

УДК:576-577.112.2

РІВЕНЬ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГІДУ В КУЛЬТИВОВАНИХ КЛІТИНАХ ЗА ВПЛИВУ СПОЛУК ЗІ СТИМУЛЮЮЧОЮ ТА ІНГІБУЮЧОЮ ДІЄЮ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ

© Д. В. Шелест, О. В. Колотій, К. О. Свиридова, Л. В. Гарманчук

Підібрано оптимальний метод визначення продукту перекисного окиснення ліпідів – малонowego диальдегіду (МДА) у культурі клітин та визначено вплив тестових речовин на рівень ТБК-активних продуктів (МДА) клітин МАЕС, HeLa та L1210. Рівень МДА в клітинах МАЕС відрізняється від контролю в 2,7 разів, для HeLa – в 3,6 разів, для L1210 – в 4 рази

Ключові слова: малоновий диальдегід, перекисне окиснення ліпідів, ТБК-активні продукти, дієнові кон'югати

The optimal method for the determination of lipid peroxidation product - malondialdehyde (MDA) in cell culture was selected and the effect of test drugs on the level of TBA-active products of MAEC, HeLa and L1210 cells was determined. The MDA level in MAEC cells is different from control by 2.7 times, for HeLa – by 3.6 times, and for L1210- by 4 times

Keywords: malondialdehyde, lipid peroxidation, TBA-active products, diene conjugates

1. Вступ

Збільшення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), надмірна активація вільнорадикальних процесів спостерігається при різноманітних патологіях, зокрема, при розвитку злоякісних пухлин різної локалізації. Прогресування онкологічних захворювань перебуває у зв'язку з дестабілізацією процесів ПОЛ, результатом чого є неконтрольований перерозподіл активності перекисно-окисних та антиоксидантних реакцій в тканинах організму хворого [1, 2].

Метаболічні процеси в організмі тісно пов'язані з окисно-відновними, а саме з вільнорадикальними реакціями, в результаті яких утворюються перекисні сполуки. До вільних радикалів належать молекули або фрагменти молекул, які мають неспарений електрон на зовнішній орбіталі, наприклад, гідроксил, супероксид-аніон радикал, діоксид і монооксид азоту, пероксид. У нормі їх рівень в організмі незначний. Однак при патогенезі багатьох захворювань утворення активних форм кисню та азоту значно прискорюється, внаслідок чого відбувається пошкодження структур на клітинному, тканинному й організменому рівнях та розвиток оксидативного стресу [3]. Активні форми кисню викликають пошкодження нуклеїнових кислот, амінокислот, денатурацію білків та, відповідно, втрату ними функціональної активності. Проте найбільш негативно вони впливають на поліненасичені жирні кислоти, які входять до складу клітинної мембрани. Результатом перекисного окиснення ліпідів є зниження плинності мембран та втрата ними бар'єрних функцій.

Перекисне окиснення ліпідів вважається основним механізмом, залученим до окисного пошкодження клітинних структур, яке призводить до загибелі клітин, адже окисне пошкодження фосфоліпідів відбувається в більшості клітинних мембран, в тому числі в мембранах мітохондрій. Окиснення кардіоліпіну, що входить до складу мітохондріальних мембран, може бути одним з найважливіших факторів, що ініціюють апоптоз, внаслідок вивільнення цитохрому с, який

активує протеолітичний каскад, що призводить до апоптичної загибелі клітин [4].

2. Літературний огляд

Продуктами окиснення поліненасичених жирних кислот, основних субстратів вільнорадикальних реакцій, є гідроперекиси (дієнові кон'югати), які далі метаболізуються у вторинні (малоновий диальдегід) і третинні (шиффові основи) продукти перекисного окиснення ліпідів [5]. Негативний вплив малонowego диальдегіду полягає у тому, що він погіршує плинність мембран, наслідком чого є порушення процесів, пов'язаних зі зміною поверхні мембран, а саме фагоцитозу, піноцитозу, клітинної міграції [6]. Вільнорадикальним реакціям перекисного окиснення ліпідів, які відбуваються в ліпідному бішарі клітинних мембран, належить важлива роль у механізмі злоякісної трансформації [7, 8], а зміни окисно-антиоксидантного гомеостазу супроводжують процес канцерогенезу на всіх етапах малігнізації [2, 7, 9–12].

Порушення процесів перекисного окиснення ліпідів спричиняє метаболічну активацію канцерогенів та сприяє росту пухлин. Накопичення в організмі продуктів перекисного окиснення ліпідів призводить до виснаження антиоксидантної системи, що також відображається на стані органів і тканин організму. Це дає підстави вважати, що показники перекисного окиснення ліпідів є важливими для оцінки перебігу патологічного процесу.

3. Мета та задачі дослідження

Метою дослідження було адаптувати метод визначення ТБК-активних продуктів (МДА) для культури клітин та дослідити вплив сполук зі стимулюючою та інгібуючою дією на проліферацію за цим методом.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні задачі:

1. Підібрати оптимальні умови визначення продукту перекисного окиснення ліпідів малонowego диальдегіду (МДА) для культури клітин.

2. Визначити вплив тестових речовин на рівень ТБК-активних продуктів (МДА).

4. Матеріали і методи

Для адаптації методу визначення малонового діальдегіду визначення його вмісту за впливу тестових речовин використовували культури клітин лінії МАЕС (аортальні ендотеліальні клітини мишей), HeLa (карцинома шийки матки людини) та L1210 (лімфобластоми миші). Культивування проводилось за стандартних умов: температура 37 °С, 100 % вологість та 5 % CO₂ з використанням поживного середовища RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС).

Для отримання суспензії адгезивних клітин (МАЕС та HeLa) використовували метод трипсинізації. Клітини у пластиковому контейнері промивали фізіологічним розчином, вносили 1–1,5 мл розчину трипсину, інкубували 4–5 хв за температури 37 °С, відібрали суміш у центрифужну пробірку з середовищем культивування, центрифугували при 1200 об/хв. 10 хвилин, осад розчинили в 1 мл фізіологічного розчину. Концентрацію клітин підраховували в камері Горяєва.

Метод визначення концентрації ТБК-активних продуктів (МДА) базується на тому, що за температури кипіння в кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при $\lambda=532$ нм. Отриману суспензію клітин у кількості 100 мкл (концентрація клітин – 1 млн/мл) вносили в центрифужну пробірку та довели об'єм до 500 мкл фізіологічним розчином. Додавали до суміші 200 мкл 17 % трихлороцтової кислоти (ТХО). В контрольний зразок вносили 500 мкл фізіологічного розчину та 200 мкл 17 % ТХО. Після осадження білків проводили центрифугування проб при 1500 об/хв на протязі 15 хвилин. Супернатант відбирали у кількості 500 мкл і додавали 250 мкл 0,8 % ТБК. Після вортексування проби інкубували у киплячій водянній бані в пробірках з притертими пробками протягом 10 хвилин для розвитку забарвлення. Оптичну густину розчину визначали спектрофотометрично при $\lambda=532$ нм.

Концентрацію ТБК-активних продуктів (МДА) розраховували за формулою:

$$C = E_{\text{досл}} / E_{\text{кал}} * 3,0,$$

де С – концентрація МДА, мкмоль/л; D – оптична густина; 7,5 – розведення; 1,56 – молярний коефіцієнт екстинкції МДА (V. P. Navitlov, 1987).

5. Результати та обговорення

Першим етапом дослідження була адаптація методу визначення ТБК-активних продуктів (МДА) у сироватці крові для культури клітин. В результаті до-

сліджень було виявлено, що рівень МДА для клітинної лінії МАЕС достовірно відрізняється від контролю в 2,7 разів, для клітинної лінії HeLa – в 3,6 разів, а для клітин L1210 – в 4 рази (рис. 1).

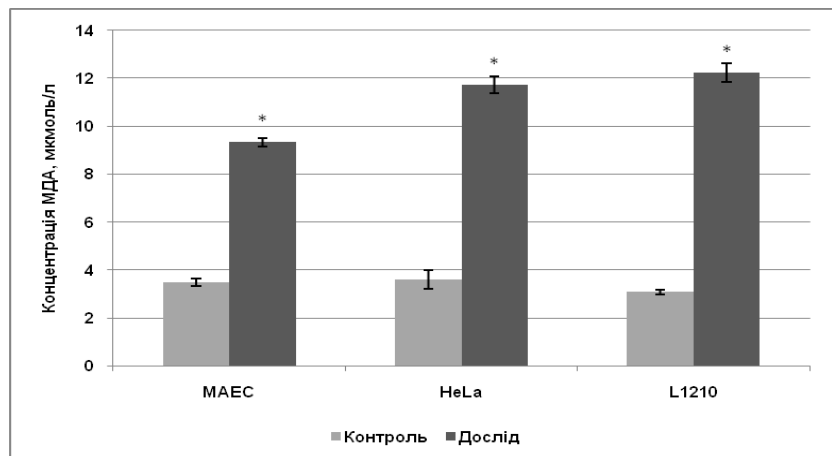


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів (МДА) в клітинах ліній МАЕС, HeLa, L1210 ($M \pm m$, $n=5$): * – $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

Якщо порівнювати рівень МДА у клітинах карциноми шийки матки HeLa та в клітинах лімфобластоми миші L1210, то він істотно не відрізняється. А в аортальних ендотеліальних клітинах миші МАЕС рівень МДА дещо нижчий ніж у HeLa та L1210 (на 2,6 мкмоль/л), що обумовлено відносною трансформованістю клітин лінії МАЕС.

Отже, в результаті цього дослідження був адаптований метод визначення ТБК-активних продуктів (МДА) для визначення їх в культурі клітин. Рівень малонового діальдегіду достовірно змінюється відносно контролю. Це дозволяє використовувати цей метод для визначення ТБК-активних продуктів (МДА) у клітинах за впливу тестових препаратів.

Наступним етапом дослідження було визначення ТБК-активних продуктів (МДА) у клітинах лімфобластоми миші лінії L1210 за впливу тестових речовин: герцептин, цисплатин, перекис водню, епідермальний фактор росту (EGF), відкрита та закрита форма пептидоміметика GS-DProSw (рис. 2). Оскільки МДА є одним з продуктів перекисного окислення ліпідів, визначення його кількості може бути одним з методів оцінки інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів.

Було показано, що рівень МДА перевищував контрольні значення в клітинах, які були культивовані з додаванням герцептину (в 3,8 разів), цисплатину (в 2,9 разів) та перекису водню (в 4,2 рази). Отже, можна зробити висновок, що дані речовини підвищують інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів у клітинах L1210.

Щодо клітин лімфобластоми миші L1210, які культивували з додаванням епідермального фактора росту, відкритою та закритою формою пептидоміметика GS-DProSw, то достовірних змін рівня МДА не спостерігалось. Отже, дані досліджувані речовини, з якими інкубувалися клітини L1210, не впливають на процеси перекисного окислення ліпідів у цих клітинах.

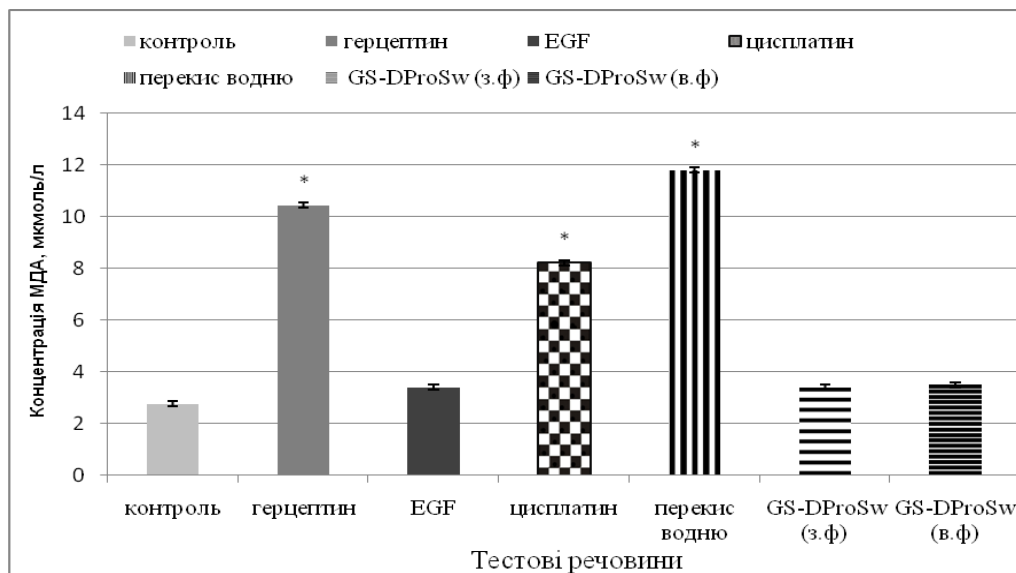


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів (малоновогодіальдегіду) в клітинах лімфобластоми миші L1210 за дії дослідних речовин ($M \pm \sigma$, $n=5$): * – $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

6. Висновки

Завдяки проведеному дослідженню було адаптовано метод визначення малонового діальдегіду в культурах клітин. Рівень малонового діальдегіду достовірно зростає відносно контролю. Це дало можливість, за допомогою даного методу, дослідити зміни цього показника за впливу тестових препаратів, оцінити інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів у клітинах L1210. Було встановлено, що рівень ТБК-активних продуктів (МДА) перевищував контрольні значення в клітинах L1210, які інкубувались із додаванням герцептину, цисплатину та перекису водню, що свідчить про підвищення інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів в цих клітинах. При культивуванні клітин з додаванням епідермального фактора росту, відкритою та закритою формою пептидоміметика GS-DProSw-достовірних змін рівня малонового діальдегіду не спостерігалось, отже ці речовини не впливають на процеси перекисного окислення ліпідів у клітинах.

Література

1. Сутковий, Д. А. До питання про роль процесів пероксидації в етіології онкогенезу ЦНС [Текст] / Д. А. Сутковий, В. Д. Розуменко, Т. А. Макарова, Ю. П. Верхогляд // Міжнародний неврологічний журнал. – 2005. – № 3. – С. 118–123.
2. Yilmaz, N. Lipid peroxidation in patients with brain tumor [Text] / N. Yilmaz, H. Dulger, N. Kiymaz, C. Yilmaz, I. Bayram, B. Ragip, M. Oger // International Journal of Neuroscience. – 2006. – Vol. 116, Issue 8. – P. 937–943. doi: 10.1080/00207450600553141
3. Колісник, М. І. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітини [Текст] / М. І. Колісник, Г. В. Колісник // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 59–70.
4. Navarro, A. Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease [Text] / A. Navarro, A. Boveris // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2009. – Vol. 41, Issue 6. – P. 517–521. doi: 10.1007/s10863-009-9250-6
5. Зенков, М. К. Окислювальний стрес [Текст] / М. К. Зенков, В. З. Ланкін, С. Б. Меншикова. – М.: Наука, 2001. – 342 с.

6. Тарасов, Н. И. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения [Текст] / Н. И. Тарасов, А. Т. Тепляков, Е. В. Малахович и др. // Терапевтический архив. – 2002. – № 12. – С. 12–15.

7. Зозуля, Ю. А. Роль перекисного окислення ліпідів і антиоксидантної системи у патогенезі пухлин головного мозку (огляд літератури та власних досліджень) [Текст] / Ю. А. Зозуля, В. А. Барабой, Д. А. Сутковий // Журнал АМНУ. – 2002. – Т. 8, № 1. – С. 26–40.

8. Синько, Л. Н. Роль оксида азота в патогенезі гліом [Текст] / Л. Н. Синько, Ю. А. Зозуля // Экспериментальная онкология. – 2000. – Т. 22, № 4. – С. 246–250.

9. Cirak, B. Lipid peroxidation in cerebral tumors [Text] / B. Cirak, S. Inci, S. Palaoglu, V. Bertan // Clinica Chimica Acta. – 2003. – Vol. 327, Issue 1-2. – P. 103–107. doi: 10.1016/s0009-8981(02)00334-0

10. Jeong, J. I. Chemical hypoxia-induced cell death in human glioma cells: role of reactive oxygen species, ATP depletion, mitochondrial damage and Ca^{2+} [Text] / J. I. Jeong, Y. W. Lee, Y. K. Kim // Neurochemical Research. – 2003. – Vol. 28, Issue 8. – P. 1201–1211.

11. Leaver, H. A. Intracellular oxidation by human glioma cell populations: effect of arachidonic acid [Text] / H. A. Leaver, J. R. Williams, C. Smith // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2004. – Vol. 70, Issue 5. – P. 449–453. doi: 10.1016/j.plefa.2003.09.005

12. Гаврилов, В. П. Методика определения малонового диальдегида в сыворотке крови [Текст] / В. П. Гаврилов, А. П. Гаврилова, И. Г. Майорова // Вопр. мед. химии. – 1987. – № 1. – С. 118–122.

References

1. Sutkovej, D. A., Rozumenko, V. D., Makarova, T. A., Verhogljadov, Ju. P. (2005). Do pytannja pro rol' procesiv peroksydaciji v etiologii onkogenezu CNS. Mizhnarodnyj nevrologichnyj zhurnal, 3, 118–123.
2. Yilmaz, N., Dulger, H., Kiymaz, N., Yilmaz, C., Bayram, I., Ragip, B., Oger, M. (2006). Lipid peroxidation in patients with brain tumor. International Journal of Neuroscience, 116 (8), 937–943. doi: 10.1080/00207450600553141
3. Kolisnyk, M. I., Kolisnyk, G. V. (2009). Aktyvni formy kysnju ta i'h rol' u metabolizmi klityny. Biologija tvaryn, 11 (2), 59–70.

4. Navarro, A., Boveris, A. (2009). Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41 (6), 517–521. doi: 10.1007/s10863-009-9250-6
5. Zenkov, M. K., Lankin, V. Z., Menshykova, Je. B. (2001). *Okysljuval'nyj stres*. Moscow: Nauka, 342.
6. Tarasov, N. I., Tepljakov, A. T., Malahovich, E. V. et. al. (2002). Sostojanie perekisnogo okislenija lipidov, antioksidantnoj zashhity krovi u bol'nyh infarktomiokarda, otjagoshhennym nedostatochnost'ju krovoobrashhenija. *Terapevticheskij arhiv*, 12, 12–15.
7. Zozulja, Ju. A., Baraboj, V. A., Sutkovej, D. A. (2002). Rol' perekysnogo okysnennja lipidiv i antyoksydantnoi systemy u patogenezi puhlyn golovnogo mozku (ogljad literatury ta vlasnyh doslidzhen'). *Zhurnal AMNU*, 8 (1), 26–40.
8. Sin'ko, L. N., Zozulja, Ju. A. (2000). Rol' oksida azota v patogeneze gliom. *Jeksperimental'naja onkologija*, 22 (4), 246–250.
9. Cirak, B., Inci, S., Palaoglu, S., Bertan, V. (2003). Lipid peroxidation in cerebral tumors. *Clinica Chimica Acta*, 327 (1-2), 103–107. doi: 10.1016/s0009-8981(02)00334-0
10. Jeong, J. I., Lee, Y. W., Kim, Y. K. (2003). Chemical hypoxia-induced cell death in human glioma cells: role of reactive oxygen species, ATP depletion, mitochondrial damage and Ca^{2+} . *Neurochemical Research*, 28 (8), 1201–1211.
11. Leaver, H. A., Williams, J. R., Smith, C. (2004). Intracellular oxidation by human glioma cell populations: effect of arachidonic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70 (5), 449–453. doi: 10.1016/j.plefa.2003.09.005
12. Gavrilov, V. P., Gavrilova, A. R., Majorova, I. G. (1987). Metodika opredelenija malonovogo dial'degida v syrovatke krovi. *Vopr.med.himii*, 1, 118–122.

Дата надходження рукопису 14.10.2016

Шелест Дмитро Васильович, аспірант, кафедра біохімії, ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: diemondos@gmail.com

Колодій Ольга Вікторівна, кафедра біохімії, ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: kolotiiolga@gmail.com

Свиридова Катерина Олексіївна, кафедра біохімії, ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: kathybiologist@gmail.com

Гарманчук Людмила Василівна, доктор біологічних наук, професор, кафедра фундаментальної медицини, ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: liudmyla_garmanchuk@ukr.net

УДК 577.152.1

СКРИНІНГ ШТАМІВ МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ – ПРОДУЦЕНТІВ ЛАККАЗИ

© О. М. Демків, С. Я. Банах, С. В. Притула, Г. З. Гайда, М. В. Гончар

*Здійснено скринінг штамів мікроскопічних грибів за здатністю до синтезу лаккази та відібрано краці продуценти позаклітинного ферменту – штами *Stachybotris chartarum* та *Monilinia fructicola*. Вперше показано здатність гриба *S. chartarum* екскреторно продукувати лакказу, оптимізовано умови культивування клітин цього штаму, в аналітичній кількості одержано цільовий фермент та встановлено молекулярну масу субодиниці лаккази (50 кДа)*

Ключові слова: мікроскопічні гриби, скринінг продуцентів, лаккази, штам *Stachybotris chartarum*, умови культивування

*The screening of fungal strains on a capability to laccase synthesis was carried out and the best producers of extracellular enzyme – *Stachybotris chartarum* and *Monilinia fructicola* strains were selected. The ability of the fungus *S. chartarum* to produce laccase extracellularly was demonstrated in the first time, the optimal conditions for cultivation of the cells were selected, analytical quantity of a goal enzyme was obtained and the molecular mass of laccase subunit was determined (50 kDa)*

Keywords: fungi, screening of producing strains, laccase, *Stachybotris chartarum* strain, cultivation conditions