

УДК 61:577.1

Н. В. Безручко, Г. К. Рубцов

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОД ОЦЕНКИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В КОМПЛЕКСЕ С МОЛЕКУЛАМИ СРЕДНЕЙ МАССЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Изучение окислительной модификации белков (ОМБ) и молекул средней массы (МСМ) как маркеров выраженности эндотоксикоза, чувствительных к изменению степени окислительного стресса, в комплексе, в одной пробе биологической среды методологически обосновано, так как позволит увеличить информативность каждого из этих параметров и снизить расход используемого материала, что особенно важно в клинической биохимии. Метод оценки ОМБ в комплексе с МСМ реализован в соответствии с авторским способом (заявка на патент на изобретение Российской Федерации № 2012153044, приоритет от 7.12.2012, решение о выдаче патента от 14.04.2014, в соавторстве) и апробирован на модельной биологической системе в условиях спонтанной и Fe^{2+} -индуцированной ОМБ.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, молекулы средней массы, методология, метод, модельная биологическая система.

В основе методологии изучения окислительной модификации белков (ОМБ) в пуле молекул средней массы (МСМ) может быть использовано то, что оба этих теста – маркеры выраженности эндотоксикоза, чувствительные к изменению степени окислительного стресса [1–6]. Изучение их в комплексе, в одной пробе биологической среды позволит увеличить информативность каждого из этих параметров и снизить расход используемого материала, что особенно важно в клинической биохимии.

Цель работы – рассмотреть методологические и методические основы применения метода оценки ОМБ в комплексе с уровнем МСМ.

Выбор применяемой модельной биологической системы (МБС) был обусловлен ее способностью реагировать на изменение уровня свободно-радикальных процессов, в том числе чувствительностью к инициации свободно-радикальных процессов ионами Fe^{2+} . В качестве такой МБС использованы желточные липопротеиды. Согласно данным

литературы [7], глубокие исследования физико-химических свойств природного биологического сырья показали наличие органических биологически активных соединений именно в их липидорастворимой фракции.

Желточные липопротеиды были получены по методике Г. И. Клебанова и соавт. [8], по этой же методике воспроизводили процесс Fe^{2+} -индуцированного окисления.

Схема построения серий наблюдений в модельной биологической системе (МБС) в условиях спонтанного и Fe^{2+} -индуцированного окисления показана на рис. 1.

Одним из продуктов пчеловодства, добавляемых к МБС, являлся трутневый расплод. Считается, что по уровню белков трутневый расплод идентичен маточному молочку, но выражено отличается от него по показателям окисляемости. Трутневый расплод содержит меньшее количество ненасыщенных соединений, о чем свидетельствует показатель

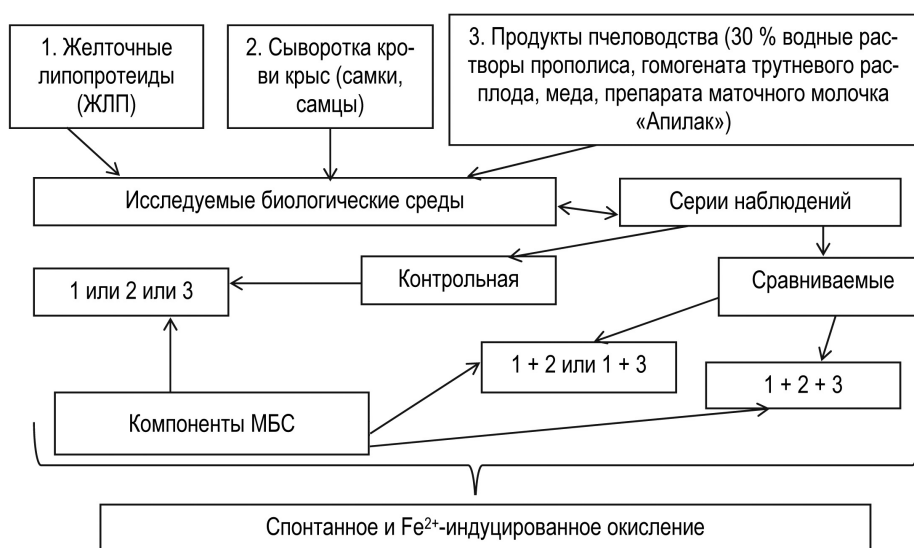


Рис. 1. Схема построения серий наблюдений в модельной биологической системе (МБС) в условиях спонтанного и Fe^{2+} -индуцированного окисления

окисляемости, коррелирующий с меньшим количеством деценовых кислот [9].

Схема применяемого метода оценки окислительной модификации белков (ОМБ) в пуле молекул средней массы (МСМ) представлена на рис. 2. Этот метод реализован в соответствии со способом определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы [10].

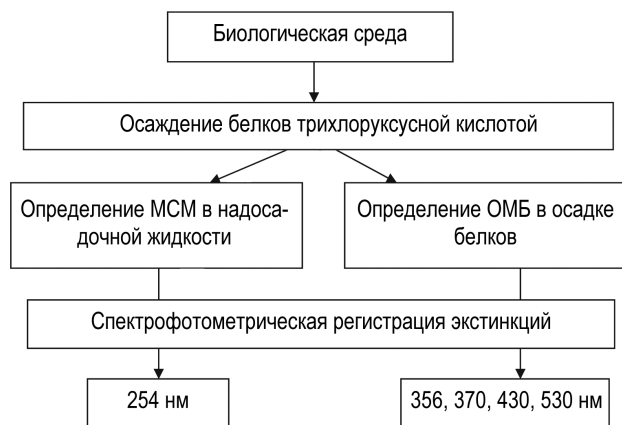


Рис. 2. Схема метода оценки окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы

Метод предполагает определение в одной и той же пробе биологического материала и уровня МСМ, и величин ОМБ. Для этого проводят осаждение белков трихлоруксусной кислотой. Надосадочную жидкость используют для регистрации экстинкций МСМ (при 254 нм), а осадок – для определения величин ОМБ (при 356, 370, 430, 530 нм).

Уровень ОМБ изучают в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДФГ) с образованием карбонильных производных белков (2,4-динитрофенилгидразонов).

Регистрация уровней ОМБ на четырех длинах волн позволяет выявить уровни 2,4-динитрофенилгидразонов различной природы: при 356 нм – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 370 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны нейтрального характера, при 430 и 530 – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны и кетондинитрофенилгидразоны основного характера [11]. Для проведения измерений экстинкций анализируемых тестов использовался спектрофотометр СФ-2000 (лаборатория кафедры биохимии Пензенского государственного университета).

Таким образом, спецификой метода является его нацеленность на увеличение информативности биохимических тестов определения МСМ и ОМБ путем исследования их в комплексе – в одной и той же пробе и снижение расхода биологического материала. То есть одновременно в пробах произво-

дят определение уровня и МСМ, и ОМБ.

Для обработки и интерпретации полученных результатов применены стандартные методы статистического анализа полученных данных с использованием компьютерной программы «Excel»: вариационная статистика для малых выборок с применением *t*-критерия Стьюдента, корреляционный анализ [12].

Полученные результаты свидетельствовали о том, что в проведенных сериях наблюдений имели место следующие тенденции.

1. Увеличение значений МСМ при Fe^{2+} -индуцированном окислении, по сравнению со спонтанным окислением, в меде – в 4,2 раза; в сыворотке крови крыс самцов и самок – в 4,2 и 3,8 раза соответственно; в желточных липопропротеидах – в 2,9 раза; в маточном молочке – в 1,6 раза; в прополисе – в 1,2 раза ($p < 0,05$).

2. Анализ значений ОМБ в условиях Fe^{2+} -индуцированного окисления, как и при спонтанном окислении, показал наибольшую информативность их регистрации при длинах волн 430 и 530 нм. То есть для характеристики уровней ОМБ маркерными тестами может служить образование алифатических альдегиддинитрофенилгидразонов и кетондинитрофенилгидразонов основного характера.

3. Выявлено, что величины ОМБ, регистрируемые при 430 нм (длине волны, проявившей себя как одной из маркерных), наиболее показательны изменяются в сторону увеличения при Fe^{2+} -индуцированном окислении, по отношению к спонтанному окислению, в маточном молочке – в 1,2 раза ($p < 0,05$). Прополис показал статистически значимые отличия при 430 нм: более высокие значения уровней ОМБ в условиях Fe^{2+} -индуцированного окисления, по сравнению со спонтанным окислением, – в 1,1 раза ($p < 0,05$).

4. Уровни ОМБ в модельных биологических системах с добавлением желточных липопропротеидов при Fe^{2+} -индуцированном окислении, как и при спонтанном окислении, проявили общую тенденцию снижения величин при переходе от 356 к 530 нм. Сопоставление их уровней ОМБ, по сравнению с модельными биологическими системами без добавления желточных липопропротеидов, показало наиболее ярко выраженные отличительные особенности при 530 нм.

5. Анализ уровней ОМБ с добавлением желточных липопропротеидов и сыворотки крови крыс, по сравнению с модельными биологическими системами без добавления сыворотки крови крыс, показал наиболее ярко выраженные отличительные особенности при 530 нм.

6. При использовании модельной биологической системы «желточные липопропротеиды + сыворотка крови» выявлено, что уровень МСМ в ней

меньше, чем в сыворотке крови самок и самцов ($p < 0,05$): при спонтанном окислении – в 3 и 3,3 раза соответственно; при Fe^{2+} -индуцированном окислении – в 1,3 и 1,4 раза соответственно.

7. Установлена общая тенденция увеличения уровня ОМБ, регистрируемой при 430 и 530 нм, в условиях Fe^{2+} -индуцированного окисления, по сравнению со спонтанным окислением, при добавлении к желточным липопротеидам сыворотки крови или продуктов пчеловодства. Исключение составила модельная биологическая система «желточные липопротеиды + маточное молочко», у которой при регистрации ОМБ на 530 нм не были обнаружены статистически значимые отличия по величине изучаемого теста от его значений в желточных липопротеидах.

На основании анализа полученных результатов, согласующихся с полученными ранее данными [13–15], можно заключить, что перспективами применения на практике полученных результатов может явиться следующее. В клинической биохимии может использоваться метод оценки ОМБ в комплексе с МСМ для анализа выраженности эндогенной интоксикации, а также рассмотренная МБС может служить тест-системой величин ОМБ в условиях спонтанного и Fe^{2+} -индуцированного окисления (например, для изучения прооксидантной и антиоксидантной активности веществ) в мониторинге или однократно. Подтверждением возможности комплексного использования маркерных параметров уровня спонтанной и Fe^{2+} -иницированной окислительной модификации белков на модельной биологической системе желточных липопротеидов могут служить их корреляционные взаимосвязи с уровнем молекул средней массы.

В условиях спонтанного окисления отмечены статистически достоверные корреляционные взаимосвязи уровня МСМ и величин ОМБ ($p < 0,05$):

1) при длине волны 430 нм – в маточном молочке ($r = 0,56$);

2) при длине волны 530 нм – в прополисе ($r = 0,59$), гомогенате трутневого расплода ($r = 0,46$).

Выявлены статистически достоверные корреляционные взаимосвязи уровня МСМ и величин ОМБ при Fe^{2+} -индуцированном окислении ($p < 0,05$):

1) при длине волны 430 нм – в маточном молочке ($r = 0,48$);

2) при длине волны 530 нм – в прополисе ($r = 0,71$), гомогенате трутневого расплода ($r = 0,51$), маточном молочке ($r = 0,6$), сыворотке крови самок крыс ($r = 0,6$).

В модельной биологической системе с добавлением продуктов пчеловодства или сыворотки крови экспериментальных животных (крысы) обнаружены статистически достоверные корреляционные взаимосвязи уровня МСМ и величин ОМБ ($p < 0,05$):

1) при длине волны 430 нм – при добавлении к ЖЛП сыворотки крови крыс (самок – $r = 0,63$, самцов – $r = 0,57$);

2) при длине волны 530 нм – при добавлении к ЖЛП гомогената трутневого расплода ($r = 0,68$), меда ($r = 0,67$), сыворотки крови крыс (самок – $r = 0,49$, самцов – $r = 0,58$).

Выявлены статистически достоверные корреляционные взаимосвязи уровня МСМ и величин ОМБ в желточных липопротеидах (ЖЛП) с одновременным добавлением продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс ($p < 0,05$):

1) при добавлении сыворотки крови самок крыс – в ЖЛП с прополисом (при 430 нм – $r = 0,49$, при 530 нм – $r = 0,69$), в ЖЛП с гомогенатом трутневого расплода (при 430 нм – $r = 0,56$, при 530 нм – $r = 0,58$);

2) при добавлении сыворотки крови самцов крыс – в ЖЛП с прополисом (при 430 нм – $r = 0,45$), в ЖЛП с гомогенатом трутневого расплода (при 430 нм – $r = 0,62$, при 530 нм – $r = 0,6$), в ЖЛП с медом (при 530 нм – $r = 0,91$), в ЖЛП с маточным молочком (при 430 нм – $r = 0,76$, при 530 нм – $r = 0,8$).

Установлены статистически достоверные корреляционные взаимосвязи уровня МСМ и величин ОМБ в желточных липопротеидах (ЖЛП) с добавлением продуктов пчеловодства или сыворотки крови крыс при Fe^{2+} -индуцированном окислении ($p < 0,05$):

1) при длине волны 430 нм – при добавлении к ЖЛП гомогената трутневого расплода ($r = 0,78$), сыворотки крови самок крыс ($r = 0,87$);

2) при длине волны 530 нм – при добавлении к ЖЛП гомогената трутневого расплода ($r = 0,81$), меда ($r = 0,58$).

Выявлены статистически достоверные корреляционные взаимосвязи уровня МСМ и величин ОМБ в желточных липопротеидах (ЖЛП) с одновременным добавлением продуктов пчеловодства и сыворотки крови крыс при Fe^{2+} -индуцированном окислении ($p < 0,05$):

1) при добавлении сыворотки крови самок крыс – в ЖЛП с гомогенатом трутневого расплода (при 430 нм – $r = 0,67$, при 530 нм – $r = 0,78$), в ЖЛП с маточным молочком (при 430 нм – $r = 0,63$, при 530 нм – $r = 0,67$);

2) при добавлении сыворотки крови самцов крыс – в ЖЛП с прополисом (при 530 нм – $r = 0,49$), в ЖЛП с гомогенатом трутневого расплода (при 430 нм – $r = 0,79$, при 530 нм – $r = 0,66$), в ЖЛП с маточным молочком (при 430 нм – $r = 0,64$, при 530 нм – $r = 0,78$).

Таким образом, проанализированные методологические и методические основы метода оценки ОМБ, проявляющей корреляционные взаимосвязи

с уровнем МСМ на модельной биологической системе ЖЛП, свидетельствуют об их информативности для характеристики маркерных биохимических тестов, отличающих спонтанное и Fe^{2+} -индуцированное окисление.

Таким образом, выявлены статистически достоверные корреляционные взаимосвязи ($p < 0,05$) уровня МСМ и величин ОМБ, регистрируемых при длине волны 430 нм, в маточном молочке, уровня МСМ и величин ОМБ, регистрируемых при длине волны 530 нм, в прополисе и гомогенате

трутневого расплода и при спонтанном, и при Fe^{2+} -индуцированном окислении.

Взаимосвязи уровня МСМ и величин ОМБ в желточных липопротеидах (ЖЛП) с одновременным добавлением гомогената трутневого расплода и сыворотки крови крыс (как самок, так и самцов) характеризовались статистически достоверными значениями корреляции ($p < 0,05$).

Полученные результаты могут служить подтверждением возможности практического применения метода оценки ОМБ в комплексе с уровнем МСМ.

Список литературы

1. Белоногов Р. Н., Титова Н. М., Дыхно Ю. А., Лапешин П. В., Кудряшова Е. В., Савченко А. А. Окислительная модификация белков и липидов плазмы крови больных раком легкого // Сибирский онкологический журнал. 2009. № 4. С. 48–51.
2. Копытова Т. В., Дмитриева О. Н., Химкина Л. И., Пантелеева Г. А. Окислительная модификация белков и олигопептидов у больных хроническими дерматозами с синдромом эндогенной интоксикации // Фундаментальные исследования. 2009. № 6. С. 25–29.
3. Келина Н. Ю., Безручко Н. В., Рубцов Г. К. Биохимические проявления эндотоксикоза: методические аспекты изучения и оценки, прогнозическая значимость (аналитический обзор) // Вестн. Тюменского гос. ун-та. 2012. № 6. С. 143–147.
4. Халдун О., Лакал А., Бекшонов К. С., Кличханов Н. К. Окислительная модификация белков плазмы крови ожоговых больных // Вестн. Дагестанского гос. ун-та. 2012. № 1. С. 128–132.
5. Безручко Н. В., Рубцов Г. К., Анопин К. Д., Кривченкова Е. В. Клинико-биохимические перспективы разработки неинвазивных методов оценки эндогенной интоксикации, значение показателей мочи и слюны // Технологии живых систем. 2013. № 1. С. 47–52.
6. Рубцов Г. К., Безручко Н. В., Садовникова Д. Г., Козлова Г. А., Анопин К. Д. Клинико-биохимическое значение комплексного изучения молекул средней массы и окислительной модификации белков для оценки эндотоксикоза // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 2. С. 41–47.
7. Низкодубова С. В., Ласукова Т. В., Легостин С. А. Применение липидов сапропеля для коррекции метаболизма печени крыс при токсикохимическом гепатите // Вестн. Томского гос. пед. ун-та (Tomsk State Pedagogical University Bulletin). 2013. Вып. 8. С. 94–99.
8. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О., Комаров О. С., Владимиров Ю. А. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лабораторное дело. 1988. № 5. С. 59–62.
9. Бурмистрова Л. А. Физико-химический анализ и биохимическая оценка биологической активности трутневого расплода: дис. ... канд. биол. наук. Рязань, 1999. 173 с.
10. Рубцов Г. К., Безручко Н. В., Генгин М. Т., Васильков В. Г., Борисова Е. Ю., Анопин К. Д., Васильева А. Д., Садовникова Д. Г., Козлова Г. А., Кручинина А. Д., Гамзин С. С. Способ определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы в сыворотке крови, плазме, эритроцитах и в моче. Заявка на патент на изобретение Российской Федерации № 2012153044, приоритет от 7.12.2012, решение о выдаче патента от 14.04.2014.
11. Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. 1995. № 1. С. 24–26.
12. Глянц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
13. Безручко Н. В., Рубцов Г. К. Модельные биологические системы и метод оценки спонтанной и инициированной окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы // Технологии живых систем. 2013. № 5. С. 46–50.
14. Рубцов Г. К. Комплексное применение модельных биологических систем для оценки окислительной модификации белков в пуле молекул средней массы // Вестн. Томского гос. пед. ун-та (Tomsk State Pedagogical University Bulletin). 2013. Вып. 8. С. 81–90.
15. Рубцов Г. К., Безручко Н. В., Генгин М. Т., Васильков В. Г., Борисова Е. Ю., Анопин К. Д., Васильева А. Д., Садовникова Д. Г., Козлова Г. А., Кручинина А. Д., Гамзин С. С. Методика анализа окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 9. С. 93.

Безручко Н. В., профессор.

Пензенский государственный университет.

Ул. Красная, 40, Пенза, Россия, 440026.

E-mail: bnv1976@rambler.ru

Рубцов Г.К., ассистент кафедры.

Пензенский государственный университет.

Ул. Красная, 40, Пенза, Россия, 440026.

E-mail: rubczoff_georgij@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 09.06.2014.

N. V. Bezruchko, G. K. Rubtsov

METHODOLOGY AND METHOD OF EVALUATION OF OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN COMPLEX WITH AVERAGE WEIGHT MOLECULES, PROSPECTS FOR THEIR USE

Study of oxidative modification of proteins (OMP) and the average mass molecules (MSM) as markers of the severity of endotoxemia, sensitive to changes in the degree of oxidative stress in the complex, one sample of the biological environment, methodologically justified, since it will increase the information content of each of these parameters and reduce the flow of material used, which is particularly important in clinical biochemistry. OMP evaluation method in combination with MSM implemented by us in accordance with the author's method (patent for the invention of the Russian Federation no. 2012153044, priority of 12.07.2012, the decision to grant a patent on 14.04.2014, in collaboration) and tested on a model biological system conditions spontaneous and Fe²⁺-induced OMP.

Key word: oxidative modification of proteins, average mass molecules, methodology, method, model biological system.

References

1. Belonogov R. N., Titova N. M., Dykhno Yu. A., Lapeshin P. V., Kudryashov E. V., Savchenko A. A. Oxidative modification of proteins and lipids of blood plasma of patients with lung cancer. *Siberian Journal of Oncology*, 2009, no. 4, pp. 48–51 (in Russian).
2. Kopitova T. V., Dmitrieva O. N., Himkina L. I., Panteleeva G. A. Oxidative modification of proteins and oligopeptides in patients with chronic dermatoses with the syndrome of endogenous intoxication. *Fundamental Research*, 2009, no. 6, pp. 25–29 (in Russian).
3. Kelina N. Yu., Bezruchko N. V., Rubtsov G. K. Biochemical manifestations of endotoxemia: methodological aspects of the study and evaluation, predictive value (analytical review). *Bulletin of the Tyumen State University*, 2012, no. 6, pp. 143–147 (in Russian).
4. Khaldun O., Lakal A., Bekshokov K. S., Klichkhanov N. K. Oxidative modification of plasma proteins of burn patients. *Bulletin of Dagestan State University*, 2012, no. 1, pp. 128–132 (in Russian).
5. Bezruchko N. V., Rubtsov G. K., Anopin K. D., Krivchenkova E. V. Clinical and biochemical perspectives of development of non-invasive methods for assessing endogenous intoxication, the value indicators of urine and saliva. *Technology of Living Systems*, 2013, no. 1, pp. 47–52 (in Russian).
6. Rubtsov G. K., Bezruchko N. V., Sadovnikova D. G., Kozlova G. A., Anopin K. D. Clinical and biochemical study of integrated average weight molecules and oxidative modification of proteins for evaluation of endotoxemia. *Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 2013, no. 2, pp. 41–47 (in Russian).
7. Nizkodubova S. V., Lasukova T. V., Legostin S. A. Correction of energy metabolism impairments in tetrachlormethane-poisoned rat liver tissue by means of spropel lipids. *Tomsk State Pedagogical University Bulletin*, 2013, vol. 8, pp. 94–99 (in Russian).
8. Klebanov G. I., Babenkova I. V., Teselkin Yu. O., Komarov O. S., Vladimirov Yu. A. Evaluation of antioxidant activity of blood plasma using yolk lipoprotein. *Laboratory Business*, 1988, no. 5, pp. 59–62 (in Russian).
9. Burmistrova L. A. *Physico-chemical analysis and biochemical assessment of the biological activity of drone brood*. Diss.... cand. biol. Sci. Ryazan, 1999. 173 p. (in Russian).
10. Rubtsov G. K., Bezruchko N. V., Gengin M. T., Vasil'kov V. G., Borisova E. Yu., Anopin K. D., Vasilieva A. D., Sadovnikova D. G., Kozlova G. A., Kruchinina A. D., Gamzin S. S. *Method for determining oxidative modification of proteins in pool of average molecular weight substances in blood serum, plasma, red blood cells and urine*. An application for a patent of the Russian Federation № 2012153044, priority of 07.12.2012, the decision to grant a patent on 14.04.2014 (in Russian).
11. Dubinina E. E., Burmistrov S. O., Khodov D. A., Porotov I. G. Oxidative modification of proteins of human serum, the method of its determining. *Issues of Medical Chemistry*, 1995, no. 1, pp. 24–26 (in Russian).
12. Glyants S. *Biomedical Statistics*. (Russ. ed.: Glyants S. *Mediko-biologicheskaya statistika*. Moscow, Praktika Publ., 1998. 459 p.).
13. Bezruchko N. V., Rubtsov G. K. Modeling biological systems and the method of assessment of spontaneous and initiated oxidative modification of proteins in a pool of molecules of average weight. *Technology of Living Systems*, 2013, no. 5, pp. 46–50 (in Russian).
14. Rubtsov G. K. Complete application of model biological systems for assessment of oxidative modification of proteins in the pool of average weight molecules. *Tomsk State Pedagogical University Bulletin*, 2013, vol. 8, pp. 81–90 (in Russian).
15. Rubtsov G. K., Bezruchko N. V., Gengin M. T., Cornflower V. G., Borisova E. Yu., Anopin K. D., Vasilieva A. D., Sadovnikova D. G., Kozlova G. A., Kruchinina A. D., Gamzin S. S. The method of analysis of oxidative modification of proteins in a pool of average molecular weight substances. *Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 9, pp. 93 (in Russian).

Bezruchko N. V.
Penza State University.
Ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia, 440026.
E-mail: bnv1976@rambler.ru

Rubtsov G. K.
Penza State University.
Ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia, 440026.
E-mail: rubczoff.georgij@yandex.ru