



УДК 616.12-008

ІНГІБУВАННЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ БІЛКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ IN VITRO

Студ. А.-М. А. Кравець, гр. БХФ-2-13

Студ. Д.С. Матусевич, гр. БХФ-2-13

ас. А.В. Оболоник

Наукові керівники: доц. В.І. Бессарабов

доц. Г.І. Кузьміна

Київський національний університет технологій та дизайну

Мета і завдання. Метою дослідження є вивчення механізмів перекисного окислення білків сироватки крові людини in vitro.

Завданням цієї роботи було дослідження механізмів інгібування перекисного окислення білків, видів інгібіторів, відтворення методики in vitro із залученням одного із відомих антиоксидантів - аскорбінової кислоти.

Об'єкт дослідження. Перекисне окислення білків сироватки крові людини.

Методи та засоби дослідження. Аналіз наукових статей по даній темі, літературних оглядів та описів методик. Відтворення однієї з методик (метод оцінки інтенсивності окиснювальної модифікації білків у тканинах, принцип якого заснований на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідрaziном (2,4-ДФГ з подальшим утворенням похідних 2,4-динітрофенілгідразона).

Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів.

Застосування методики в дослідженні перекисного окислення білків для оцінки можливого інгібування процесу деякими АФІ.

Результати дослідження. Внутрішньомолекулярне окислення біологічних субстратів (біологічне окислення) є основним молекулярним механізмом, за рахунок якого забезпечуються енергетичні потреби функціонування живих організмів. Одним з наслідків надлишку кисню в організмі є утворення вільних радикалів, які ушкоджують клітинні елементи і не в останню чергу мембранні структури клітини. Втім, збільшене утворення вільних радикалів в організмі і пов'язане з цим посилення процесів пероксидації ліпідів (яке іноді називають оксидативним або окислювальним стресом) можуть відбуватися не тільки через надлишок кисню, але і великого числа інших причин. Так чи інакше, окислювальний стрес супроводжується порушеннями властивостей біологічних мембран, функціонуванні клітин. (Chunseng Feng and others, 2015). Окиснення вільнорадикальне — біохімічний процес перетворення кисню, ліпідів, нуклеїнових кислот, білків та інших сполук під дією вільних радикалів, які можуть утворюватися у зовнішньому середовищі (наприклад, внаслідок електромагнітного випромінювання - радон, космічне випромінювання), а також внаслідок антропогенних чинників, таких як продукти внутрішньоклітинного метаболізму. Найпоширенішими є гідроксильні радикали (ОН[•]), супероксидний радикал (O₂^{•-}) і оксид азоту (NO[•]). Також варто згадати і про інші молекули, такі як перекис водню (H₂O₂) і пероксинітрат (ONOO⁻), які по своїй суті хоча і не є вільними радикалами, але все ж таки можуть призводити до їх утворення шляхом ланцюгових хімічних реакцій. Вільні радикали і з'єднання, здатні в ході ланцюгових реакцій призводити до їх утворення, розглядаються у рамках групи, яку позначають як реактивні (активні, реакційноздатні) форми кисню (РФК), тим самим підкреслюючи їх здатність призводити до різних окислювальних процесів в клітині. РФК можна умовно

розділити на дві основні групи: з низькою активністю і високою активністю. Низькоактивні з'єднання в невеликій кількості виникають при звичайному аеробному метаболізмі, і ті ушкодження, які можуть бути ними викликані, легко коригуються самою клітиною без додаткових втручань (Е.Е.Васеніна та ін., 2013). Проте в деяких випадках навіть низькоактивні форми, такі як супероксидний радикал, шляхом окислювальних реакцій можуть трансформуватися в агресивніші з'єднання за участю деяких металів в якості коферментів. В організмі можливо перетворення менш реакційноздатних АФК - (O_2^-) та (H_2O_2) у більш реакційноздатні з'єднання - синглетний кисень ($O_{1/2}$) при спонтанній дисмутації (O_2^-) чи (OH^\cdot) у реакції Фентона і Габера-Вейса (Е.Е.Дубініна та ін.,1993). Нині ключовою ланкою окислювального ушкодження клітини вважається мітохондріальна дисфункція. Добре відомо, що в процесі старіння відбувається накопичення мутації М-ДНК, що порушує структуру і функції мітохондрій, призводячи до дисбалансу між виробництвом вільних радикалів і захисними можливостями організму. Так, за даними статей в ході експериментів на тваринах були отримані дані, що первинною точкою патологічного процесу може бути інгібування комплексу I дихального ланцюгу мітохондрій в клітинах чорної субстанції головного мозку з подальшим запуском окислювальних процесів і генетично запрограмованої загибелі клітин. Окрім мітохондріальної дисфункції, одним з механізмів розвитку окислювального ушкодження клітин може бути порушення обміну глутатіону. У відновленому стані глутатіон здатний зв'язуватися з неспареним електроном вільних радикалів, переводячи їх в стабільний стан (окислений глутатіон). Ще одним пусковим механізмом окислювального стресу розглядається накопичення заліза у базальних гангліях. Тканини, що містять (Fe^{2+}) і (Fe^{3+}), можуть вступати в реакцію з пероксидом водню, утворюючи при цьому токсичні гідроксильні і пергідроксильні радикали, які призводять до ушкодження клітини. Важливо відмітити, що накопичені вільні радикали в подальшому можуть посилювати свій патологічний вплив за рахунок інгібування функції мітохондрій, що призводить до порушення продукції НАДФН, знижуючи кількість глутатіону (Е.Е.Васеніна та О.С.Левін, 2013). На сьогоднішній день описаний метод оцінки інтенсивності окиснювальної модифікації білків у тканинах, принцип якого заснований на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДФГ) з подальшим утворенням похідних 2,4-динітрофенілгідрозона. Була запропонована модифікація цього методу для визначення ступеня окислення білків у сироватці крові людини (Е.Е.Дубініна та ін.,1995), яка і була нами використана. Як неферментативна металкаталізуюча система була обрана система (Fe^{2+}) - (H_2O_2). Також була проведена описана вище методика із залученням антиоксиданту, яким є аскорбінова кислота. Ми перевіряли її інгібуючу властивість перешкоджати окисній модифікації білків. І ця властивість була нами доведена в процесі відтворення вказаної вище методики із додаванням до інкубаційної суміші 10 мкл аскорбінової кислоти різних концентрацій. Із підвищенням концентрації аскорбінової кислоти у пробі, знижувався рівень кількості окислених продуктів. Результати відтворення даної методики показали, що (Fe^{2+}) володіє яскраво вираженою здатністю прискорювати процеси окиснювальної модифікації білків, пов'язані з генерацією карбонільних похідних. Натомість, аскорбінова кислота володіє яскраво вираженою властивістю інгібувати окисну модифікацію білків.

Висновки. Був досліджений механізм інгібування перекисного окислення білків сироватки крові людини *in vitro* аскорбіновою кислотою.

Ключові слова. Перекисне окислення білків, антиоксиданти, інгібування, сироватка крові людини, аскорбінова кислота