

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.115.3+577.112.854

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-44-54>

Поступило в редакцию 11.09.2018

Received 11.09.2018

**Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский,
Ю. Ш. Ермакович, Г. С. Евдокимова**

*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

ЭФФЕКТ УФ-ОБЛУЧЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИОГЛОБИНА

(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)

Аннотация. Изучена эффективность свободнорадикального окисления высших жирных кислот (пальмитиновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, комплекса непредельных жирных кислот ряда Омега-3 и Омега-6 растительного происхождения) под воздействием УФ-облучения ($\lambda = 180\text{--}400$ нм) как возможного маркера перекисного окисления липидной фазы. Мицеллы жирных кислот в этиловом спирте были использованы в качестве модели липидной фазы. Эффект УФ-облучения на жирные кислоты определяли по спектральным изменениям миоглобина в области полосы Соре. Уровень перекисного окисления липидной фазы в то же время оценивали по накоплению малонового диальдегида как хорошо известного продукта облучения фосфолипидов. Получена прямо пропорциональная зависимость интенсивности разностного спектра Мб (ΔD) от числа двойных связей в молекуле окисленных жирных кислот, а также от времени их УФ-облучения и накопления вторичных продуктов перекисного окисления липидов. Это показывает, что спектральные изменения Мб под действием пула окисленных форм жирных кислот хорошо коррелируют с уровнем перекисного окисления липидной фазы и могут охарактеризовать антиоксидантный потенциал крови при совместном использовании с известным антиоксидантом Тролоксом в качестве ингибитора-калибратора.

Ключевые слова: жирные кислоты, миоглобин, УФ-облучение, общая антиоксидантная способность, антиоксидантный потенциал

Для цитирования. Эффект УФ-облученных жирных кислот на спектральные свойства миоглобина / Н. М. Литвинко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 1. – С. 44–54. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-44-54>

Natalia M. Litvinko, Lydia A. Skorostetskaya, Denis O. Gerlovsky, Yulia Sh. Ermakovich, Grazhina S. Evdokimova

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

EFFECT OF UV-IRRADIATED FATTY ACIDS ON THE SPECTRAL PROPERTIES OF MYOGLOBIN

(Communicated by Corresponding Member Sergei A. Usanov)

Abstract. The efficiency of free radical oxidation of higher fatty acids (palmitic, oleic, linoleic, linolenic acids, complex of unsaturated fatty acids of omega-3 and omega-6 plant origin) under the influence of UV irradiation ($\lambda = 180\text{--}400$ nm) as a possible marker of lipid peroxidation is studied. Micelles of fatty acids (FA) in ethyl alcohol were used as a model of the lipid phase. The effect of UV irradiation on fatty acids was determined from the spectral changes of myoglobin in the region of the Soret band. The level of peroxide oxidation of the lipid phase at the same time was estimated from the accumulation of malonic dialdehyde as a well-known product of irradiation of phospholipids. The direct proportional dependence of the intensity of the difference spectrum of Mb (ΔD) on the number of double bonds in the molecule of oxidized fatty acids, as well as on the time of their UV irradiation and the accumulation of secondary LPO products is obtained. This shows that the spectral changes of Mb under the action of the pool of oxidized forms of fatty acids correlate well with the level of lipid phase peroxidation and can characterize the antioxidant potential of the blood when combined with the known antioxidant Trolox as a calibrator-inhibitor.

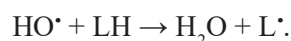
Keywords: fatty acids, myoglobin, UV irradiation, general antioxidant capacity, antioxidant potential

For citation: Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O., Ermakovich Yu. Sh., Evdokimova G. S. Effect of UV-irradiated fatty acids on the spectral properties of myoglobin. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 1, pp. 44–54 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-44-54>

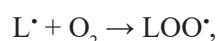
Введение. Важным патогенетическим фактором развития многих заболеваний человека, в том числе сердечно-сосудистых, бронхолегочных, онкологических, ревматических, нейродегенеративных и т. д., являются активные формы кислорода (АФК), образующиеся в клетке в фер-

ментативных и ферментативных процессах под действием внешних и внутренних факторов и инициирующие окислительный стресс [1].

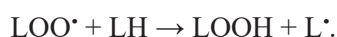
Наиболее предрасположены к реакциям окисления под действием АФК фосфолипиды (ФЛ) клеточных мембран с образованием гидроперекисей по остаткам ненасыщенных жирных кислот (ЖК), входящих в их состав. Механизм перекисного окисления липидов (ПОЛ) хорошо изучен [2]: в липидном слое биологических мембран образуются липидные радикалы



Липидный радикал (L) вступает в реакцию с растворенным в среде молекулярным кислородом; при этом образуется новый свободный радикал – радикал липоперекиси (LOO[•]):

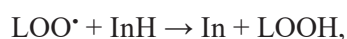
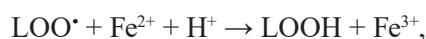


который атакует одну из соседних молекул фосфолипида с образованием гидроперекиси липида LOOH (окисленных фосфолипидов – Ок-ФЛ) и нового радикала L[•]:



Чередование двух последних реакций как раз и представляет собой цепную реакцию ПОЛ.

Цепь обрывается в результате взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантами (InH), ионами металлов переменной валентности (например, Fe²⁺) или друг с другом:



Регуляция продукции АФК в тканях и органах человека осуществляется с помощью антиоксидантной системы, поэтому в нормальном состоянии их концентрации в тканях незначительны: H₂O₂ – 10⁻⁸–10⁻¹¹ М, HO[•] < 10⁻¹¹ М [3]. Однако при нарушении баланса между окислительно-восстановительными реакциями и антиоксидантной защитой клетки образование избытка АФК, например, в результате радиационного или ультрафиолетового (УФ) излучения, оказывает негативное действие на организм. В этом случае жизненно важные функции ДНК, белков, липидов, низкомолекулярных биорегуляторов нарушаются за счет образования органических гидропероксидов, которые модулируют дальнейшее свободно-радикальное окисление этих биоструктур [4]. В связи с этим большое внимание уделяется разработке способов определения антиоксидантного потенциала организма человека для характеристики его функциональных возможностей [5].

Ранее мы показали, что системы «фосфолипаза А₂–гемоглобин–Ок-ФЛ» [6; 7] и «гемоглобин–Ок-ФЛ»¹ [8] за счет спектральных изменений гемопротейна под действием Ок-ФЛ могут служить индикаторами про-антиоксидантного статуса организма и способности к противодействию УФ-облучению как фактору инициации окислительного стресса.

На практике широко используется метод оценки общей антиоксидантной активности (ОАА) биологических жидкостей человека и животных, предложенный фирмой Randox (Великобритания) на основе системы «метмиоглобин–H₂O₂–ABTS–Тролокс», в которой при каталитическом разложении H₂O₂ метмиоглобин инициирует активные радикалы, окисляющие хромогенный субстрат ABTS, а водорастворимый аналог токоферола тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксикислота) замедляет этот процесс [9]. Создана с использованием миоглобина аналогичная отечественная тест-система «ОксиСтат», применение которой для оценки антиоксидантного потенциала черного и зеленого чая показало сравнимые результаты с предложенной нами системой «гемоглобин–Ок-ФЛ» [10].

¹ Способ определения общей антиоксидантной способности биологической жидкости с использованием липидной фазы: Патент ВУ № 19670 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский. Дата публ.: 30.12.2015.

Имеются сведения о влиянии окисленных производных миоглобина на скорость начального перекисного окисления линолевой кислоты в гетерогенной модельной системе. Обнаружено, что при связывании с линолеатом в присутствии перекиси водорода наблюдается переход миоглобина Mb в низко-спиновую форму (гемихром), который сопровождается изменениями его поглощения в области полосы Soret (410 или 424 нм), а также при 502 и 630 нм [11].

Цель работы – исследование взаимодействия УФ-облученных жирных кислот (Ок-ЖК) с миоглобином (Mb) как маркера ПОЛ методом дифференциальной спектроскопии в области полосы Soret и последующим его использованием для оценки антиоксидантного потенциала крови.

Выбор миоглобина обусловлен тем, что это – мономерный белок, который в отличие от тетрамерного гемоглобина имеет только один сайт связывания кислорода, а также лишен аллостерических эффектов биополимеров, состоящих из нескольких субъединиц.

Материалы и методы исследования. В работе использовали олеиновую (Купавнареактив, Россия), линолевую, линоленовую (Sigma), пальмитиновую (Реахим, Россия) кислоты, миоглобин (Mb, Sigma, мет-форма $\geq 95\%$), остальные реактивы отечественного производства. Все органические растворители перед использованием очищались перегонкой. Коммерческая смесь, содержащая полиненасыщенные жирные кислоты ряда Омега-3 и Омега-6 (Польша).

Облучение субстрата осуществляли с помощью облучателя медицинского назначения ОКУФ 5М, имеющего в качестве источника УФ ртутно-кварцевую лампу ПРК-4, диапазон излучения 180–400 нм. Под источник УФ на расстоянии 4 см от края облучателя помещали во флаконах раствор ЖК в этаноле и такие же образцы, но содержащие антиоксидант – биологическую жидкость и стандартный эталон сравнения – Тролокс в разных концентрациях.

Определение спектральных свойств Mb. Реакционная смесь, содержащая 0,05М трис-НСI-буферный раствор, pH 8,0 помещалась в две односантиметровые кюветы и прописывалась нулевая линия, затем добавляли от 15 до 200 нмоль ОК, ПК, ЛК-2, ЛК до и после УФ-облучения либо коммерческую смесь ЖК на мл 5 мкМ (по гемму) Mb.

Дифференциальные спектры записывали в области полосы Soret: от 380 до 430 нм.

По истечении выбранного периода времени аликвота облученных УФ мицелл ЖК в этаноле добавлялась к опытной кювете с одновременным внесением такого же количества буферного раствора к контрольной кювете и сразу же регистрировались дифференциальные спектры в термостатируемых при 20 °С ячейках в режиме пропускания T75–125 %.

Интенсивность перекисного окисления липидов контролировали по количеству образующегося малонового диальдегида (МДА) с помощью тиобарбитуровой кислоты. Для этого к 0,3 мл раствора Ок-ЖК (в этаноле) добавляли 1,5 мл 20 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты, 1 мл 0,9 %-ной тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и 0,6 мл дистиллированной воды. Полученную смесь помещали в кипящую водяную баню на 60 мин. После охлаждения пробы центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Затем измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре SOLAR ($\lambda = 532$ нм). В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Концентрация МДА вычислялась в ходе построения калибровочной кривой, исходя из известных концентраций МДА.

Определение общей антиоксидантной способности крови. Количественную характеристику общей антиоксидантной способности (ОАС) крови человека с помощью Ок-ЖК проводили по калибровочным кривым, построенным с использованием стандартного антиоксиданта Тролокса. Для этого использовали 1 мМ раствор, приготовленный в тот же день. Исходный раствор готовили по навеске с учетом коэффициента молярной экстинкции Тролокса в этаноле $E_M = 3260$, $\lambda = 292$ нм [12].

Результаты и их обсуждение. Анализ радикальных продуктов липидов, образовавшихся под действием АФК, достаточно сложен из-за нестабильности этих соединений. Поэтому широкое распространение получили методы изучения молекулярных продуктов ПОЛ, которые условно можно разделить на первичные (гидроперекиси липидов, диеновые конъюгаты и др.), вторичные (малоновый диальдегид, триеновые конъюгаты и др.) и конечные (шиффовы основания и газообразные соединения). В основном, методы определения Ок-ФЛ основываются на измерении содержания вторичного продукта ПОЛ – МДА. Для секвенирования полярных и УФ-Ок-ФЛ

используется также микрокапиллярная жидкостная хроматография в тандеме с масс-спектрометрией (LC / MS / MS) [12].

В качестве источника АФК нами выбрано УФ-облучение, чтобы исключить внесение в систему дополнительных суперактивных реагентов, таких, например, как перекись водорода, используемую в других работах [13].

Основной мишенью для АФК при УФ-облучении служила олеиновая кислота (ОК, С18:1) – самый простой представитель класса непредельных липидов, содержащий неразветвленную углеводородную цепь и одну непредельную связь. Для сравнения изучили действие на Мб пула других УФ-облученных жирных кислот: пальмитиновой (ПК, С16:0), линолевой (ЛК-2, С18:2) и линоленовой кислоты (ЛК, С18:3), а также смеси растительных масел и непредельных жирных кислот ряда Омега-3 и Омега-6.

Молекулярный кислород, необходимый для биологического окисления, как известно, поступает в клетки органов и тканей организма с помощью двух родственных гемопротееинов – гемоглобина (Hb) и миоглобина (Mb) [14].

Известно, что взаимодействие Hb с ЖК, а также с другими минорными липидами (лизолфосфатидилхолин, фактор активации тромбоцитов, глутароил- и азелоилфосфатидилхолин) приводит к образованию низко-спиновой окисленной формы гемопротееина – обратимого гемихрома [15].

Оба гемопротееина – Hb и Mb – имеют общее эволюционное происхождение, сходную конформацию отдельных полипептидных цепей и одинаковую функцию, но Mb является мономерным белком, состоящим из гема и белка апомиоглобина, а Hb – тетрамерным, состоящим из гема и белка глобина [14].

Подобно гемоглобину, Mb обратимо связывает кислород и может образовывать оксимиоглобин, карбокси-миоглобин или метмиоглобин и проявлять пероксидазную активность, которая использовалась как индикатор для установления антиоксидантных свойств пептидного ингибитора комплемента C1 в тестах на общую антиоксидантную способность, при анализе антиоксидантной способности гидроксильного радикала, анализе кислородной радикальной антиокислительной способности, а также анализе ТБК-зависимых продуктов [16]. Mb часто применяется для определения антиоксидантной активности различных соединений [17] или служит эталоном сравнения при определении протекторных свойств других глобинов в клетке от действия АФК [18]. Таким образом, эти данные указывают на то, что оба гемопротееина можно использовать в качестве индикаторов перекисного окисления липидов.

Для оценки глубины превращения Mb в гемихром под действием Ок-ЖК мы использовали метод разностной спектрофотометрии. В его основе лежит увеличение амплитуды разностного спектра Mb в области полосы Core (связанной с гемом) и сдвиг максимума в длинноволновую область при образовании гемихрома.

В процессе опыта с использованием спектрофотометра Specord UV-VIS (Германия) были получены дифференциальные спектры миоглобина (в опытной кювете по сравнению с контрольной) после добавления в опытную кювету с гемопротееином мицелл Ок-ЖК после воздействия УФ в течение определенного промежутка времени. Каждый дифференциальный спектр гемопротееина характеризовался максимумом (423 нм), минимумом (403 нм) и расстоянием между ними (ΔT). Единицы пропускания ΔT переводили в единицы поглощения ΔD по формуле $\Delta D = 2 - \lg(100 - T / 3)$.

На рис. 1 представлена схема взаимодействия Mb с ЛК до и после УФ-облучения и показано изменение интенсивности дифференциального спектра гемопротееина. Под действием УФ-окисленной ЛК амплитуда дифференциального спектра Mb (ΔD) более чем в 10 раз превышает аналогичный параметр в присутствии не окисленной жирной кислоты.

На рис. 2, а показана величина ΔD в разностном спектре Mb в присутствии ЖК разной степени насыщенности до и после воздействия УФ-облучения, откуда следует, что увеличение числа двойных связей в молекуле ЖК приводит к росту интенсивности дифференциальных спектров миоглобина в области полосы Core под действием УФ-облученных ЖК.

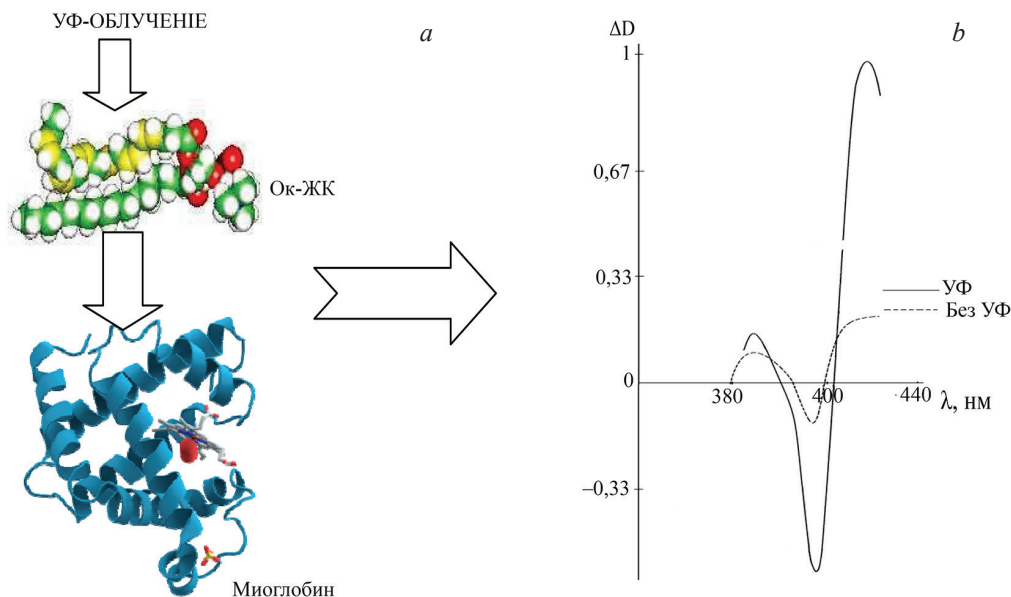


Рис. 1. Схема взаимодействия миоглобина с линоленовой кислотой: *a* – пространственная структура миоглобина построена на основе PDB 1MBO; *b* – дифференциальный спектр, отражающий процесс взаимодействия миоглобина с УФ-облученной (сплошная линия на дифференциальном спектре Mb) и не облученной (пунктирная линия) ЛК

Fig. 1. Scheme of interaction of myoglobin with linolenic acid: *a* – spatial structure of myoglobin is constructed on the basis of PDB 1MBO; *b* – differential structure showing the process of interaction of myoglobin with UV-irradiated (solid line on the differential spectrum of Mb) and non-irradiated (dotted line) of LA

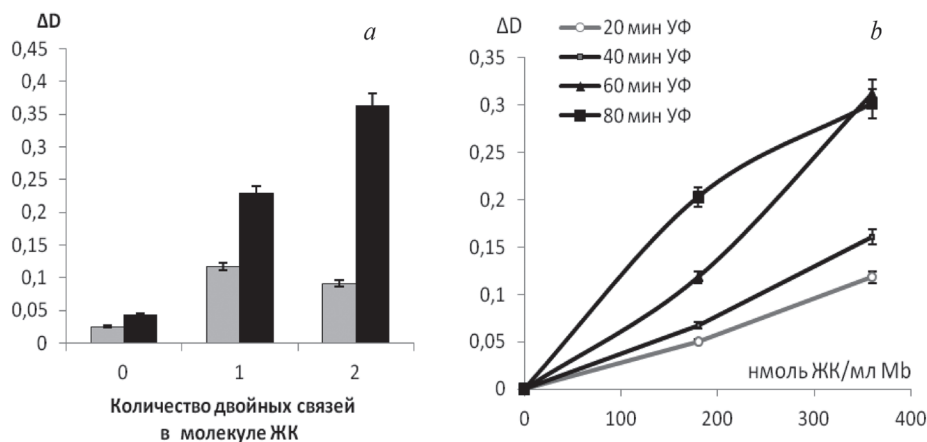


Рис. 2. Изменения в разностном спектре Mb в присутствии ЖК разной степени насыщенности до и после воздействия УФ-облучения: *a* – зависимость ΔD в разностном спектре Mb от числа двойных связей в ЖК: 0 – пальмитиновая (нет двойных связей), 1 – олеиновая, 2 – линолевая кислоты до облучения (серые столбики) и после воздействия УФ-облучения в течение 80 мин (черные столбики); *b* – зависимость ΔD в разностном спектре Mb от концентрации смеси полиненасыщенных эйкозапентаеновой и докозогексаеновой кислот с маслом огуречника и льна при разном времени облучения

Fig. 2. Changes in the difference spectrum of Mb in the presence of different saturation degree of FA before and after UV irradiation: *a* – dependence of ΔD in the difference spectrum of Mb on the number of double bonds in FA: 0 – palmitic (no double bonds), 1 – oleic, 2 – linolenic acids before irradiation (grey columns) and after UV irradiation during 80 min (black column); *b* – dependence of ΔD in the difference spectrum of Mb on the concentration of the mixture of non-saturated eicosopentanoic and decosopentanoic acids and the oil of borage and flax at different irradiation time

С целью подтверждения полученного эффекта спектрального отклика гемопротейна на окисление ненасыщенных связей в ЖК в процессе УФ-облучения, нами изучена зависимость интенсивности дифференциального спектра Mb от концентрации коммерческого препарата, содержащего смесь эйкозапентаеновой и докозогексаеновой кислот с растительными маслами огуречника и льна, также богатыми незаменимыми полиненасыщенными жирными кислотами

ряда Омега-3 и Омега-6, в условиях различной продолжительности облучения (рис. 2, *b*). Как видно из данных, представленных на рис. 2, *b*, эффект УФ-облученной смеси на спектральные свойства Mb носит выраженный дозозависимый характер и определяется временем УФ-облучения смеси, т. е. от полученной дозы УФ или степени его окисления. Таким образом, показано, что спектральные изменения Mb в области полосы Сорэ являются адекватным индикатором для оценки степени окисления ЖК.

Для выяснения механизма действия УФ-облученной ЖК на Mb изучили изменения в спектрах гемопротейна под влиянием ОК, как более стабильной по сравнению с ЛК, до и после (Ок-ОК) УФ-облучения при длинах волн, соответствующих максимуму (423 нм) и минимуму (405 нм) в дифференциальном спектре, развивающемся при их взаимодействии. Полагают, что выбор длины волны, близкой к 423 нм, обеспечивает точное измерение концентрации лиганд-гемопротейн [19], как это было продемонстрировано в случае определения гликированного гемоглобина [20].

На рис. 3, *a* показан уровень изменений в интенсивности поглощения Mb при 405 и 423 нм до и после облучения ОК.

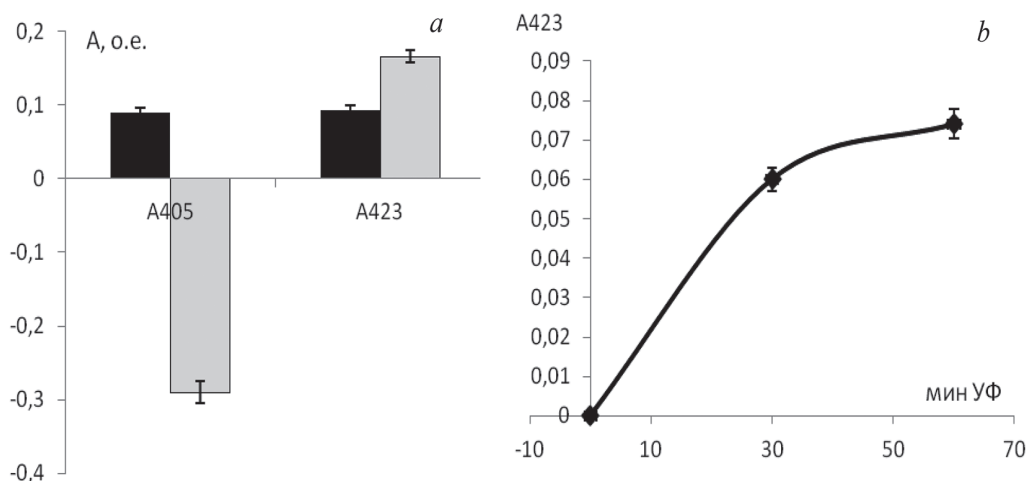


Рис. 3. Эффект УФ-облученных жирных кислот на спектральные свойства Mb при длинах волн, соответствующих максимуму (423 нм) и минимуму (405 нм) в разностном спектре этого гемопротейна: *a* – изменения поглощения Mb при 405 нм (слева) и 423 нм (справа) при добавлении к раствору Mb спиртового раствора ОК до (черные столбики) и после УФ-облучения в течение 60 мин (5 мкМ раствор Mb в 0,05 М Трис-НСl-буферном растворе, pH 8,0; 30 нмоль ОК/мл Mb); *b* – зависимость поглощения Mb при A_{423} от длительности УФ-облучения ОК. 0,05 М Трис-НСl-буферный раствор, pH 8,0, 60 нмоль ОК/мл Mb

Fig. 3. Effect of the UV-irradiated fatty acids on the spectral properties of Mb at the wavelengths corresponding to a maximum (423 nm) and a minimum (405 nm) in the difference spectrum of this hemoprotein: *a* – changes in Mb at 405 nm (left) and 423 nm (right) when the Mb solution is added with the OA alcohol solution before (black columns) and after UV irradiation during 60 min (5 μ M Mb solution Mb in 0.05 M Tris-HCl-buffer solution, pH 8.0; 30 nmole OA/ml Mb); *b* – dependence of Mb absorption at A_{423} on the time of UV irradiation of OA. 0.05 M Tris-HCl-buffer solution, pH 8.0, 60 nmole OA/ml Mb

Из приведенных на рис. 3, *a* диаграмм следует, что Ок-ОК вызывает разнонаправленные изменения спектра Mb в области максимума (423 нм) и минимума (405 нм). Изменения A_{423} Mb под действием ОК до и после воздействия ультрафиолета, как и ΔD (рис. 2), обнаруживают четкий дозозависимый эффект от продолжительности облучения (рис. 3, *b*) и по профилю изменений в интенсивности A_{423} Mb находятся в полном соответствии с действием на этот гемопротейн УФ-облученного фосфатидилхолина (рис. 4, *a*).

На графике 4, *a* видно, что максимум накопления первичных продуктов ПОЛ наблюдается к 50 мин УФ-облучения фосфатидилхолина. В качестве контроля протекания ПОЛ проведено определение МДА с использованием ТБК-зависимых продуктов (рис. 4, *b*).

Известно, что такие реактивные молекулы, как глиоксаль и метилглиоксаль реагируют с гем-содержащими белками с образованием гликированных конечных продуктов по реакции,

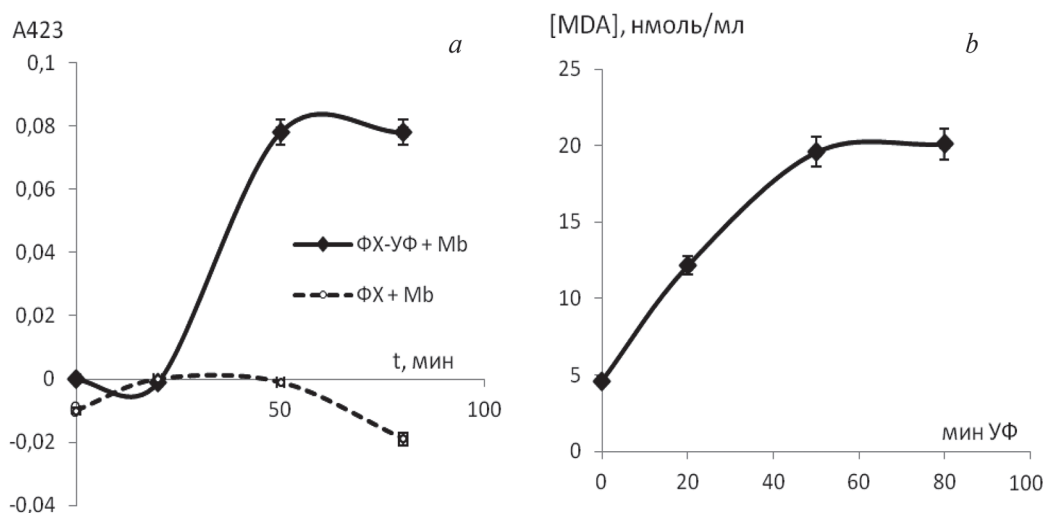


Рис. 4. Динамика накопления первичных (а) и вторичных (б) продуктов окисления фосфатидилхолина после УФ-облучения: а – зависимость поглощения Мб при длине волны 423 нм от времени УФ-облучения ФХ (ФХ – фосфатидилхолин (контроль); ФХ-УФ – облученный фосфатидилхолин; Мб – миоглобин); б – образование МДА в ходе ПОЛ

Fig. 4. Dynamics of accumulation of primary (a) and secondary (b) oxidation products of phosphatidylcholine after UV irradiation: a – dependence of Mb absorption at a wavelength of 423 nm on the UV irradiation time of PhCh (PhCh – phosphatidylcholine (control); PhCh-UV – UV-irradiated phosphatidylcholine; Mb – myoglobin); b – formation of MDA in the course of LPO

описанной Maillard [21]. При этом наличие максимума при 423 нм в дифференциальном спектре гемопротеинов при взаимодействии с лигандами соотносят с образованием шестикоординированных производных [19].

Метилглиоксальная модификация усиливает структурную стабильность гемоглобина, но уменьшает реакции окисления, связанные с участием железа гема [22]. Глиоксаль и метилглиоксаль, как полагают, действуют как внешние лиганды, связывающиеся с внешним сайтом белка, вызывая образование шестикоординированных видов бис-гистидил-гемихрома. Бис-гистидил-аддукты, по мнению А. Ioannou и С. Varotsis [19], образуются не только у тетрамерного гемоглобина, но также и в мономерном белке, таком как миоглобин. Вероятно, что увеличение поглощения Мб при 423 нм, наблюдаемое под действием окисленных жирных кислот в наших исследованиях, также указывает на сходный механизм действия. Переход в неактивный гемихром под действием окисленных ЖК, по-видимому, снижает «токсичность» гемопротеидов по отношению к липидам и защищает, таким образом, клетку от развития цепной реакции ПОЛ.

Наши предварительные исследования показали, что при совместном облучении липидной фазы, сформированной фосфатидилхолином (ФХ) и дезоксихолатом натрия с черным и зеленым чаем, эти биологические жидкости значительно снижают степень окисления липидов за счет своего антиоксидантного потенциала и могут использоваться для определения интегрального показателя антиоксидантного потенциала биологического материала – ОАС, не зависящей от активности отдельных антиоксидантов к отдельным реакционноспособным частицам [10], по которым рассчитывают ОАА. В связи с этим представляет интерес изучение системы «УФ-облученная-ЖК-миоглобин» для определения ОАС сыворотки крови.

На рис. 5, а показаны результаты спектральных изменений Мб под действием ОК до и после УФ-облучения в отсутствие и в присутствии сыворотки крови здорового донора, больного острым панкреатитом и больного с панкреонекрозом.

Хорошо видно (рис. 5, а), что образование гемихрома под действием УФ-облученной ОК подавляется в присутствии сыворотки крови человека, причем степень этого подавления находится в обратной зависимости от тяжести заболевания поджелудочной железы.

Чтобы сравнить между собой различные биологические жидкости (сыворотка крови и другие биологические жидкости, природные и синтетические антиоксидантные агенты, вина, соки,

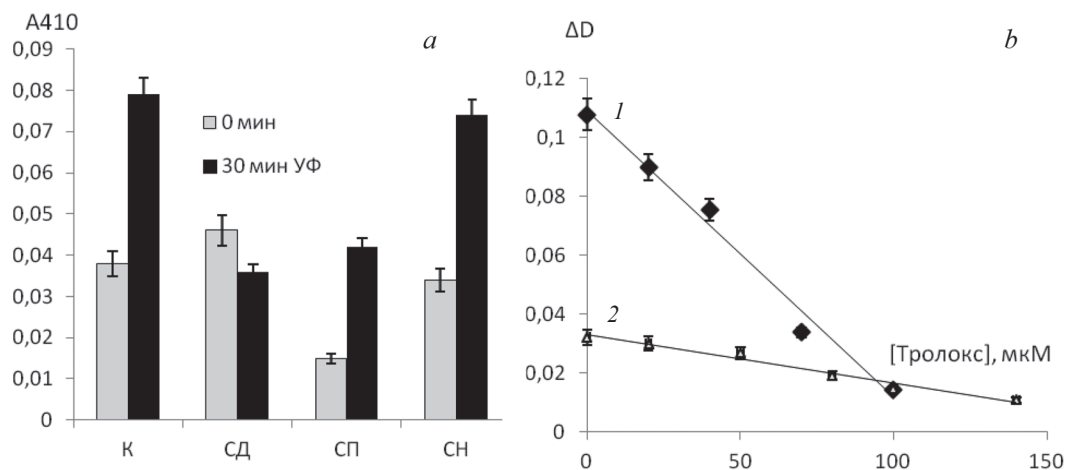


Рис. 5. Протекторное действие сыворотки крови (а) и стандартного антиоксиданта Тролокса (b) по отношению к эффекту УФ-облучения олеиновой кислоты, определяемое с участием гемопротеинов: а – изменения поглощения Mb при A410 под действием ОК до УФ-облучения (серые столбики) и после (черные столбики) УФ-облучения: К – не содержащей сыворотки крови человека, а также в присутствии сыворотки крови здорового донора (СД), больных острым панкреатитом (СП) и панкреонекрозом (СН) (3 мкл сыворотки добавляли к 200 мкл спиртового раствора ОК и облучали под УФ в течение 30 мин, после чего к 5 мкМ Mb в 0,05 М Трис-НСl-буферном растворе, рН 8,0 добавляли ок-ОК из расчета 25 нмоль ОК/мл Mb); b – калибровочные кривые, построенные с использованием стандарта Тролокса в системе Mb-ОК (кривая 1) и Hb-ОК (кривая 2). 0,05 М Трис-НСl-буферный раствор, рН 8,0, 100 нмоль ОК/мл гемопротеина

Fig. 5. Protective action of blood serum (a) and standard antioxidant Trolox (b) with respect to the effect of oleic acid UV irradiation defined with the participation of hemoproteins: a – changes in Mb absorption at A410 when acted upon by OA before UV irradiation (gray columns) and after UV irradiation (black columns): K – non-containing human blood serum of a healthy donor (СД), acute pancreatitis patient (СП) and pancreotonecrosis patient (СН) (3 μl serum added to 200 μl OA alcohol solution and UV-irradiated during 30 min, after then 5 μM Mb in 0.05 M Tris-HCl-buffer, pH 8.0 was added with ок-OA in terms of 25 nmole OA/ml Mb); b – calibration curved plotted using standard Trolox in the Mb-OA system (curve 1) and the Hb-OA system (curve 2). 0.05 M Tris-HCl-buffer solution, pH 8.0, 100 nmole OA/ml hemoprotein

продукты и пр.), широко применяется стандарт Тролокс – 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксикислота – водорастворимый аналог витамина Е, что позволяет выражать их общую антиоксидантную активность в виде эквивалентной концентрации этого ингибитор-калибратора.

На рис. 5, b представлена калибровочная кривая, отражающая зависимость от концентрации Тролокса ΔD дифференциальных спектров Mb (кривая 1) и Hb (кривая 2) в присутствии Ок-ОК, что позволяет выражать ОАС сыворотки крови в виде эквивалентной концентрации ингибитор-калибратора Тролокса. Приведенные на рис. 5, b данные показывают, что спектральные свойства Mb как индикатора степени окисления ЖК намного превышают таковые у Hb.

Заключение. До настоящего времени первичные продукты ПОЛ, в частности пул окисленных форм жирных кислот, полученный при действии УФ-облучения в диапазоне 180–320 нм, не использовались совместно с миоглобином в качестве маркера степени перекисного окисления липидной фазы и общей антиоксидантной способности биологических жидкостей.

В данном исследовании показано, что увеличение интенсивности между максимумом и минимумом (ΔD) дифференциального спектра Mb под действием пула Ок-ЖК пропорционально количеству непредельных связей в молекулах ЖК, т. е. степени их окисления. При этом Ок-ЖК вызывают разнонаправленные изменения спектра Mb: в области максимума (423 нм) – увеличение, в области минимума (405 нм) – снижение. Сходный профиль изменений в интенсивности A_{423} Mb под влиянием Ок-ЖК и действием на этот гемопроtein УФ-облученного фосфатидилхолина указывает на важную роль ЖК в механизме действия окисленных фосфолипидов на спектральные свойства этого гемопротеина.

Сыворотка крови человека, так же как и стандартный антиоксидант Тролокс, уменьшает наблюдаемое увеличение под действием Ок-ЖК амплитуды спектральных изменений Mb, что свидетельствует о реальной возможности использования супрамолекулярного комплекса «Ок-ЖК–Mb» для оценки антиоксидантного потенциала биологических жидкостей с использованием стандартного ингибитора-калибратора Тролокса.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности применения модельных систем предложенного типа как для изучения конкретных реакций свободнорадикального окисления (СРО) ЖК, так и для определения ОАС в крови и других биологических жидкостях *in vitro*: (источник СРО – УФ-облучение) → (ок-ФХ – первичная мишень АФК) → (супрамолекулярный комплекс Ок-ЖК–гемопротеины как индикатор ПОЛ с учетом первичных процессов).

Список использованных источников

1. Thomas, C. E. Oxygen Radicals and the Disease Process / C. E. Thomas, B. Kalyanaraman. – Harwood Academic Publishers, 1998. – 296 p.
2. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. 4th ed. – New York: Oxford University Press, 2007. – 851 p.
3. Pisoschi, A. M. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review / A. M. Pisoschi, A. Pop // *Europ. J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 97. – P. 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
4. Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимиров [и др.]. – Москва, 1991. – Т. 29. – 249 с.
5. Определение антиоксидантной активности плазмы крови в экспериментальных и клинических исследованиях / И. В. Бабенкова [и др.] // *Евразийский Союз Ученых № 13. Сер. Биол. науки.* – 2015. – № 4. – С. 7–16.
6. Литвинко, Н. М. Фосфолипаза A₂ IB – новый индикатор для оценки про-антиоксидантного статуса организма / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2017. – Т. 61, № 4. – С. 60–68.
7. Litvinko, N. M. The interaction of phospholipase A₂ with oxidized phospholipids at the lipid-water surface with different structural organization / N. M. Litvinko, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky // *Chemistry and Physics of Lipids.* – 2017. – Vol. 211. – P. 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.10.010>
8. Литвинко, Н. М. Взаимодействие фосфолипазы A₂ с фосфатидилхолином в условиях УФ-облучения / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский // *Тр. XIX Менделеевского съезда.* – Волгоград, 2011. – Т. 1. – С. 268.
9. Rice-Evans, C. Total antioxidant status in plasma and body fluids / C. Rice-Evans, N. Miller // *Meth. Enzymol.* – 1994. – Vol. 234, N 2. – P. 279–293. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34095-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34095-1)
10. Система «окисленные фосфолипиды–гемоглобин» как мера протекторного действия природных антиоксидантов против окислительного стресса / Л. А. Скоростецкая [и др.] // *Свободные радикалы в химии и жизни.* – Минск, 2017. – С. 124–126.
11. Baron, C. P. Peroxidation of linoleate at physiological pH: hemichrome formation by substrate binding protect against metmyoglobin activation by hydrogen peroxide / C. P. Baron, L. H. Skibsted, H. J. Andersen // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2000. – Vol. 28, N 4. – P. 549–558. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00240-3)
12. A simplified procedure for semitargeted lipidomic analysis of oxidized phosphatidylcholines induced by UVA irradiation / F. Gruber [et al.] // *J. Lipid. Res.* – 2012. – Vol. 53, N 6. – P. 1232–1242. <https://doi.org/10.1194/jlr.D025270>
13. Метелица, Д. И. Иницирование и ингибирование радикальных процессов в биохимических пероксидных системах (обзор) / Д. И. Метелица, Е. И. Карасева // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 537–564.
14. Хромопротеины: структура, свойства и функции. Обмен гемоглобина и его нарушения / Е. В. Александрова [и др.]. – Запорожье, 2015. – 75 с.
15. Андреюк, Г. М. Образование гемихрома при взаимодействии с полярными производными фосфатидилхолина / Г. М. Андреюк, М. А. Кисель // *Биоорг. химия.* – 1997. – Т. 23, № 4. – С. 290–293.
16. Peptide Inhibitor of Complement C1 (PIC1) demonstrates antioxidant activity via single electron transport (SET) and hydrogen atom transfer (HAT) / M. G. Rivera [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13, N 3. – e0193931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193931>
17. Antioxidant activity of flavonoids evaluated with myoglobin method / M. Terashima [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2012. – Vol. 31, N 2. – P. 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1163-2>
18. Koch, J. Membrane-bound globin X protects the cell from reactive oxygen species / J. Koch, T. Burmester // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – Vol. 469, N 2. – P. 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.105>
19. Ioannou, A. Modifications of hemoglobin and myoglobin by Maillard reaction products (MRPs) / A. Ioannou, C. Vartotsis // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, N 11. – e0188095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188095>
20. Banerjee, S. Structural alterations of hemoglobin and myoglobin by glyoxal: a comparative study / S. Banerjee, A. S. Chakraborti // *Int. J. Biol. Macromolec.* – 2014. – Vol. 66. – P. 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.034>

21. Banerjee, S. Methylglyoxal modification enhances the stability of hemoglobin and lowers its iron-mediated oxidation reactions: An *in vitro* study / S. Banerjee, A. S. Chakraborti // *Int. J. Biol. Macromolec.* – 2017. – Vol. 95. – P. 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.006>

22. Иницирование и ингибирование радикальных процессов в системах H₂O₂-метмиоглобин/метгемоглобин / Д. И. Метелица [и др.] // *Биохимия.* – 2001. – Т. 66, № 5. – С. 628–639.

References

1. Thomas C. E., Kalyanaraman B. *Oxygen Radicals and the Disease Process*. Harwood Academic Publ., 1998. 296 p.
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York, Oxford University Press, 2007. 851 p.
3. Pisoschi A. M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, vol. 97, pp. 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
4. Vladimirov Yu. A., Azizova O. A., Deev A. I., Kozlov A. V., Osipov A. N., Poshchupkin D. I. *Free radicals in living systems*. Moscow, 1991, vol. 29. 249 p. (in Russian).
5. Babenkova I. V., Buravlev E. A., Buravleva K. V., Teselkin Yu. O. Definition of the antioxidant activity of blood plasma in experimental and clinic investigations. *Evrasiiskii Soyuz Uchenykh N 13. Seriya Biologicheskie nauki = Eurasian Union of Scientists No. 13. Series: Biological Sciences*, 2015, no. 4, pp. 7–16 (in Russian).
6. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. Phospholipase A₂ IB – a new indicator for estimations of the pro-antioxidant status of the organism. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 4, pp. 60–68 (in Russian).
7. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. The interaction of phospholipase A₂ with oxidized phospholipids at the lipid-water surface with different structural organization. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2018, vol. 211, pp. 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.10.010>
8. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. Interaction of phospholipase A₂ with phosphatidylcholine in the UV irradiation conditions. *Trudy XIX Mendeleevskogo s'ezda = Proceedings of XIX Mendeleev Congress*. Volgograd, 2011, vol. 1, pp. 268 (in Russian).
9. Rice-Evans C., Miller N. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 1994, vol. 234, no. 2, pp. 279–293. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34095-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34095-1)
10. Skorostetskaya L. A., Pavluchenko N. I., Ermakovich Yu. Sh., Konopelko S. P., Litvinko N. M. Oxidized phospholipid–hemoglobin system as a measure of the protective action of natural oxidants vs. oxidative stress. *Svobodnye radikaly v khimii i zhizni = Free Radicals in Chemistry and Life*, Minsk, 2017, pp. 124–126 (in Russian).
11. Baron C. P., Skibsted L. H., Andersen H. J. Peroxidation of linoleate at physiological pH: hemichrome formation by substrate binding protect against metmyoglobin activation by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, vol. 28, no. 4, pp. 549–558. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00240-3)
12. Gruber F., Bicker W., Oskolkova O. V., Tschachler E., Bochkov V. N. A simplified procedure for semitargeted lipidomic analysis of oxidized phosphatidylcholines induced by UVA irradiation. *Journal of Lipid Research*, 2012, vol. 53, no. 6, pp. 1232–1242. <https://doi.org/10.1194/jlr.d025270>
13. Metelitz D. I., Karasyova E. I. Initiation and inhibition of free-radical processes in biochemical peroxide systems: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, vol. 43, no. 5, pp. 481–505. <https://doi.org/10.1134/s000368380705002x>
14. Aleksandrova E. V., Belenkii S. A., Shvets V. N., Krisanova N. V., Makoed O. B., Shkoda A. S. *Chromoproteins: structure, properties and functions. Exchange of hemoglobin and its disturbances*. Zaporozh'ye, 2015. 75 p. (in Russian).
15. Andreyuk G. M., Kisel' M. A. The formation of hemichrome upon interaction of hemoglobin with polar phosphatidylcholine derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1997, vol. 23, no. 4, pp. 268–271 (in Russian).
16. Rivera M. G., Hair P. S., Cunnion K. M., Krishna N. K. Peptide Inhibitor of Complement C1 (PIC1) demonstrates antioxidant activity via single electron transport (SET) and hydrogen atom transfer (HAT). *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 3, e0193931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193931>
17. Terashima M., Kakuno Y., Kitano N., Matsuoka C., Murase M., Togo N., Watanabe R., Matsumura S. Antioxidant activity of flavonoids evaluated with myoglobin method. *Plant Cell Reports*, 2012, vol. 31, no. 2, pp. 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1163-2>
18. Koch J., Burmester T. Membrane-bound globin X protects the cell from reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, vol. 469, no. 2, pp. 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.105>
19. Ioannou A., Varotsis C. Modifications of hemoglobin and myoglobin by Maillard reaction products (MRPs), *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 11, e0188095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188095>
20. Banerjee S., Chakraborti A. S. Structural alterations of hemoglobin and myoglobin by glyoxal: a comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, vol. 66, pp. 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.034>
21. Banerjee S., Chakraborti A. S. Methylglyoxal modification enhances the stability of hemoglobin and lowers its iron-mediated oxidation reactions: An *in vitro* study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, vol. 95, pp. 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.006>
22. Metelitz D. I., Eryomin A. N., Sviridov D. O., Kamysnikov V. S. Initiation and Inhibition of Free Radical Processes in H₂O₂ – Metmyoglobin (Methemoglobin)-2,2"-Azino-bis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) Systems. *Biochemistry*, 2001, vol. 66, no. 5, pp. 505–514. <https://doi.org/10.1023/a:1010202717442>

Информация об авторах

Литвинко Наталья Михайловна – д-р хим наук, доцент, заведующая лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al_h@mail.ru.

Скоростецкая Лидия Адамовна – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lydiask@gmail.com.

Герловский Денис Олегович – канд. хим. наук, науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: denis2904-83@mail.ru.

Ермакович Юлия Ширалиевна – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ha-gal@mail.ru.

Евдокимова Гражина Станиславовна – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: grazhinaiv@mail.ru.

Information about the authors

Litvinko Natalia Mikhailovna – D. Sc. (Chemistry), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al_h@mail.ru.

Skorostetskaya Lydia Adamovna – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lydiask@gmail.com.

Gerlovsky Denis Olegovich – Ph. D. (Chemistry), Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: denis2904-83@mail.ru.

Ermakovich Yulia Shiraliyevna – Junior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ha-gal@mail.ru.

Evdokimova Grazhina Stanislavovna – Junior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grazhinaiv@mail.ru.