

МЕТОДИ

УДК 577.112.4+577.115.4

ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ. 1. ТИОБАРБИТУРАТАКТИВНІ ПРОДУКТИ І КАРБОНІЛЬНІ ГРУПИ БІЛКІВ

В. І. ЛУЩАК, Т. В. БАГНЮКОВА, О. В. ЛУЩАК

Прикарпатський університет ім. Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

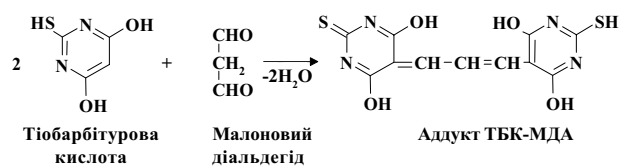
Предложен способ определения в одной пробе двух показателей оксидативного стресса — тиобарбитуратактивных продуктов и карбонильных групп (КГ) белков — на примере тканей различных органов карпа. Установлено, что оптимальное время кипячения супернатанта с тиобарбитуровой кислотой составляет 60 мин. Для солюбилизации белков использовали растворы 6 М гуанидингидрохлорида, 6 М мочевины и 5%-го додецилсульфата натрия. Содержание КГ белков предлагается определять в растворах гуанидингидрохлорида и рассчитывать его на 1 мг белка в этих растворах. Установлено, что определяемое количество их возрастает при инкубации супернатантов из почек карпа с аскорбиновой кислотой (0,1–0,5 мМ) и сульфатом железа (2,5–20,0 мкМ). При инкубации препаратов почек с 0,5 мМ аскорбиновой кислотой и 20 мкМ сульфатом железа в течение 15–120 мин наблюдается увеличение содержания КГ белков, начиная с 60-й минуты эксперимента и достигающее 816% к 120 минуте действия окислителей. Обсуждаются методические вопросы определения показателей оксидативного стресса.

К л ю ч е в ы е с л о в а: оксидативный стресс, карбонильные группы белков, тиобарбитуратактивные продукты, сульфат железа, аскорбиновая кислота.

Активовані форми кисню (АФК) є звичайними продуктами життєдіяльності аеробних організмів. Утворення їх інтенсифікується за багатьох патологічних і нормальних фізіологічних станів організму — при захворюванні, старінні, функціонуванні нейтрофілів і макрофагів, у процесі знешкодження ксенобіотиків тощо [1–5]. Унаслідок високої реакційної здатності АФК взаємодіють із різними клітинними компонентами: ліпідами, ініціюючи їхнє пероксидне окислення; ДНК, зумовлюючи точкові мутації і розриви в молекулі; білками, розриваючи пептидний зв'язок і модифікуючи бічні ланцюги амінокислот [1, 6]. Негативній дії АФК в організмі протистоїть антиоксидантна система, функціонування якої спрямовано на попередження утворення вільних радикалів, нейтралізацію їх та репарацію ушкоджень. Якщо рівновага між потужністю прооксидантної і антиоксидантної систем зміщується в бік першої, то виникає оксидативний стрес [7].

Для оцінки напряму таких змін використовують різноманітні показники оксидативного стресу — вміст пероксидів ліпідів та продуктів їхнього метаболізму, карбонільних груп (КГ) білків і низькомолекулярного антиоксиданту глутатіону [1, 4, 8, 9]. Запропоновані методи визначення зазначених параметрів іноді використовую-

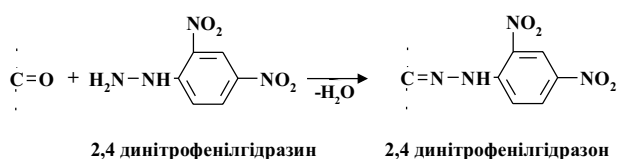
ють неадекватно і з методологічними помилками. Так, продуктами пероксидного окислення ліпідів, які визначають за допомогою тиобарбітурової кислоти (так звані ТБК-активні продукти, ТБКАП), у багатьох випадках не зовсім коректно вважають лише малоновий діальдегід. Нижче наведено реакцію взаємодії малонового діальдегіду з тиобарбітуровою кислотою (ТБК):



Насправді ТБК, крім малонового діальдегіду, реагує з деякими амінокислотами, нуклеотидами, дезоксипентозами, жовчними пігментами та іншими низькомолекулярними сполуками [1]. Це значно знижує специфічність ТБК-тесту і вимагає певних засобів для підвищення його чутливості [10].

Якщо визначення ТБКАП як показника оксидативного стресу досить поширене, то дослідження рівня окисленості білків ще не набуло широкого застосування, передусім на тваринних моделях [11, 12]. Досить детально вивченою модифікацією білкових молекул за дії АФК є утворення додаткових карбонільних груп у бічних

ланцюгах амінокислот [3, 6], вміст яких визначають найчастіше в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [13]:



Зазначені методи, ТБК-тест і визначення вмісту КГ білків, вимагають значної кількості біологічного матеріалу. Метою роботи було розроблення методу одночасного визначення двох показників оксидативного стресу в одній пробі.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на самцях коропа *Syrpinus carpio* L. з довжиною 24–29 см і масою тіла 250–340 г. Риб адаптували до акваріумних умов протягом двох тижнів. Видалені мозок, печінку, нирки і білі м'язи заморожували і зберігали при -20°C . Всі експерименти здійснювали протягом наступних двох – трьох днів. Розморожені тканини гомогенізували в середовищі такого складу: 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0) та 0,5 мМ етилендіамінтетраацетат (EDTA). Співвідношення тканини і середовища становило 1 : 10 (маса : об'єм). У досліді використовували бутилгідрокситолуол, гуанідин-НСІ, сульфат заліза (II), аскорбінову кислоту, EDTA виробництва фірми «Sigma» (США); всі інші реактиви – кваліфікації ч. д. а.

Визначення обох показників оксидативного стресу здійснювали в одній пробі. До 0,5 мл гомогенату тканин додавали 1 мл трихлороцтової кислоти до кінцевої концентрації 10% і центрифугували 10 хв при 5000 g. Вміст ТБКАП визначали в супернатанті, а КГ білків – в осаді.

Для визначення концентрації ТБКАП одержаний супернатант змішували з 1,5 мл реактиву ТБК: насиченого розчину ТБК в 0,1 М НСІ (рН 2,5), до якого додавали 10 мМ бутилгідрокситолуолу, попередньо розчиненого в невеликому об'ємі етанолу. Суміш кип'ятили на водяній бані 15–90 хв. Бутилгідрокситолуол, який є синтетичним антиоксидантом, додавали в середовище для попередження окислення ліпідів під час кип'ятіння проб. В контрольну пробу замість супернатанту вводили воду. Після швидкого охолодження до проб додавали 3 мл бутанолу, суміш інтенсивно перемішували і центрифугували в попередньому режимі. Екстракція бутанолом забарвлених комплексів продуктів пероксидного окислення ліпідів із ТБК значно підвищує специфічність методу [10]. Концентрацію ТБКАП в бутанольному шарі визначали на спектрофотометрі СФ-46 (Ленінград, СРСР) при довжині

хвилі 535 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $156\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [10].

Для визначення вмісту КГ білків до осадів, одержаних після центрифугування гомогенатів, додавали 1 мл розчину 10 мМ 2,4-динітрофенілгідразину в 2 М НСІ. В контрольний розчин замість нього додавали 1 мл 2 М НСІ. Суміш перемішували і інкубували 1 год при кімнатній температурі, після чого центрифугували (10 хв, 5000 g). Осад тричі промивали 1 мл суміші етанолу та етилацетату (1 : 1) і центрифугували в попередньому режимі. Промитий осад розчиняли протягом 30 хв в 6 М гуанідингідрохлориді, або 45 хв в 6 М сечовині, або 60 хв в 5%-му додецилсульфаті натрію (Ds-Na). Нерозчинений матеріал відділяли центрифугуванням в попередньому режимі. В супернатантах визначали вміст КГ білків на спектрофотометрі СФ-46 (λ 370 нм), використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $22\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [13].

Для вивчення окислення білків нирок *in vitro* застосовували дещо модифіковану суміш, описану в роботі [14]: 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), який містив 20 мкМ FeSO_4 та 0,5 мМ аскорбінової кислоти. Нирки коропів гомогенізували в середовищі гомогенізації у співвідношенні 1 : 5 (маса : об'єм). Суспензію центрифугували 15 хв при 15 000 g. В супернатантах визначали концентрацію білка. Реакцію починали внесенням до реакційної суміші супернатанту, який містив 1,5 мг білка. Загальний об'єм суміші становив 1 мл. Реакцію зупиняли через 15–120 хв додаванням до розчину 1 мл трихлороцтової кислоти до кінцевої концентрації 10% для дослідження динаміки накопичення КГ білків або через 90 хв в інших випадках. Препарати центрифугували 10 хв при 5000 g. Осади використовували для визначення вмісту КГ у білках. У контрольну пробу спочатку вносили трихлороцтову кислоту, а потім супернатант, після чого суспензію відразу центрифугували.

Концентрацію білка визначали в тих самих пробах, що і вміст КГ у білках, методом М. М. Bradford [15], використовуючи як стандарт бичачий сироватковий альбумін. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Показники оксидативного стресу – вміст ТБКАП і КГ білків – дають можливість оцінити окисне ушкодження різних компонентів клітини. Пероксидне окислення ліпідів, унаслідок чого накопичуються ТБКАП, є критичним для цілісності функціонування клітини та її компартментів, оскільки відбувається переважно в мембранах.

Не менш істотні порушення виникають за окисної модифікації білків, зокрема змінюється їхня гідрофобність, ізоелектрична точка, термостабільність, підвищується чутливість до протеолізу, втрачається ферментативна активність [2, 4, 6, 16–18]. Способи захисту клітинних ліпідів і білків від окисної модифікації суттєво відмінні. Якщо цілісність мембрани досить ефективно захищають ліпідпероксидази та низькомолекулярні антиоксиданти, внаслідок чого пероксиди ліпідів швидко метаболізуються, то відновлення окислених білків практично не відбувається. Вони стають мішенню для дії специфічних нейтральних та лужних протеаз, активність яких залежить від багатьох факторів, наприклад, знижується з віком, що призводить до накопичення КГ в білках [2].

Такі різні стратегії захисту клітин *in vivo* від оксидативного стресу вимагають для їхньої оцінки використання різних показників [8, 11]. На практиці це створює проблеми, оскільки для коректного визначення як ТБКАП, так і КГ білків потрібно близько 2–3 мг білка на пробу [10, 13]. Відділення білків, що осаджуються трихлороцтовою кислотою, від низькомолекулярних ТБКАП, які залишаються в супернатанті, дозволяє використовувати одну пробу для визначення обох показників.

Тривалість кип'ятіння супернатантів з ТБК неоднаково впливає на вміст ТБКАП у різних тканинах (рис. 1). У препаратах із нирок цей по-

казник за дії високої температури практично не змінюється. У препаратах тканин із мозку вміст ТБКАП після 30-хвилинного кип'ятіння порівняно з 15 хв збільшується вдвічі і залишається на цьому рівні до 90 хв. У препаратах із печінки рівень ТБКАП був також вірогідно вищим після 30–90-хвилинного кип'ятіння порівняно з 15 хв, але через 90 хв дії високої температури кількість ТБКАП вірогідно зменшується порівняно з 60 хв. У м'язах вміст ТБКАП практично не змінюється протягом 15–45 хв кип'ятіння проби, але через 60–90 хв різко зростає (у 10 разів порівняно з 15 хв). Безумовно, за таких умов експерименту відбуваються певні окисні процеси, навіть незважаючи на додавання до реакційної суміші антиоксиданту бутилгідрокситолуолу. Слід зазначити, що абсорбція світла в цих експериментах була незначною – до 0,1 од і здебільшого становила 0,05 од. Тому за нетривалого кип'ятіння проб (15–30 хв) зростає ймовірність помилки для тканин із низькою інтенсивністю метаболізму, наприклад м'язів. Оскільки визначення ТБКАП, як і інших показників стресу, доцільно проводити тільки в порівняльному аспекті (у разі зміни фізіологічного стану, дії стресорних факторів), то для одержання стабільних показників абсорбції реакційну суміш рекомендується кип'ятити протягом 60 хв. Єдиною необхідною умовою залишається дотримання ідентичної процедури оброблення всіх проб.

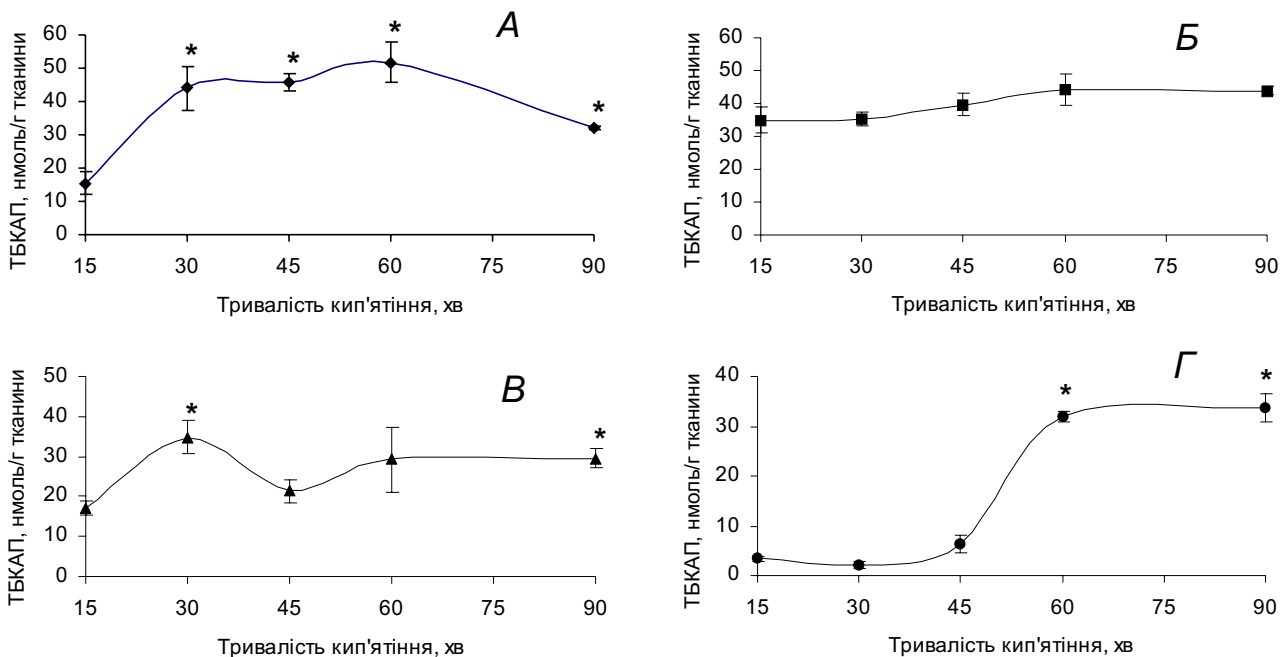


Рис. 1. Зміна концентрації ТБКАП у пробах із різних органів коропа залежно від тривалості кип'ятіння супернатантів із ТБК: А – печінка, Б – нирки, В – мозок, Г – м'язи. Дані вірогідні порівняно з кип'ятінням упродовж 15 хв, $p < 0,05$ ($n = 4-6$).

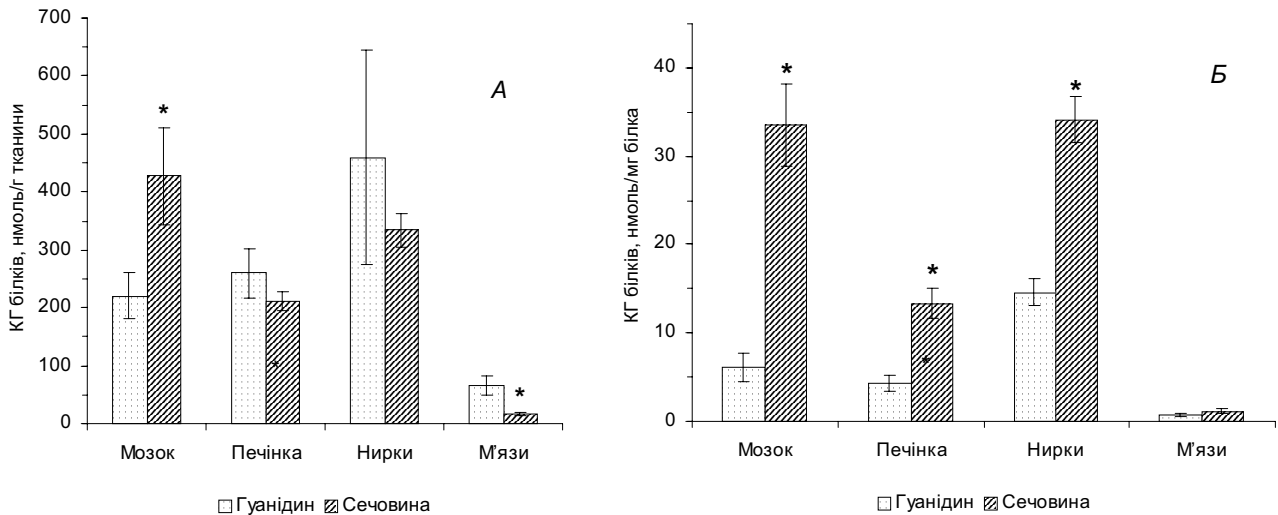


Рис. 2. Вміст КГ білків у пробах тканин коропа за використання як розчинників білкових осадів гуанідингідрохлориду і сечовини: А – КГ в білках обчислено в нмолях/г тканини, Б – в нмолях/мг білка. Дані вірогідно відрізняються від значень для розчину гуанідингідрохлориду, $p < 0,05$ ($n = 3 - 5$).

Вміст ТБКАП у тканинах коропа низький. Він зменшується в такій послідовності: нирки → → печінка → м'язи → мозок і становить відповідно 33,2; 26,6; 20,7 і 15,6 нмоль/г сирової тканини.

У разі визначення вмісту КГ для солюбілізації білкових осадів використовували 6 М гуанідингідрохлорид, 6 М сечовину і 5%-й розчин Ds-Na. В одержаних після осадження нерозчинного матеріалу супернатантах вимірювали поглинання світла 2,4-динітрофенілгідрозонами (сполуками 2,4-динітрофенілгідразину з карбонільними групами) і визначали концентрацію білка.

Ступінь розчинення білка істотно залежить від розчинника. Вміст його в розчині гуанідингідрохлориду в 4,3–7,1 разів перевищує такий в сечовині (таблиця). Концентрацію білка в розчині Ds-Na не визначали, бо цій сполуці властива інтерференція з барвником Кумасі. Кількість нерозчинного осадку зменшується в послідовності: Ds-Na → сечовина → гуанідингідрохлорид. У разі використання для розчинення білків розчинів перших двох сполук утворюється дуже рихлий осад, який важко повністю відділити від супернатанту. З огляду на це, в наступних експериментах ми відмовились від використання розчи-

ну Ds-Na для солюбілізації білкового осадку.

Вміст КГ в білках обчислювали двома способами – на 1 г сирової тканини і 1 мг розчинного білка. Зміни їх у тканинах різних органів були подібними (рис. 2, А і Б), причому дані щодо кількості КГ за солюбілізації білків у розчинах сечовини і гуанідингідрохлориду ліпше узгоджуються між собою у разі обчислення на 1 мг білка, ніж на 1 мг тканини. В останньому випадку (рис. 2, Б) кількість КГ у білках трьох тканин з інтенсивним аеробним метаболізмом – мозку, печінці і нирках – була вірогідно вищою за використання розчину сечовини порівняно з розчином гуанідингідрохлориду. Це може пояснюватися не тільки неоднаковою кількістю білкового осадку, розчиненого в розчинниках (таблиця), але й різним фракційним складом білків, оскільки ті білки, що розчинялись у розчині сечовини, могли мати вищий ступінь окислення. Останнє підтверджується даними літератури стосовно вищої чутливості до окислення у деяких білків [5], в т.ч. й аконітази [18, 19].

Доцільність застосування розчину сечовини для солюбілізації білкового осадку викликає сумнів з іншого приводу. Вміст білка, який розчиняється в розчині сечовини, дуже низький (таблиця),

Концентрація білка (мг/мл) у розчинах, використаних для солюбілізації білкових осадів ($M \pm m$, $n = 4 - 7$)

| Розчинник | Мозок | Печінка | Нирки | М'язи |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Гуанідингідрохлорид | 1,32 ± 0,33 | 1,91 ± 0,12 | 1,92 ± 0,08 | 2,40 ± 0,26 |
| Сечовина | 0,31 ± 0,09* | 0,32 ± 0,05* | 0,27 ± 0,05* | 0,52 ± 0,07* |

* Дані концентрації білка в розчині сечовини вірогідно відрізняються від таких у розчині гуанідингідрохлориду, $p < 0,05$.

що створює труднощі для точного визначення його концентрації і, отже, може істотно вплинути на результати обчислення вмісту в ньому КГ. Використання гуанідингідрохлориду для розчинення осаду дозволяє надійно визначати як концентрацію білка, так і величину абсорбції дослідних проб. Тому саме цей розчин був використаний нами в подальших експериментах.

Для створення оксидативного стресу *in vitro* широко застосовують різноманітні ферментні і неферментні системи, зокрема окисно-відновну пару аскорбінова кислота – залізо, яка генерує АФК [2, 14, 20]. Експерименти здійснювали на тканинах нирок, оскільки в них виявлено найвищу кількість КГ на 1 мг білка. Зміни концентрації іонів заліза (рис. 3) або аскорбінової кислоти в розчинах (рис. 4) за постійної концентрації однієї з цих речовин свідчать про підвищення вмісту КГ, розрахованих на 1 мг білка, зі збільшенням концентрацій обох сполук. В разі розрахунку кількості КГ на 1 г тканини виявлено подібну тенденцію, але з меншими амплітудами змін (дані не наведено).

Крім того, досліджували сумісний вплив максимальних концентрацій сірчаноокислого заліза (20 мкМ) і аскорбінової кислоти (0,5 мМ) на динаміку накопичення КГ білків залежно від тривалості інкубування їх з цими сполуками (рис. 5). Інкубування препаратів із нирок коропа з $FeSO_4$ і аскорбіновою кислотою до 45 хв не впливає на концентрацію карбонільних груп у білках. Але, починаючи з 60-ї хвилини, вміст останніх поступово і вірогідно підвищується, досягаючи збільшення у 8 разів на 120-й хв експерименту. Це свідчить про те, що вміст КГ у білках є показником оксидативного стресу та його дії на

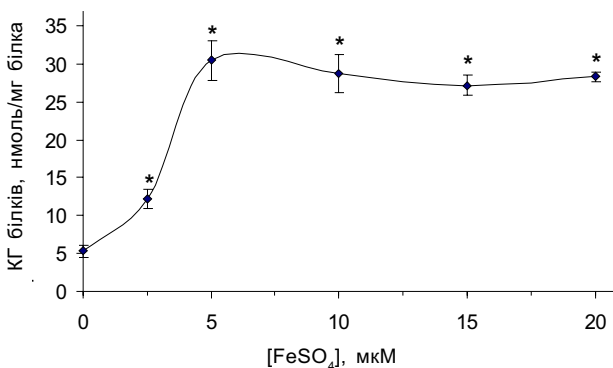


Рис. 3. Вплив різних концентрацій $FeSO_4$ на вміст КГ у білках препаратів нирок коропа при окисненні *in vitro* за присутності 500 мкМ аскорбінової кислоти (тривалість інкубації – 90 хв). Тут і на рис. 4, 5: дані вірогідно відрізняються від контрольного значення (без інкубації), $p < 0,05$ ($n = 4-5$).

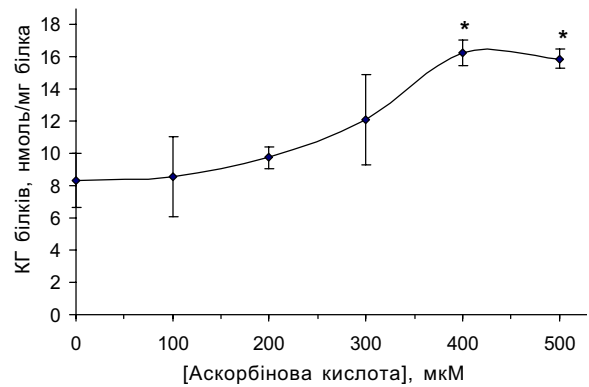


Рис. 4. Вплив різних концентрацій аскорбінової кислоти на вміст КГ в білках препаратів нирок коропа при окисненні їх *in vitro* за присутності 20 мкМ $FeSO_4$ (тривалість інкубації – 90 хв).

ступінь окисленості білків. Заслугує на увагу також наявність “лаг-фази”, тобто незмінного рівня цього параметра протягом перших 45 хв дослідження (рис. 5). Доданий в інкубаційну суміш супернатант становив близько 10% загального об’єму її. Тому внутрішні антиоксидантні резерви могли певний час протидіяти окисним процесам, захищаючи білки. Тривалість “лаг-фази” може характеризувати антиоксидантний потенціал досліджуваної тканини.

Таким чином, слід відзначити доцільність визначення різних показників оксидативного стресу, оскільки динаміка накопичення й метаболізму тих чи інших компонентів клітини є наслідком дії протилежно спрямованих про- і антиоксидантних процесів в організмі, які віддзеркалюють його адаптивні можливості. Для адекватної оцінки їх

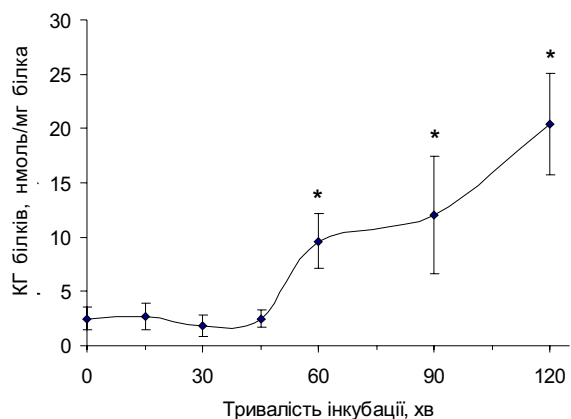


Рис. 5. Вплив тривалості інкубації препаратів білків із нирок коропа за наявності в розчині 20 мкМ $FeSO_4$ і 500 мкМ аскорбінової кислоти на вміст у білках КГ.

важливо дотримуватись уніфікованої методики. З метою підвищення специфічності ТБК-тесту доцільно використовувати антиоксидант бутилгідрокситолуол, а також екстрагувати забарвлені ТБК-активні продукти бутанолом. Для надійного визначення вмісту КГ рекомендується застосовувати 6 М розчин гуанідингідрохлориду з метою солюбілізації білків, а вміст їх обчислювати на 1 мг білка в цьому самому розчині. І, нарешті, запропонований метод визначення двох показників в одній пробі дозволяє значно економити дослідний матеріал.

Автори висловлюють подяку за технічну допомогу в експериментах О. Чаграк і Н. Борисевич.

INDICES OF OXIDATIVE STRESS.

1. TBA-REACTIVE SUBSTANCES AND CARBONYLPROTEINS

*V. I. Lushchak, T. V. Bagnyukova,
O. V. Lushchak*

Vassyl Stefanyk Prycarpathian University,
Ivano-Frankivsk;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

S u m m a r y

The method of measurement of two oxidative stress indices, TBA-reactive substances and carbonylproteins, in one sample has been proposed using different tissues of common carp. Optimal time of boiling of the preparations with thiobarbituric acid was 60 min. Protein has been solubilized in 6 M guanidine-HCl, or 6 M urea, or 5% sodium dodecylsulphate solutions. Carbonylprotein concentration has been proposed to measure in guanidine-HCl solution and to calculate per protein content in these solutions. The concentration of carbonylproteins rose during incubation of carp kidney preparations with ascorbic acid (0.1–0.5 mM) and ferrous sulphate (2.5–20.0 μM). Incubation of kidney preparations with 0.5 mM ascorbic acid and 20 mM ferrous sulphate showed that the carbonylprotein content has been elevated starting with 60 min incubation and reached 8-fold increase during 120 min. Methodological aspects of oxidative stress indices measuring are discussed.

Key words: oxidative stress, carbonylproteins, TBA-reactive substances, iron, ascorbic acid.

1. *Halliwell B., Gutteridge J. M. C.* Free Radicals in Biology and Medicine. UK: Clarendon Press. 1989. 543 p.
2. *Stadtman E. R., Oliver C. N., Starke-Reed P. E.* // *Korean J. Biochem.* 1991. **23**, N 1. P. 49–54.
3. *Stadtman E. R., Berlett B. S.* Reactive Oxygen Species in Biological Systems / Eds. D. I. Gilbert, P. Colton. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 1999. P. 657–675.
4. *Stadtman E. R., Levine R. L.* // *Ann. New York Acad. Sci.* 2000. **899**. P. 191–208.
5. *Sohal R. S.* // *Free Rad. Biol. Med.* 2002. **33**, N 1. P. 37–44.
6. *Stadtman E. R.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. **62**. P. 797–821.
7. *Луцак В. И.* // *Биохимия.* 2001. **66**, № 5. С. 592–609.
8. *Storey K. B.* // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996. **29**. P. 1715–1733.
9. *Lushchak V. I., Lushchak L. P., Mota A. A., Hermes-Lima M.* // *Amer. J. Physiol.* 2001. **280**. P. R100–R107.
10. *Rice-Evans C. A., Diplock A. T., Symons M. C. R.* Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology / Eds. R. H. Burton, P. H. Knippenberg. Amsterdam: Elsevier. 1991. P. 147–149.
11. *Bagnyukova T. V., Storey K. B., Lushchak V. I.* // *J. Therm. Biol.* 2003. **28**, N 1. P. 21–28.
12. *Ramos-Vasconcelos G. R., Hermes-Lima M.* // *J. Exp. Biol.* 2003. **206**. P. 675–685.
13. *Lenz A.-G., Costabel U., Shaltiel S., Levine R. L.* // *Anal. Biochem.* 1989. **177**. P. 419–425.
14. *Луцак В. И., Луцак Л. П.* // *Укр. біохім. журн.* 1993. **65**, № 1. 79–83.
15. *Bradford M. M.* // *Anal. Biochem.* 1976. **72**. P. 248–254.
16. *Fucci L., Oliver C. N., Coon M. J., Stadtman E. R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. **80**. P. 1521–1525.
17. *Stadtman E. R., Oliver C. N.* // *J. Biol. Chem.* 1991. **266**. P. 2005–2008.
18. *Das N., Levine R. L., Orr W. C., Sohal R. S.* // *Biochem. J.* 2001. **360**. P. 209–216.
19. *Yan L. J., Levine R. L., Sohal R. S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. **94**. P. 11168–11172.
20. *Oliver C. N., Ahn B.-W., Moerman E. J., Goldstein S., Stadtman E. R.* // *J. Biol. Chem.* 1987. **262**, N 12. P. 5488–5491.

Отримано 23.01.2004