

УДК 612.123;535.37 (575.2) (04)

**РЕГИСТРАЦИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ
В ЛИПОПРОТЕИНАХ НИЗКОЙ И ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ
С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ**

Р.К. Айдыралиев – канд. биол. наук,
О.А. Игембердиева – научн. сотрудник,
Л.Б. Резепкина – мл. научн. сотрудник,
Э.А. Чойбекова, Т.Б. Мамытов – студенты

The changes of fluorescence intensity of probes anthracene, 4-dimethylaminochalcone and 3-methoxybenzanthrone at oxidized summary fractions of low and very low density lipoproteins were investigated. Lipoproteins were isolated from serum by precipitation at the presence of heparinum-Mn.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) вызывает модификацию липопротеинов низкой плотности (ЛНП), что приводит к повышению их атерогенных свойств [1, 2]. Продукты ПОЛ могут разрушать природные флуорофоры триптофанилы, вызывая уменьшение интенсивности их флуоресценции [3]. Этот простой и чувствительный метод может быть использован как полуколичественный скрининг-тест на степень ПОЛ в ЛНП. Будет ли наблюдаться подобная картина, если измерять флуоресценцию добавленных к липопротеинам извне флуоресцентных зондов. В данной работе этот вопрос изучали с помощью зондов антрацен, 4-диметиламинохалкон и 3-метоксibenзантрон. Для практического использования метод ультрацентрифугирования, обычно используемый для выделения ЛНП, является очень сложным и дорогостоящим. В настоящей работе исследование проводилось на суммарной фракции липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛНП+ЛОНП), выделенных из сыворотки крови осаждением в присутствии гепарина – Mn.

Материалы и методы. Суммарную фракцию ЛНП+ЛОНП выделяли из сыворотки кро-

ви здоровых доноров по методу Бурштейна [4]. Тщательно отмытый от белков сыворотки осадок ЛНП+ЛОНП, выделяемый из 1 мл сыворотки, растворяли в 1 мл 50 мМ раствора фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,14 М NaCl. К полученному раствору липопротеинов добавляли флуоресцентные зонды до конечной концентрации 50 мкМ. Для предотвращения появления бактерий (способствующих образованию флуоресцирующих продуктов) к полученному раствору липопротеинов добавляли антибиотик пенициллин + стрептомицин фирмы Sigma (США) до конечной концентрации 0,01%. Одну часть полученного раствора липопротеинов убирали в холодильник, к другой добавляли CuSO₄ до конечной концентрации 50 мкМ и помещали в термостат при 37⁰С для проведения реакции перекисного окисления липидов [5]. Степень ПОЛ оценивали по концентрации ТБК-реактивных продуктов (ТБКРП) [6], которая представлена в единицах концентрации малонового диальдегида (МДА) на единицу веса белка. Молярный коэффициент экстинкции комплекса МДА-ТБК считали равным $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [3]. Получали концентрацию ТБКРП в сле-

дующих единицах: мкмоль МДА/г белка. Концентрацию белка в растворе (ЛНП + ЛОНП) определяли по методу Лоури (7). Для измерения интенсивности флуоресценции (F) отбирали 0,02 мл раствора ЛНП + ЛОНП и растворяли в 1 мл буферного раствора следующего состава: 0,28 М сахарозы, 10 мМ трис, 2 мМ ЭДТА, рН 7,4. В работе использовали флуоресцентные зонды антрацен (Sigma, США), 4-диметиламинахалкон (ДМХ) и 3-метоксибензантрон (МБА), синтезированные Б.М. Красовицким (НПО "Монокристаллреактив", г. Харьков, Украина). Интенсивность (F) и спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре F-3000 фирмы Hitachi (Япония) в стан-

дартной 1 см прямоугольной кварцевой кювете при щелях возбуждения и флуоресценции 5 нм.

Результаты. Измерения проводили при маленьких концентрациях зондов (1 мкМ), что позволило минимизировать ошибки от тривиальных эффектов, связанных с экранировкой и реабсорбцией флуоресцентного света, и достоверно выявлять изменения интенсивности флуоресценции зондов, обусловленные изменением эффективного количества флуоресцирующего вещества. Спектры флуоресценции зондов в нативных ЛНП+ЛОНП (находившихся в холодильнике) и окисленных (после их инкубации в течение 20 ч) представлены на рис. 1–3.

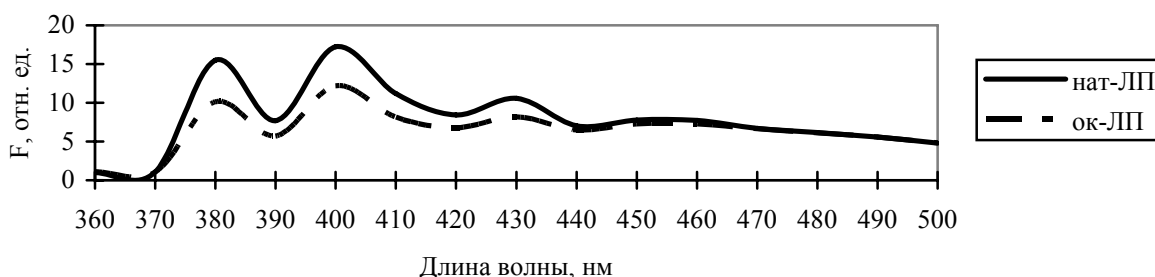


Рис. 1. Спектр флуоресценции антрацена (1 мкМ) в нативных ([ТБКРП]=1,0 мкмоль МДА/г белка) и окисленных ([ТБКРП]=7,0 мкмоль МДА/г белка ЛНП+ЛОНП (0,02 г белка/л). Длина волны возбуждения 350 нм.

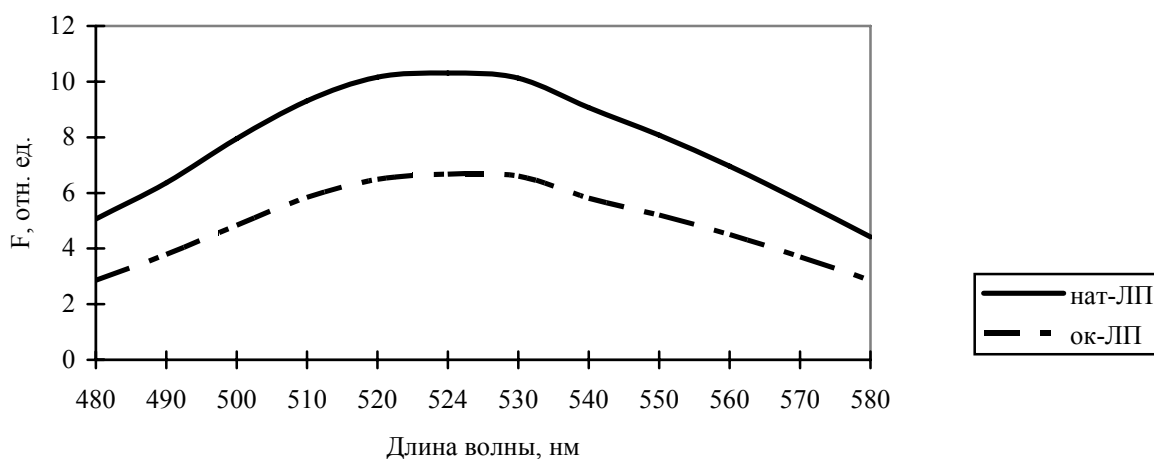


Рис. 2. Спектр флуоресценции МБА (1 мкМ) в нативных ([ТБКРП] = 1,0 мкмоль МДА/ г белка) и окисленных ([ТБКРП] = 7,0 мкмоль/г белка ЛНП + ЛОНП (0,02 г белка/л). Длина волны возбуждения 448 нм.

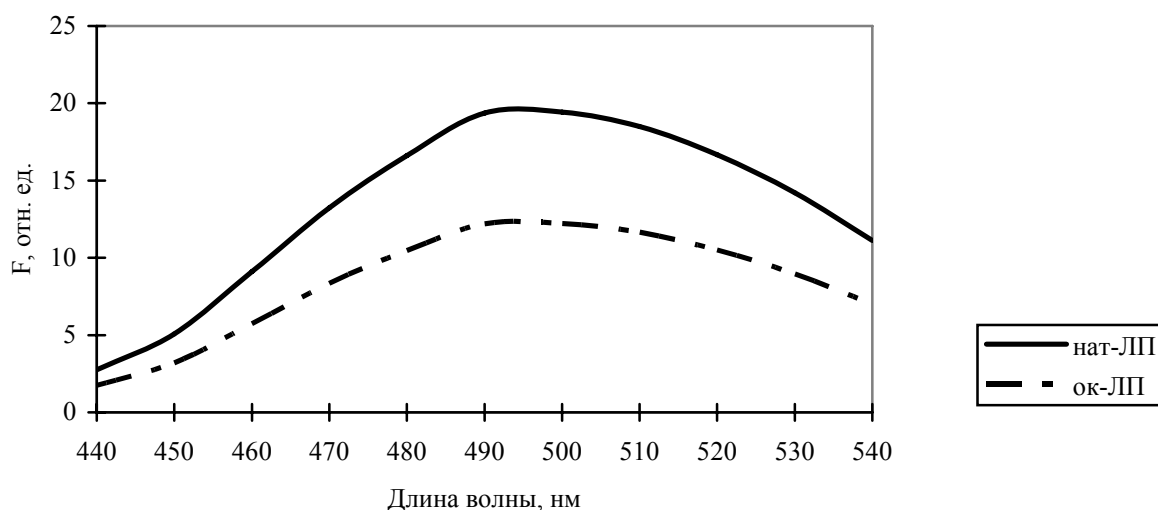


Рис. 3. Спектр флуоресценции ДМХ (1 мкМ) в нативных ([ТБКРП] = 1,0 мкмоль МДА/г белка) и окисленных ([ТБКРП] = 7,0 мкмоль МДА/г белка) ЛНП + ЛОНП (0,02 г белка/л). Длина волны возбуждения 420 нм.

Таким образом, флуоресцентные зонды можно использовать для контроля за процессами перекисного окисления липидов в липопротеинах низкой и очень низкой плотности.

Литература

1. Айтбаев К.А., Айдыралиев Р.К., Игембердиева О.А. Окисленные липопротеиды низкой плотности: биохимический состав, механизмы формирования, биологическая активность и связь с коронарной болезнью сердца // Центральноеазиат. мед. ж. – 2005. – Т. 11. – №1. – С. 61–68.
2. Mertens A., Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis // FASEB J. – 2001. – V. 15. – №3. – P. 2073–2084.
3. Panasenko O.M., Evgina S.A., Aidyaliev R.K., Sergienko V.I., Vladimirov Y.A. Peroxidation of human blood lipoproteins induced by exogenous hypochlorite or hypochlorite generated in the system of “myeloperoxidase+H₂O₂+Cl⁻” // Free Radic. Biol. Med. – 1994. – V. 16. – №2. – P. 143–148.
4. Burstein M., Scholnick H. R., Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions // J. of Lipid Research. – 1970. – V. 11. – №6. – P. 583–595.
5. Игембердиева О.А., Айдыралиев Р.К., Алымкулова А., Айтбаев К.А. Изменения собственной и зондовой флуоресценции в липопротеинах низкой и очень низкой плотности, выделенных осаждением в присутствии гепарина-Mn // Центральноеазиат. мед. ж. – 2004. – Т. 10. – №1. – С. 13–15.
6. Uchiyama M., Michara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // Analytical Biochemistry. – 1978. – V. 86. – №3. – P. 271–278.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – №1. – P. 265–275.