

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 616-018:576.34
©Коллектив авторов

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКИСЛЯЕМОСТИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ И ПЛАЗМЫ КРОВИ

*О.А. Азизова, А.П. Пирязев, С.Н. Москвина, А.В. Асейчев**

ФГУ “НИИ физико-химической медицины Росздрава”; 119828 Москва,
ул. М. Пироговская, д. 1А; тел.: 246-44-71; факс: 246-44-01;
эл. почта: aseych@yandex.ru

Изучали окисляемость белков плазмы и сыворотки крови здоровых доноров при их медь-индуцированном окислении. Показано, что в образцах плазмы и сыворотки крови при их инкубации с ионами меди происходит накопление карбонильных продуктов окислительной модификации белков. Количество образующихся карбонильных продуктов зависело как от времени инкубации, так и от разведения плазмы и сыворотки крови. При одинаковых условиях окисления накопление карбонильных продуктов в сыворотке крови было выше, чем в плазме.

Ключевые слова: карбонильные продукты, окисление, ионы меди, белки.

ВВЕДЕНИЕ. Метаболические процессы, протекающие в организме при нормальных условиях жизнедеятельности, сопровождаются образованием свободных радикалов, в первую очередь, активных форм кислорода. Многочисленные исследования показали, что активация свободнорадикальных процессов играет значительную роль в развитии многих заболеваний. В последнее время это явление получило название "окислительный стресс" [1, 2]. В настоящее время установлено, что активация свободнорадикальных процессов (окислительный стресс) играет ключевую роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, онкологических заболеваний [3]. Исследование процессов, которые ведут к возникновению заболеваний при окислительном стрессе, позволило установить, что появление заболеваний обусловлено взаимодействием продуктов окисления липидов, белков и нуклеиновых кислот с компонентами клетки. Эти продукты запускают целый каскад реакций, которые ведут к изменению метаболизма клетки, генетического аппарата, экспрессии генов чужеродных белков, и в конечном счёте к трансформации клетки.

Окисленные липопротеины вносят основной вклад в развитие атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [4, 5]. Плазменный белок фибриноген также участвует в процессе атеросклероза. Известно, что повышенное содержание фибриногена является независимым фактором риска развития атеросклероза и его осложнений [6]. В тоже время фибриноген является наиболее чувствительным к окислению белком плазмы крови [7]. Поэтому возможно предположить, что окисленный фибриноген может вносить существенный вклад в развитие атеросклероза и его осложнений - тромбоза.

*Адресат для переписки

В последние 5 лет нами были получены данные, которые дают важную информацию в понимании механизма развития сердечно-сосудистых заболеваний, а именно в выяснении роли окислительно модифицированного фибриногена и липопротеинов в развитии этих заболеваний [8-10]. Нами установлено, что окисленный фибриноген активирует тромбоциты, усиливает выработку активных форм кислорода лейкоцитами, уменьшает деформируемость эритроцитов, увеличивая их агрегируемость, что в итоге приводит к изменению вязкости крови. В условиях, приближенных к условиям *in vivo*, нами впервые обнаружено, что окисленный фибриноген в крови усиливает ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов, а также изменяет параметры агрегации индуцированной коллагеном и тромбином, оказывает дисрегулирующее влияние на свёртывающую систему крови [10-12].

Одним из важных современных научных направлений исследования патогенеза различных заболеваний является изучение последствий окисления белков плазмы крови: липопротеинов, фибриногена, иммуноглобулинов, альбумина. Вместе с тем наиболее окисляемым белком плазмы является фибриноген. Для выявления патогенетической значимости окисленных белков при различных заболеваниях необходимым этапом является разработка методов их регистрации. В настоящее время наиболее распространено изучение окисления белков по накоплению карбонильных соединений [13, 14]. Этот метод позволяет определить общий пул окисленных белков. Следует отметить, что образующиеся при окислении белки в плазме крови могут распадаться, либо взаимодействовать с рецепторами на поверхности клеток. В результате за счет уменьшения времени их существования в крови измеряемая концентрация окисленных белков может быть существенно ниже их реальной концентрации. Для преодоления этих трудностей можно использовать подход, когда наряду с исходным количеством белков определяют их способность к окислению. Для этого измеряют количество продуктов окисления белков после их окисления, индуцированного *in vitro*. Это связано с тем, что количество продуктов окисления белков зависит не только от концентрации белков, но и от их предрасположенности к окислению.

В связи с тем, что окислительно модифицированные белки играют важную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, для выявления их патогенетической значимости необходимым этапом является изучение взаимосвязи между содержанием общего пула окисленных белков в плазме крови и клиническими данными больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В связи с этим актуальным является создание метода определения содержания окисленных белков и их предрасположенности к окислению в плазме крови.

Целью данной работы являлось создание метода определения окислительной устойчивости белков плазмы крови, оцениваемой по накоплению карбонильных продуктов медь-индуцированного окисления белков.

МЕТОДИКА. В работе использовали плазму и сыворотку крови здоровых доноров (n=20). Забор крови производили из локтевой вены. В качестве антикоагулянта использовали 3,8% (масса/объем) раствор трёхзамещенного лимоннокислого натрия. Соотношение крови и цитрата натрия составляло 1:9. В ходе опыта плазму и сыворотку разводили буферным раствором (150 mM NaCl, 8,1 mM NaH₂PO₄, 1,9 mM Na₂HPO₄, pH= 7,4) в 5, 10, 20, 30 раз.

Окисление плазмы проводили ионами Cu²⁺ (CuSO₄×5H₂O) в различных концентрациях.

Степень спонтанной и медь-инициированной модификации белков плазмы и сыворотки крови доноров после инкубации последних при 37°C в течении от 0 до 24 часов определяли по уровню карбонильных продуктов окисления белков по методу Levine и соавт. [13, 14]. Для этого к 0,2 мл исследуемых образцов добавляли 1,0 мл 0,0025 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2,5 М HCl, а в контрольные образцы - 1,0 мл 2,5 М HCl. Все пробы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте, затем добавляли 1 мл охлажденного 20%

раствора ТХУ (трихлоруксусная кислота), выдерживали 10 мин в холодильнике и центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин.

Осадок промывали 2 раза смесью этанол : этилацетат (1 : 1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков. Для этого к осадку добавляли 2 мл смеси этанол : этилацетат (1 : 1). Осадок ресуспендировали и центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. Затем процедуру повторяли. Полученный осадок высушивали для удаления растворителей. Затем осадок растворяли в предварительно нагретых 2 мл 10 М раствора мочевины на кипящей водяной бане.

Оптическую плотность опытных и контрольных растворов регистрировали на спектрофотометре "Beckman DU-530" при 370 нм. Расчет концентрации карбонильных продуктов оценивали по формуле [13, 14]:

$$C \text{ (нмоль/мл)} = (Abs_{370\text{нм}} \cdot 10^6 / \epsilon_{370\text{нм}}) \cdot X$$

Где C- концентрация карбонильных групп в плазме, (нмоль/мл)

$Abs_{370\text{нм}}$ - оптическая плотность образца при $\lambda=370$ нм

$\epsilon_{370\text{нм}} = 22000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ - коэффициент молярной экстинкции при $\lambda=370\text{нм}$ [13, 14]

X - фактор разбавления.

Содержание карбонильных продуктов пересчитывали на 1 мг белка и на 1 мл плазмы. Для определения концентрации белка в плазме использовали биуретовый метод. Полученные в работе результаты обработаны по критериям Стьюдента-Фишера. Все значения показателей представлены на графиках как средние величины \pm ошибка средней.

Для определения влияния степени разведения исследуемых образцов на накопление карбонильных продуктов к разведенным в 5, 10, 20 и 30 раз образцам плазмы и сыворотки донора добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ до конечной концентрации 1 мМ. Все образцы инкубировали при 37°C в течении 24 часов. Через определенные промежутки времени в отобранных из опытных и контрольных образцов пробах определяли содержание карбонилов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На первом этапе исследования изучали накопление карбонильных продуктов в плазме и сыворотке в зависимости от времени инкубации и степени разведения образцов плазмы и сыворотки. Из рисунка 1 видно, что с увеличением времени инкубации наблюдается рост содержания карбонильных продуктов в плазме (в расчете на 1 мл плазмы), что свидетельствует о повышении окислительной модификации белков. Для снятия эффекта влияния водорастворимых антиоксидантов, присутствующих в плазме и сыворотке крови, которые могут повлиять на накопление карбонильных продуктов, изучаемые образцы плазмы и сыворотки перед окислением разводили в 5, 10, 20 и 30 раз. Как видно из рисунка 1, количество образовавшихся продуктов окисления растет при увеличении степени разведения. При пересчете концентрации карбонилов на мг белка общая картина результатов не изменяется. Сохраняется повышение выхода карбонильных производных при увеличении времени инкубации (рис. 2). Самая высокая концентрация выхода карбонильных производных регистрируется при разведении в 20 раз. При дальнейшем разведении в 30 раз выход карбонильных продуктов на 1 мг белка остаётся таким же, как и при разведении в 20 раз (различия недостоверны, $p < 0,05$). Этот факт свидетельствует о том, что при разведении плазмы в 20 раз водорастворимые антиоксиданты не оказывают влияния на выход карбонильных продуктов. Измерение карбонильных продуктов через 20 - 24 часа окисления позволяет стандартизировать проведение анализа, поскольку при данном времени окисления выход карбонильных продуктов при разведении в 20 - 30 раз достоверно не различается.

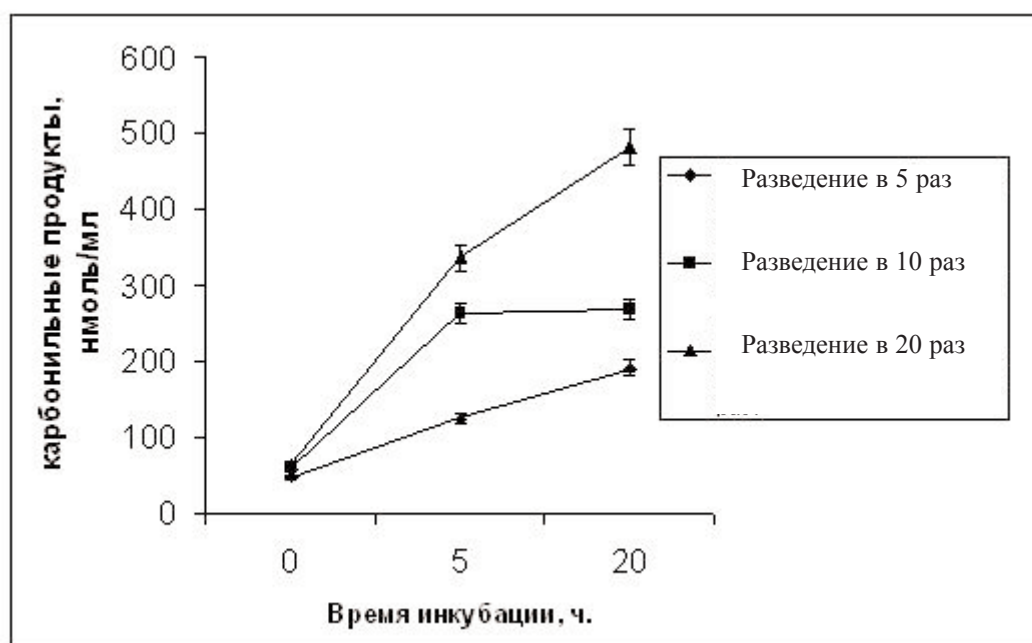


Рисунок 1.

Зависимость образования карбонильных продуктов в плазме (в пересчёте на 1 мл) от времени инкубации с сульфатом меди.

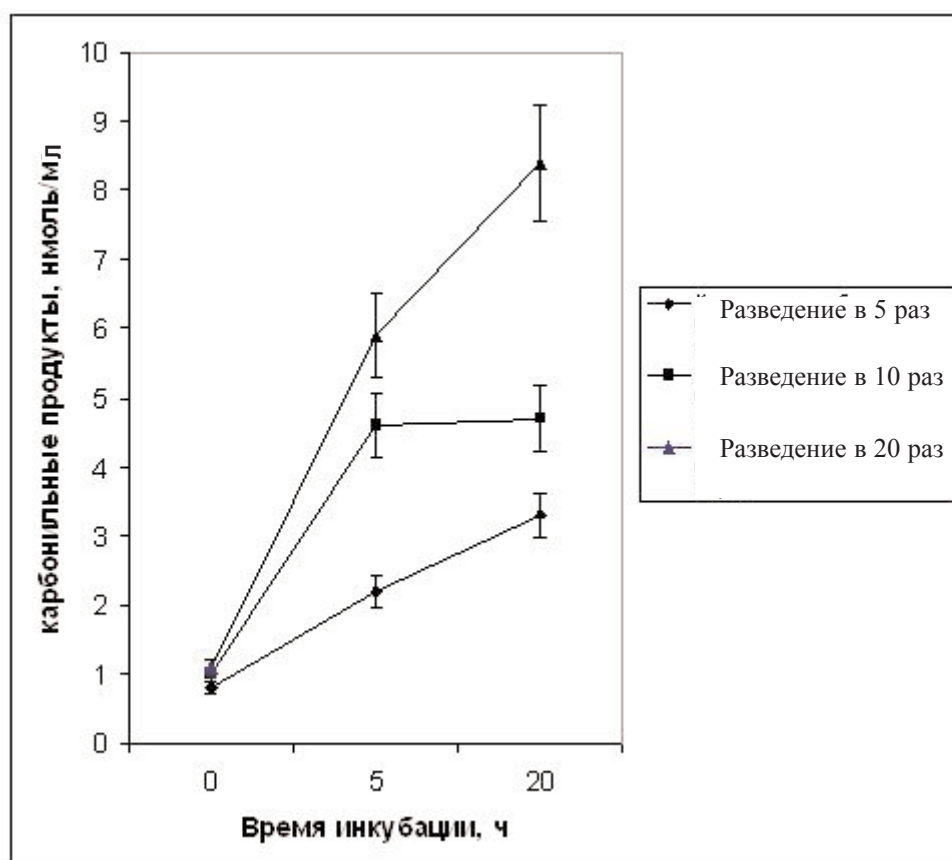


Рисунок 2.

Зависимость образования карбонильных продуктов в плазме (в пересчёте на 1 мг белка) от времени инкубации с сульфатом меди.

Аналогично плазме, кривая накопления карбонильных продуктов в сыворотке в пересчёте на мл сыворотки, также растёт с увеличением времени инкубации. При пересчёте концентрации карбонильных продуктов на мг белка наблюдается аналогичная картина. Увеличение содержания карбонильных групп в окисленной сыворотке по сравнению с плазмой можно объяснить тем, что фибриноген, который способен перехватывать свободные радикалы [15], повреждается в большей степени. Однако возможно, что кроме карбонильных соединений в окисленном фибриногене образуются другие продукты окисления, и их содержание больше, чем карбонильных продуктов. Этим можно объяснить уменьшение количества карбонильных соединений в плазме по сравнению сывороткой. В отсутствие фибриногена окислительная модификация других белков идёт более интенсивно, что приводит к увеличению содержания карбонильных групп.

В ходе дальнейшей работы проводили сравнительное изучение кинетики окисления белков плазмы и сыворотки в присутствии Cu^{2+} (рис. 3). После четырёх часов инкубации выход карбонильных продуктов в сыворотке становится выше, чем в плазме. Уровни накопления карбонильных групп в плазме и сыворотке после 20 часов инкубации различаются незначительно, а после 24 часов достоверно не различаются ($p < 0,05$).

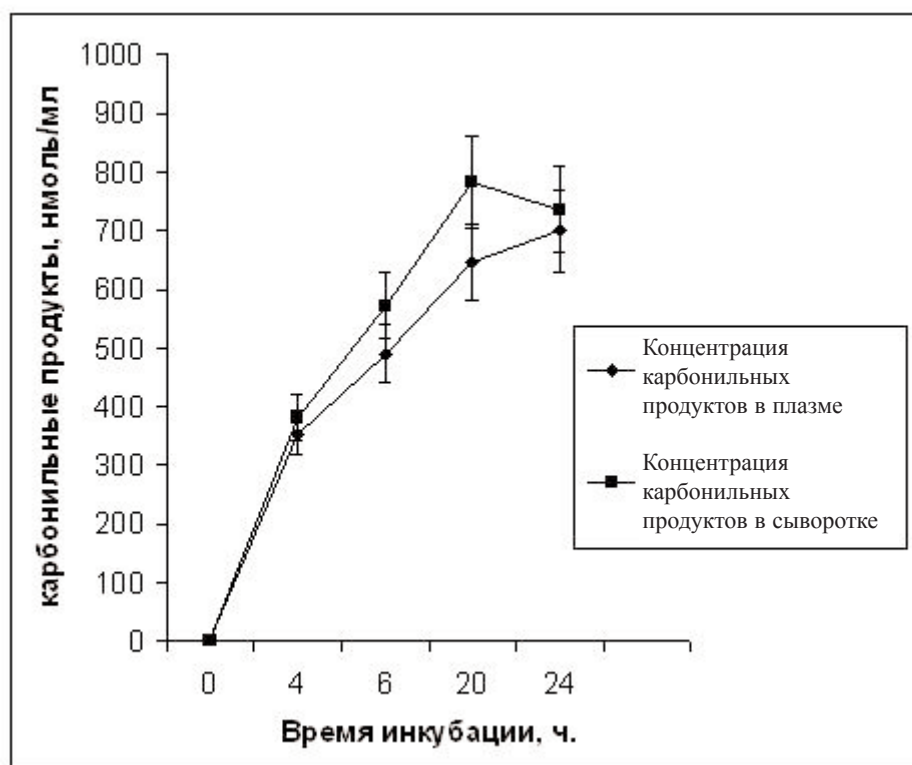


Рисунок 3.

Зависимость образования карбонильных продуктов в плазме и сыворотке (в пересчёте на 1 мл) от времени инкубации с сульфатом меди.

На следующем этапе исследований стояла задача в подборе оптимального разведения образца в Cu^{2+} -индуцированной системе. Оптимальными для анализа карбонильных продуктов являются разведения плазмы и сыворотки в 20 и 30 раз. Измерение карбонильных продуктов через 20-24 часа окисления позволяет стандартизировать проведение анализа, поскольку при данном времени окисления выход карбонильных продуктов при разведении в 20-30 раз достоверно не различается.

Далее был проведен подбор оптимальной концентрации меди для окисления плазмы и сыворотки при разведении в 20 раз. Показана зависимость содержания карбонильных соединений в плазме и сыворотке крови доноров после 20 часов окисления от концентрации меди, взятой в диапазоне концентраций от 0,001 мМ до 1 мМ. Как следует из рисунка 4, в диапазоне концентраций меди от 0,001 мМ до 0,1 мМ происходит заметный рост выхода карбонильных продуктов. В диапазоне концентраций меди от 0,1 мМ до 1 мМ происходит выход на плато концентрации карбонильных продуктов. Причём это относится как к окислению плазмы, так и к окислению сыворотки. При сравнении окисления плазмы и сыворотки заметна тенденция к большему окислению сыворотки в отличие от плазмы.

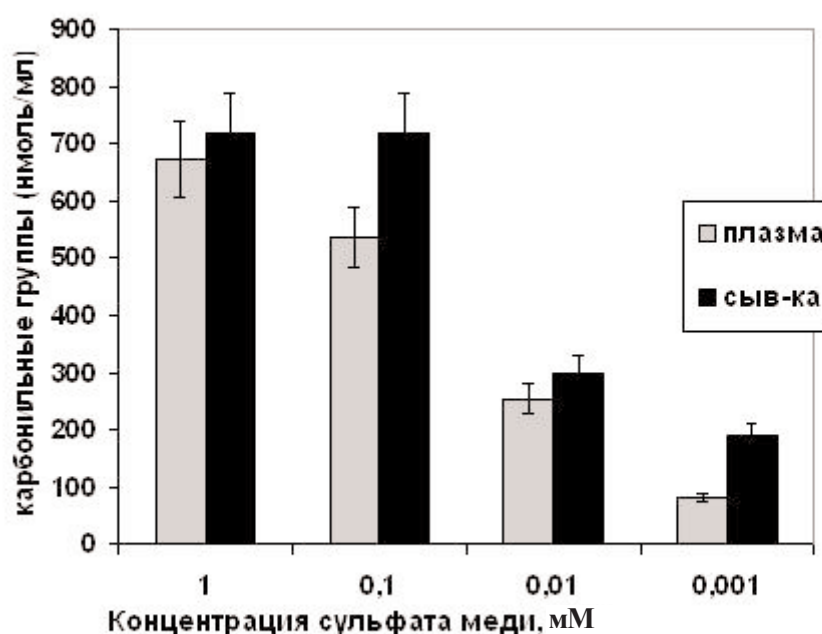


Рисунок 4.

Зависимость содержания карбонильных групп (нмоль/мл) в плазме и сыворотке доноров (n=5) после 20 часов инкубации от концентрации меди.

Исследование окисляемости плазмы и сыворотки в диапазоне меньших концентраций от 10 мкМ до 100 мкМ меди (рис. 5) обнаружило линейный характер увеличения выхода карбонильных продуктов с ростом концентрации меди. Исходя из этого, мы выбрали для дальнейших исследований в качестве рабочей концентрации меди концентрацию 20 мкМ.

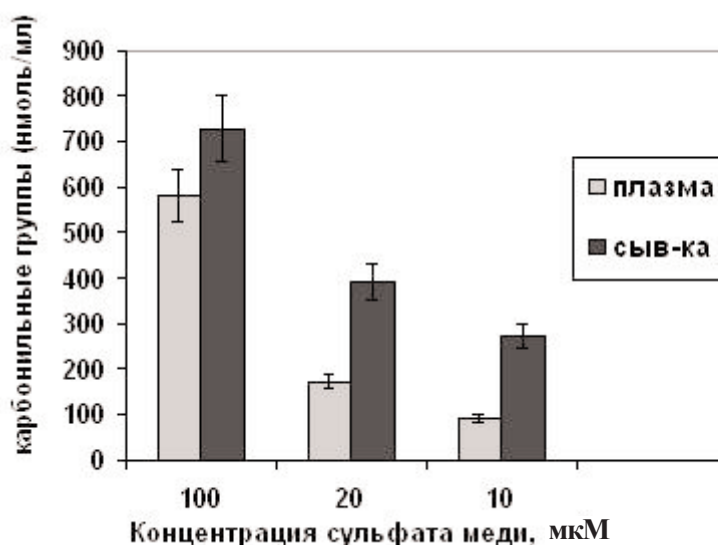


Рисунок 5.

Зависимость содержания карбонильных групп (нмоль/мл) в плазме и сыворотке доноров (n=5) после 20 часов инкубации от концентрации меди.

Для изучения возможности применения данного метода в клинической практике нами было исследовано изменение окислительной резистентности плазмы крови до, в течении и после операции реваскуляризации миокарда в условиях искусственного кровообращения. Было обнаружено достоверное снижение окислительной резистентности плазмы крови по регистрации карбонильных продуктов окисления белков в течение операционного периода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Предложен метод определения окисляемости белков плазмы крови по накоплению карбонильных продуктов их (белков) окислительной модификации. Проведён подбор наиболее оптимальных условий проведения анализа с целью получения максимальной чувствительности метода определения окисляемости плазмы крови. Исследовано накопление карбонильных продуктов окисленных белков при Cu^{2+} -индуцированном окислении в плазме и сыворотке здоровых доноров в зависимости от разведений при разном времени инкубации. Обнаружено что, самая высокая концентрация выхода карбонильных производных регистрируется при разведении плазмы в 20 раз, большее разведение существенно не сказывается на конечных результатах. Обнаружено, что выход карбонильных продуктов растёт с течением времени инкубации, и что оптимальным является время инкубации 20 часов, при котором достигается выход на плато значений карбонильных продуктов. Обнаружено, что при 20 часах инкубации окисляемость плазмы и сыворотки существенно не отличаются друг от друга. Выбрана концентрация меди 20 мкМ для практического использования метода определения окисляемости плазмы по содержанию карбонильных продуктов окисления белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sies H. (1985) In: Oxidative stress. Academic Press, London, pp. 1-8.
2. Cherubini A., Ruggiero C., Polidori M.C., Mecocci P. (2005) Free Radic. Biol. Med., **39**, 841-852.
3. Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Lusis A.J. (1995) Circulation, **91**, 2488-2496.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКИСЛЯЕМОСТИ БЕЛКОВ КРОВИ

4. *Witztum J.L., Steinberg D.* (1991) *J. Clin. Invest.*, **88**, 1785-1792.
5. *Penn M.S., Chisolm G.M.* (1994) *Atherosclerosis*, **108**, S21-S29.
6. *Koenig W.* (1999) *Curr. Cardiol. Rep.*, **1**(2), 112-118.
7. *Shacter E., Williams J.A., Lim M., Levine R.L.* (1994) *Free Radic. Biol. Med.*, **17**, 429-437.
8. *Сыркин А.Л., Азизова О.А., Дриницина С.В., Френкель Е.Е., Соловьева Н.П., Савченкова А.П.* (2001) *Клин. мед.*, №3, 25-29.
9. *Власова И.И., Азизова О.А., Лопухин Ю.М.* (1997) *Биохимия*, **62**, 307-311.
10. *Асейчев А.В., Азизова О.А.* (2004) *Бюл. экспер. биол. мед.*, **137**, 238-241.
11. *Жамбалова Б.А., Азизова О.А., Лопухин Ю.М.* (2002) *Бюл. экспер. биол. мед.*, **133**, 519-521.
12. *Ройтман Е.В., Азизова О.А., Морозов Ю.А., Асейчев А.В.* (2004) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **138**, 527-529.
13. *Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici P.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 9908-9913.
14. *Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E.* (1994) *Methods Enzymol.*, **233**, 346-357.
15. *Kaplan I.V., Attaelmannan M., Levinson S.S.* (2001) *Atherosclerosis*, **158**, 455-463.

Поступила: 16. 02. 2006.

THE METHOD FOR DETECTION OF PROTEIN OXIDABILITY IN SERUM AND PLASMA OF BLOOD

O.A. Azizova, A.P. Pirayezov, S.N. Moskvina, A.V. Aseychev

Research Institute for Physical and Chemical Medicine, ul. M. Pirogovskaya, 1A, Moscow, 119828 Russia; tel.: (495) 246-44-71; fax: (495) 246-44-01; e-mail: aseychev@mail.ru

Copper-induced oxidability of proteins was investigated in plasma and serum of blood of healthy donors. Incubation of plasma and serum samples with copper ions was accompanied by accumulation of carbonyl products of oxidized proteins. Quantity of the formed carbonyl products depended on both time of incubation, and dilution of plasma and serum. Under identical conditions of oxidation the accumulation of carbonyl products in serum of blood was higher than in plasma.

Key words: carbonil products, oxidation, Cu-ions, proteins.