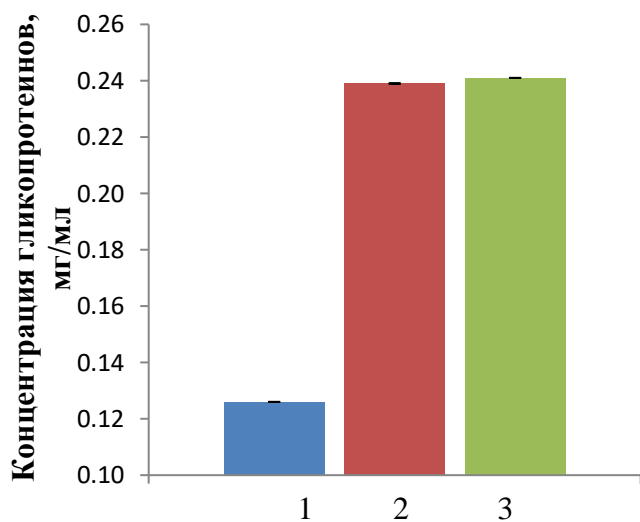
Рисунок 10 – Изменение концентрации муцинов в стенках желудка старых и молодых крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.

В стенках желудка концентрация общих гликопротеинов в контрольной группе составила $0,301 \pm 0,007$ мг/мл. В опытной группе

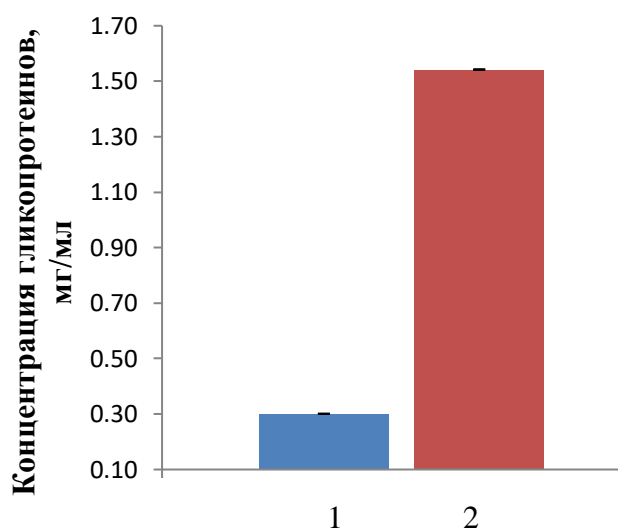
концентрация увеличилась в 5 раз (рисунок 13). У старых животных концентрация уменьшилась на 11%, а у молодых животных увеличилась в 6 раз по сравнению с контрольной группой (рисунок 14). Вероятно, сочетанное действие нитрита натрия и *m*-толуидина способствует развитию патологического процесса в СОЖ, в результате которого происходит увеличение синтеза общих гликопротеинов. Следует отметить возрастное уменьшение концентрации общих гликопротеинов у старых животных.



1 – Концентрация общих гликопротеинов в контрольной группе животных;
 2 – Концентрация общих гликопротеинов в опытной группе животных.
 Рисунок 11 – Изменение концентрации общих гликопротеинов в содержимом желудка крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.

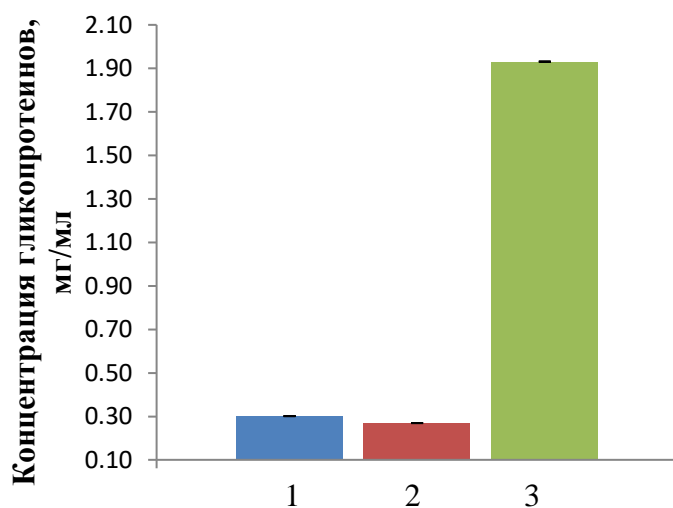


1 – Концентрация общих гликопротеинов в контрольной группе животных;
 2 – Концентрация общих гликопротеинов в группе старых животных;
 3 – Концентрация общих гликопротеинов в группе молодых животных.
 Рисунок 12 – Изменение концентрации общих гликопротеинов в содержимом желудка старых и молодых крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.



1 – Концентрация общих гликопротеинов в контрольной группе животных;
 2 – Концентрация общих гликопротеинов в опытной группе животных.

Рисунок 13 – Изменение концентрации общих гликопротеинов в стенках желудка крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.



1 – Концентрация общих гликопротеинов в контрольной группе животных;

2 – Концентрация общих гликопротеинов в группе старых животных;

3 – Концентрация общих гликопротеинов в группе молодых животных.

Рисунок 14 – Изменение концентрации общих гликопротеинов в стенках желудка старых и молодых крыс после сочетанного действия нитрита натрия и *m*-толуидина.

На последнем этапе работы был проведен биоинформатический анализ муцинов человека MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 и визуализация пространственной организации элементов структуры данных белков с помощью компьютерных программ VMD (Visual Molecular Dynamics) и Clustal Omega.

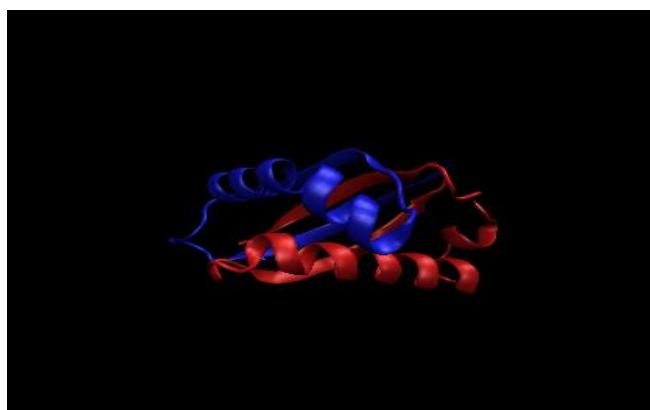


Рисунок 15 – Структура домена SEA белка MUC1 *Homo sapiens* (Human). Красным цветом показана α -субъединица, синим – β -субъединица.

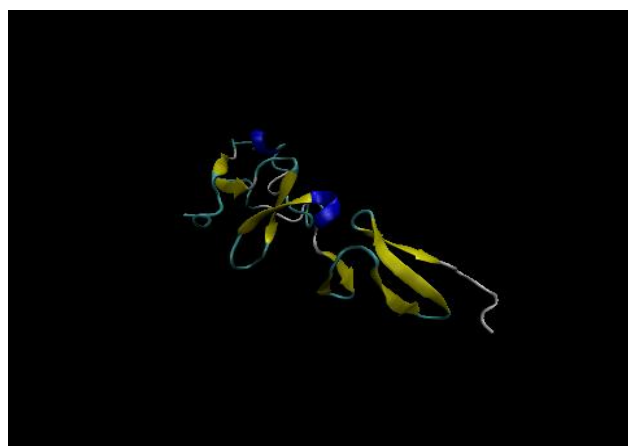


Рисунок 16 – Структура фактора фон Виллебранда (VWF) белка MUC2 *Homo sapiens* (Human).



Рисунок 17 – Кристаллическая структура неактивной формы GalNAc-T2 (N-ацетилгалактозаминотрансфераза 2) в комплексе с белком MUC5AC-3,13 *Homo sapiens (Human)*. Голубым цветом показан фермент, красным – белок.

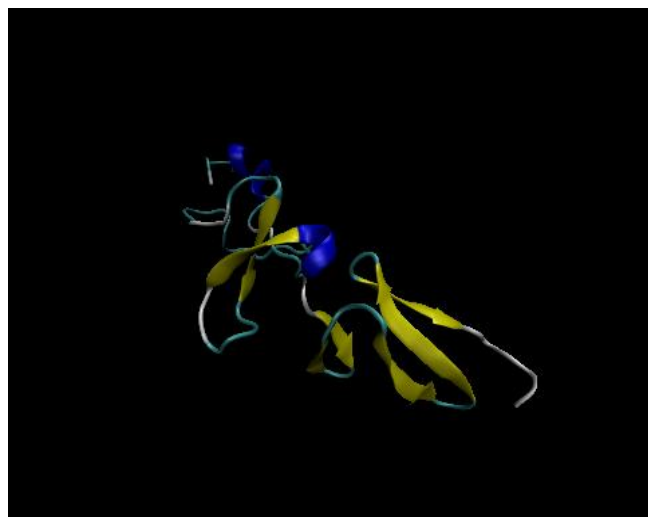


Рисунок 18 – Структура VWF белка MUC6 *Homo sapiens (Human)*.

Так как пространственная структура данных муцинов еще не определена, мы определили степень гомологии данных белков (рисунок 19).

1:	sp	Q6W4X9	MUC6_HUMAN	100.00	27.36	35.57	32.87
2:	sp	P15941	MUC1_HUMAN	27.36	100.00	23.41	28.29
3:	sp	Q02817	MUC2_HUMAN	35.57	23.41	100.00	39.67
4:	sp	P98088	MUC5A_HUMAN	32.87	28.29	39.67	100.00

Рисунок 19 – Матрица идентичности последовательностей, %.

Было выявлено, что MUC1, MUC2, MUC5AC и MUC6 гомологичны между собой, кроме MUC1 и MUC2 – между данными белками идентичность менее 25%, соответственно структуры этих муцинов могут быть как подобными, так и разными. На основании проведенного анализа можно предположить, что пространственные структуры выбранных муцинов могут обладать похожими геометриями.

Заключение. Известно, при различных изменениях слизистой оболочки желудка наблюдается нерегулируемая экспрессия определенных муцинов и увеличение количества сиаловых кислот, поэтому определение концентрации сиаловых кислот, муцинов и общих гликопротеинов отражает функциональное состояние СОЖ. В результате проведенной работы было показано, что интоксикация лабораторных животных путем длительного

введения нитрита натрия и *m*-толуидина приводит к достоверному изменению концентрации сиаловых кислот, общих гликопротеинов и муцинов в стенках желудка и его содержимом.

Выводы.

1. Проведена визуализация пространственной структуры функционально значимых доменов муцинов человека MUC1, MUC2, MUC5AC и MUC6. Определена степень их гомологичности, которая лежит в пределах от 27 до 40 %. Муцины MUC1 и MUC2 имеют степень гомологичности менее 25 %.

2. Показано, что сочетанное действие нитрита натрия и *m*-толуидина не приводит к достоверному изменению концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови животных. При этом концентрация сиаловых кислот в содержимом желудка увеличилась на 15%, а в стенках желудка увеличилась на 2,5%.

3. Выявлено увеличение концентрации муцинов в содержимом желудка на 54% и в стенках желудка на 66% при хронической интоксикации нитритом и амином.

4. Выявлено увеличение концентрации общих гликопротеинов в содержимом желудка на 48% и в стенках желудка в 5 раз при длительном сочетанном действии нитрита натрия и *m*-толуидина.

5. Показано, что степень изменения состояния слизистой оболочки желудка у старых животных выше, чем у молодых. Концентрация сиаловых кислот в содержимом желудка у старых животных увеличилась на 5%, в стенках желудка – на 4%. У молодых величина данного показателя уменьшилась на 7% и на 21% соответственно. Концентрация общих гликопротеинов в стенках желудка у старых животных уменьшилась на 11%, а у молодых увеличилась в 6 раз. Концентрация муцинов в содержимом желудка у старых животных увеличилась на 92%, у молодых – на 61,5%, что соответствует снижению концентрации муцинов в стенках желудка у старых животных на 42%, а у молодых – на 32%.