

## ПОРІВНЯННЯ МОДИФІКУЮЧОЇ ДІЇ БІОАКТИВНИХ АЛЬДЕГІДІВ НА АЛЬБУМІН ЛЮДИНИ

І. П. КРИСЮК, А. Я. КНАУБ, С. Г. ШАНДРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: iryna-kr@yandex.ua

Постсинтетичні модифікації протеїнів є причиною та наслідком багатьох захворювань, а альдегіди – одні з основних чинників утворення цих модифікацій. У дослідях *in vitro* проведено порівняльне дослідження модифікуючої дії на альбумін людини ендогенних альдегідів. Розчин альбуміну людини (20 мМ) інкубували з альдегідами: рибозою, гліоксалем, метилгліоксалем і формальдегідом (20 мМ кожний) та за їх комбінування в 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 0,02% азиду натрію, при 37 °С у темряві протягом 30 діб. Визначали флуоресцентні властивості аддуктів, вміст протеїнових карбонільних груп, перерозподіл молекулярної маси протеїну.

Одержано такі рейтинги альдегідів від найнижчої до найбільшої здатності: формувати на альбуміні флуоресцентні аддукти – формальдегід, метилгліоксаль, рибоза, гліоксаль; карбонілювати протеїни – рибоза, формальдегід, гліоксаль, метилгліоксаль; утворювати міжмолекулярні зв'язки – рибоза, метилгліоксаль, гліоксаль, формальдегід. Встановлено, що альдегіди різняться спрямуванням утворення протеїнових модифікацій. Так, наприклад, формальдегід, маючи найнижчу здатність формувати флуоресцентні аддукти, виявляє найвищу здатність утворювати міжмолекулярні протеїнові зв'язки. Тому залежно від особливостей перебігу в організмі карбонільного стресу необхідно коректно вибрати значущі показники постсинтетичних модифікацій.

**Ключові слова:** альбумін, альдегіди, флуоресценція, протеїнові зшивки, модифікація протеїнів.

У процесі метаболізму в організмі утворюються альдегіди, які залежно від концентрації можуть відігравати регуляторну роль [1] або виявляти токсичні властивості [2]. До них відносять моносахариди: альдози (полігідроксіальдегіди), кетози (поліоксикетони), а також  $\alpha$ -оксоальдегіди (гліоксаль, метилгліоксаль, 3-дезоксиглюкозон) та ін. [3]. Ці карбонільні сполуки мають редуруючі властивості та здатні неензиматично реагувати з SH- та NH<sub>2</sub>-групами протеїнів, ліпідів і нуклеїнових кислот [4], завдяки чому запускається низка так званих реакцій Майяра або глікування [5]. Так, альдози утворюють із вільними амінокислотами протеїнів нестійкі шиффові основи, які за певний час зазнають відповідного перетворення у стабільніші кетоаміни (продукти Аматорі, прикладом яких є карбоксиметил/карбоксіетиллізин та карбоксиметил/карбоксіетилцистеїн) [6]. Внаслідок реакцій дегідратації та конденсації на протеїнах утворюються відповідні аддукти, дикарбонільні інтермедіати, та внутрішньо- і міжмолекулярні

зшивки [7, 8]. Незворотні стабільні кон'югати, що утворюються при цьому (наприклад, пентозидин та імідазольні похідні), отримали назву кінцевих продуктів глікування (advanced glycation end product, AGEs) [9]. Вони можуть бути визначені як група гетерогенних комплексів альдегідів із протеїнами, що утворюються внаслідок реакцій дегідратації, конденсації, фрагментації, оксидації та циклізації. Для них характерна «блакитна» флуоресценція [10]. Утворення AGEs значно посилюється за діабету та інших порушень обміну, що супроводжуються глюкозурією та гіперпродукцією редуруючих моносахаридів [11].

За оксидативного стресу (гіперпродукції активних форм кисню (АФК)): O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>, RO<sub>2</sub><sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, ONOO<sup>•</sup>, ін.) через поліольний шлях пероксидації жирних кислот також утворюються численні альдегіди: насичені (етаналь, пропаналь, гексаналь), ненасичені (акролеїн, 4-гідрокси-2-ноненаль та 4-гідрокси-2-гексеналь), а також дикарбонілі (гліоксаль, метилгліоксаль, малоновий діальдегід та

діацетил) [12]. Останні легко утворюють зшивки в протеїнах і тому особливо небезпечні. Ці альдегіди в організмі також здатні неензиматично взаємодіяти із протеїнами, утворюючи незворотно модифіковані кінцеві продукти ліпоксигенації (advanced lipoxidation end-products, ALGs) [13]. Утворення AGEs і ALGs під впливом зазначених реактивних альдегідів або так званих реактивних карбонільних сполук (reactive carbonyl compounds, RCCs), в свою чергу, супроводжується інтенсивною генерацією АФК, що призводить до самоприскорення цього процесу [14]. AGEs і ALGs прямо або через специфічні рецептори впливають на сигнальну трансдукцію, змінюють структуру і функції протеїнів, як рецепторних, так і позаклітинного матриксу, ензимів метаболічних перетворень і антиоксидантного захисту, спричиняють запалення і апоптоз. Крім того, ці сполуки відіграють провідну роль під час старіння організму і в патогенезі таких хронічних захворювань, як діабет, атеросклероз, остеоартрози, нефропатії, септичні стани, колагенози, гепатити, катаракта, онкозахворювання, кардіоваскулярні, легеневі, нейродегенеративні хвороби (Альцгеймера, Паркінсона тощо) [15–17].

Ендогенні альдегіди мають різні протеїномодифікуючі властивості. Вони можуть конкурувати між собою за вплив на ензими, рецептори, структурні протеїни, нуклеїнові кислоти та інші об'єкти-мішені, демонструючи підсилення або зменшення ефекту їх комбінованої дії.

Метою роботи було порівняти модифікуючі властивості альдегідів, які утворюються в організмі: формальдегіду, рибози, гліоксалу, метилгліоксалу, за їх дії на альбумін людини в умовах *in vitro* за наступними показниками: утворення флуоресцентних аддуктів та протеїнових карбонільних груп, зміна електрофоретичного розподілу протеїну за рахунок формування міжмолекулярних зшивок.

### Матеріали і методи

У роботі використовували комерційний препарат альбуміну сироватки людини (Reanal, Угорщина). Також було використано такі реактиви: D-рибоза (AppliChem, США); гліоксаль, метилгліоксаль (Альфарус, Україна); формальдегід,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaN}_3$ , KCl (ХімМед, Україна).

Розчин альбуміну сироватки людини (АСЛ, 20 мМ) інкубували з альдегідами: рибозою, гліоксалем, метилгліоксалем та формальдегідом (20 мМ кожний) та за їх комбінування, в 0,1 М Na-фосфатному буфері (pH 7,4), що містив 0,02% азиду натрію, при 37 °С в темряві протягом 30 діб. У контрольні проби брали усі складові, але без альбуміну.

Спектри флуоресценції зразків визначали на спектрофлуориметрі Quanta Master-40 (Канада), інтенсивність емісії флуоресценції при  $\lambda_{36} = 360$  нм та  $\lambda_{em} = 420$  нм на флуориметрі FL-800 (Biotek, США) [10]. Вміст протеїнових карбонільних груп визначали методом [18] у спектрофотометричній модифікації [19]. Ступінь накопичення зшивок у структурі протеїну досліджували за зміною молекулярної маси методом електрофорезу в ПААГ [20], розподіл показників абсорбції в гелі оцінювали, використовуючи програму Densital [21].

Статистичну обробку результатів проводили в програмі Excel 2007, вірогідність змін перевіряли методами варіаційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента.

### Результати та обговорення

Флуоресценцію біологічних зразків ( $\lambda_{36}$  300–420/ $\lambda_{em}$  420–600 нм) використовують як прогностичний маркер рівня AGEs-модифікованих протеїнів [22]. У цьому дослідженні *in vitro* під час взаємодії альдегідів з альбуміном відбувається модифікація останнього, що істотно змінює його флуоресцентні властивості. Відбувається посилення інтенсивності «блакитної» флуоресценції ( $\lambda_{36}$  360/ $\lambda_{em}$  420 нм), що є свідченням стимульованого альдегідами утворення протеїнових аддуктів.

Аналіз наведених на рис. 1, А спектрів збудження флуоресценції за дії альдегідів вказує на відмінність у хімічній структурі утворених аддуктів, про що свідчать різні спектральні характеристики флуоресценції: максимум довжини хвилі та форма спектрів, наприклад, напівширина, наявність тонкої структури. Так на 5-ту добу інкубації  $\lambda_{36 \max}$  становила для АСЛ – 280 нм, за додавання альдегідів: формальдегіду – 340 нм, рибози – 360 нм, гліоксалу – 380 нм, метилгліоксалу – 390 нм. На 5-ту добу інкубації  $\lambda_{36 \max}$  у суміші альдегідів змінюється відповідно: рибоза, гліоксаль та формальдегід – 340 нм; рибоза та формальдегід,

а також гліоксаль та формальдегід – 350 нм; рибоза та метилгліоксаль – 360 нм; метилгліоксаль, формальдегід та рибоза – 370 нм; метилгліоксаль та формальдегід – 380 нм; рибоза та гліоксаль – 390 нм. Реалізація «тонкої структури» спектра флуоресценції особливо помітна за дії метилгліоксалу. На правому схилі відповідного спектра збудження чітко вирізняються два додаткових піки на 390 та 415 нм. Напівширина піку збудження теж різниться для відповідних альдегідів (АСЛ – 20 нм); за дії гліоксалу – 45 нм, рибози – 55 нм, формальдегіду – 65 нм, метилгліоксалу – 73 нм. У суміші рибози та формальдегіду параметр зменшується до 45 нм, але у разі додавання до неї метилгліоксалу становить 75 нм. Ці зміни свідчать про те, що під час комбінування різних альдегідів, можливо, утворюються нові за хімічною будовою аддукти, які відрізняються від таких, що формуються за впливу кожного з ефекторів окремо.

На рис. 1, Б наведено спектри збудження флуоресценції ( $\lambda_{em} = 460$  нм) зразків АСЛ під час інкубації з формальдегідом протягом 5, 10 та 15 діб. Як видно, з часом відбувається перерозподіл спектральної густини між максимумом збудження альбуміну (280 нм) та формальдегідіндукованого аддукту (340 нм).

Для оцінки характеру комбінованої модифікуючої дії альдегідів інтенсивність флуоресценції альбуміну із сумішшю альдегідів

порівняли з математичною сумою цього показника за окремої дії цих альдегідів. Результати наведено в таблиці. У більшості представлених результатів інтенсивність флуоресценції альбуміну за комбінування альдегідів є вищою за розраховану суму, що свідчить про посилення постсинтетичних протеїнових модифікацій з утворенням флуоресцентних аддуктів за одночасного посилення утворення різних альдегідів. Лише у разі дії рибози з метилгліоксалем, а також рибози із гліоксалем, результати виявилися нижчими, ніж очікувалося. Так, у разі дії рибози із гліоксалем інтенсивність флуоресценції знижується у 6 разів, що, можливо, пов'язано з посиленням утворення аддуктів, що не мають флуоресцентних властивостей. Відомо, що альдегідстимульовані модифікації протеїнів залежно від їх хімічної будови або мають флуоресцентні властивості, або є нефлуоресцентними. Приклади модифікацій наведено на рис. 2. Такі аддукти як пентозидин, крослін, піропіридин, гліоксальлізиндимер, метилгліоксальлізиндимер мають «блакитну» флуоресценцію на відміну від карбоксиметил-, карбоксиетиллізину, піроліну, імідазолонів. Тому можна припустити, що зменшення інтенсивності флуоресценції утворених аддуктів неоднозначно свідчить про зниження їх вмісту. Для більш коректної оцінки модифікуючої активності альдегідів потрібно використовувати

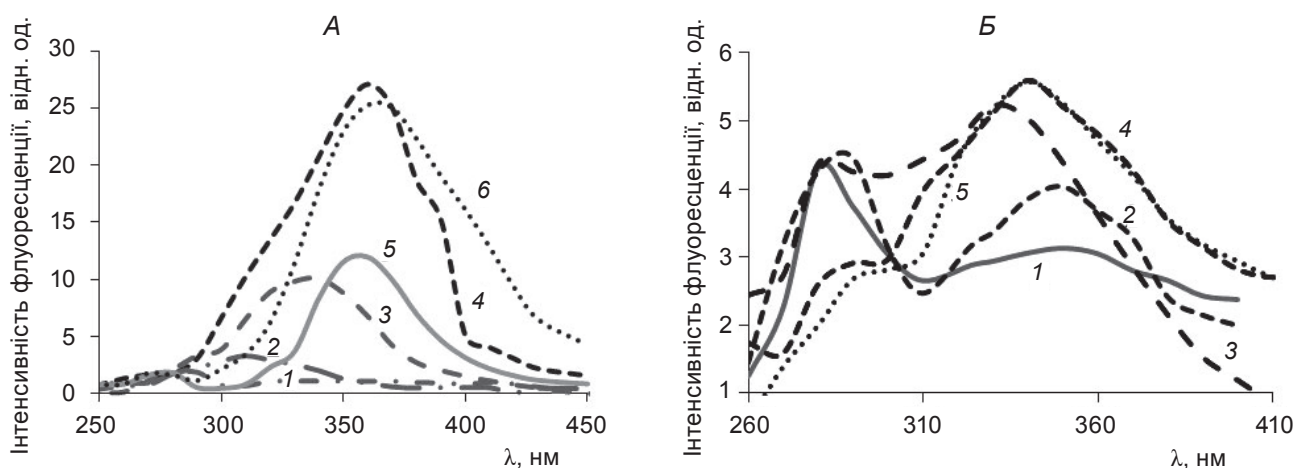


Рис. 1. А – Спектри збудження флуоресценції зразків альбуміну сироватки людини (АСЛ) через 5 діб інкубації без світла при 37 °С, рН 7,4: 1 – без альдегідів; з альдегідами: 2 – формальдегід, 3 – рибоза, 4 – метилгліоксаль, 5 – рибоза та формальдегід, 6 – рибоза, метилгліоксаль та формальдегід; Б – Спектри збудження флуоресценції зразків АСЛ за інкубації без/з формальдегідом: 1 – АСЛ, 2 – АСЛ із формальдегідом без інкубації, 3 – АСЛ із формальдегідом після інкубації 5 діб, 4 – інкубація 10 діб, 5 – інкубація 15 діб

Інтенсивність флуоресценції зразків альбуміну сироватки людини ( $\lambda_{\text{зб}} = 360 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{ем}} = 420 \text{ нм}$ , відн. од.) за окремої інкубації альдегідів і за їх комбінування ( $n = 3$ )

Альдегіди	Інтенсивність флуоресценції, відн. од.					
	Розрахована сума за дії окремих альдегідів			За дії суміші альдегідів		
	10 діб	20 діб	30 діб	10 діб	20 діб	30 діб
Метилглюксаль та рибоза	586 ± 14	584 ± 4	569 ± 16	386 ± 3*	412 ± 17*	348 ± 16*
Формальдегід та рибоза	344 ± 19	459 ± 8	525 ± 11	491 ± 23*	591 ± 10*	622 ± 5*
Формальдегід, рибоза та метилглюксаль	622 ± 25	632 ± 2	630 ± 9	765 ± 8*	769 ± 23*	719 ± 14*
Формальдегід та метилглюксаль	315 ± 19	220 ± 8	167 ± 14	585 ± 40*	530 ± 43*	430 ± 23*
Глюксаль та рибоза	706 ± 23	925,0 ± 6,3	972 ± 3	142 ± 14*	156 ± 6*	157 ± 8*
Глюксаль та формальдегід	435 ± 34	562 ± 13	570 ± 5	690 ± 9*	764 ± 25*	742 ± 27*
Глюксаль, рибоза та формальдегід	746 ± 33	973 ± 9	1034 ± 7	685 ± 24*	719 ± 24*	592 ± 41*

\*  $P < 0,05$  відносно розрахованої суми

додаткові методи оцінки інтенсивності постсинтетичних модифікацій протеїнів.

Вважається, що карбонільні групи протеїнів утворюються внаслідок їх окислювальної модифікації, наприклад, за дії гідроксильних радикалів [23]. Однак експериментально до-

ведено можливість формування протеїнових СО-груп неоксидативним шляхом під впливом альдегідів в умовах *in vitro* [24, 25]. Згідно з результатами нашої роботи в процесі модифікації АСЛІ альдегідами в ізольованому модельному середовищі відбувається утворення протеїнових

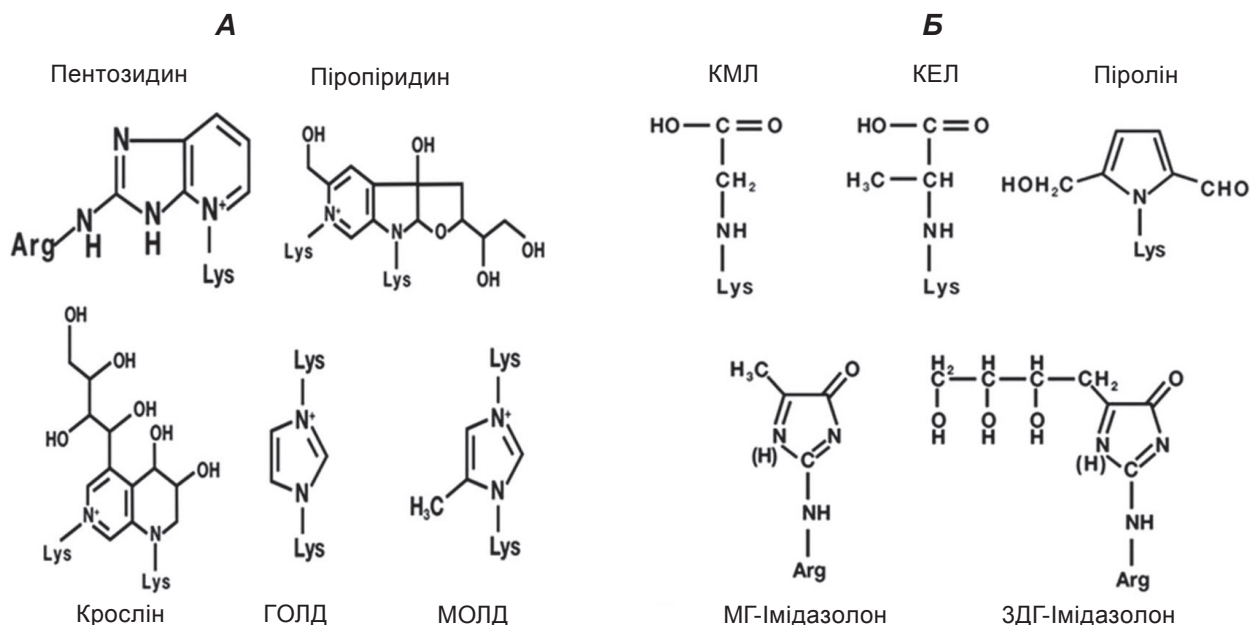


Рис. 2. Протеїнові аддукти глікування, що мають флуоресцентні властивості (А) та є нефлуоресцентними (Б) [22, 4]: ГОЛД – глюксальлізиндимер; МОЛД – метилглюксальлізиндимер; КМЛ – карбоксиметиллізин; КЕЛ – карбоксіетиллізин; МГ-імідазолон – метилглюксаль-імідазолон; ЗДГ-імідазолон – 3 дезоксиглюкозон-імідазолон

карбонільних груп. Збільшення їх вмісту в розчині АСЛ через один місяць інкубації з альдегідами становить: рибоза –  $2,9 \pm 0,2$  нмоль/мг протеїну; формальдегід –  $4,2 \pm 0,4$  нмоль/мг; гліюксаль –  $6,4 \pm 0,8$  нмоль/мг, метилгліюксаль –  $10,4 \pm 0,7$  нмоль/мг. Одержані дані вказують на те, що у разі комбінованої дії альдегідів із додаванням формальдегіду відбувається істотне зниження інтенсивності цього процесу, наприклад, за дії рибоза + формальдегід –  $1,9 \pm 0,2$  нмоль/мг (в 1,5 раза менше, ніж за дії тільки рибози), метилгліюксаль + формальдегід –  $4,8 \pm 0,7$  нмоль/мг (в 2,5 раза менше, ніж за дії метилгліюксалу), метилгліюксаль + рибоза + формальдегід –  $2,47 \pm 0,3$  нмоль/мг. Для порівняння на рис. 3 наведено середні значення інтенсивності флуоресценції альдегід-протеїнових аддуктів та вміст СО-протеїнових груп за модифікуючої дії різних альдегідів та їх сумішей на АСЛ після одного місяця інкубації. Якщо додавання формальдегіду до інших альдегідів (за комбінованої дії) призводить до збільшення інтенсивності флуоресценції, то вміст протеїнових СО-груп характеризується істотним зниженням. Тільки у разі спільної дії формальдегіду з гліюксалем не реєструється послаблення цього процесу. Зміни флуоресцентних

властивостей пояснюються можливим утворенням нефлуоресцентних аддуктів. Але результати відносно карбонілювання альбуміну явно свідчать про наявність певної конкуренції між окремими альдегідами. Також можливо, що у разі додаткової дії формальдегіду прискорюються процеси подальшої модифікації карбонільних груп протеїну з утворенням міжмолекулярних зшивок. Аналогічно до механізму структурування колагенових фібрил можуть утворюватися протеїн-протеїнові зшивки через альдольну конденсацію між СО-групами протеїнів та виникнення шиффових основ за реакції СО- та аміногруп (рис. 4).

Таким чином, формальдегід за комбінованої дії з іншими альдегідами інтенсифікує утворення флуоресцентних аддуктів, але в той самий час істотно зменшує кінцевий вміст альдегідстимульованих протеїнових СО-груп.

За інтенсивністю флуоресценції утворених аддуктів альбуміну з альдегідами за місяць інкубації останні можна представити таким чином: формальдегід (збільшення в 1,7 раза відносно ЛСА), метилгліюксаль (у 3 рази), рибоза (у 8 разів); гліюксаль (у 8,5 раза).

Швидкість та спрямованість зміни характеристик флуоресценції альбуміну за дії різних

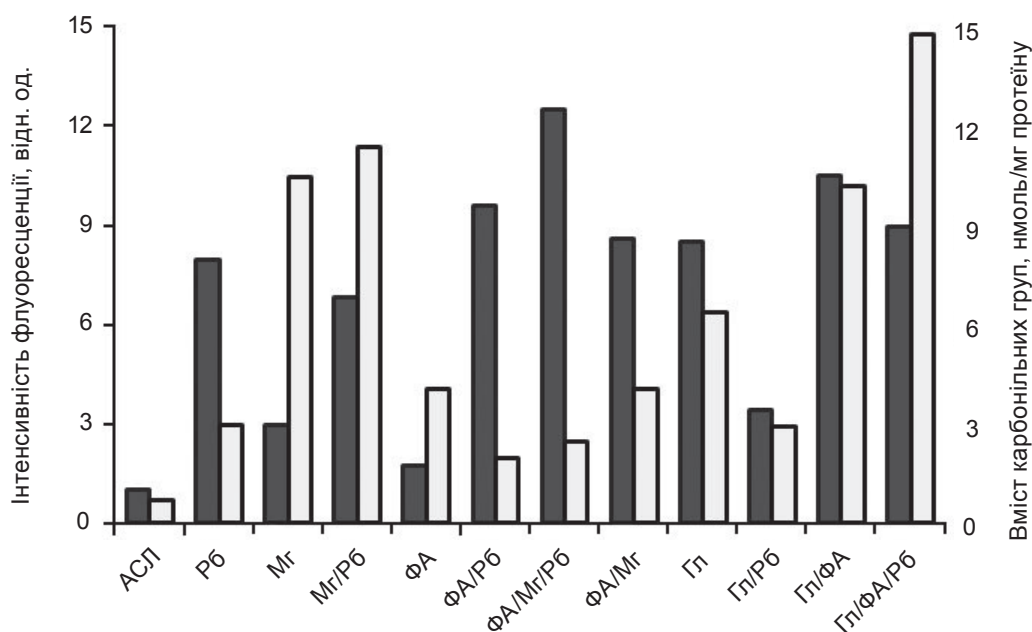


Рис. 3. Середні значення інтенсивності флуоресценції ( $\lambda_{\text{зб}} = 360$  нм,  $\lambda_{\text{ем}} = 420$  нм) (■) та вміст карбонільних груп (□) у зразках альбуміну людини після інкубації без світла при 37 °С, з альдегідами ( $n = 3$ ) через 30 діб. Тут і на рис. 8: Рб – рибоза, Мг – метилгліюксаль, ФА – формальдегід, Гл – гліюксаль

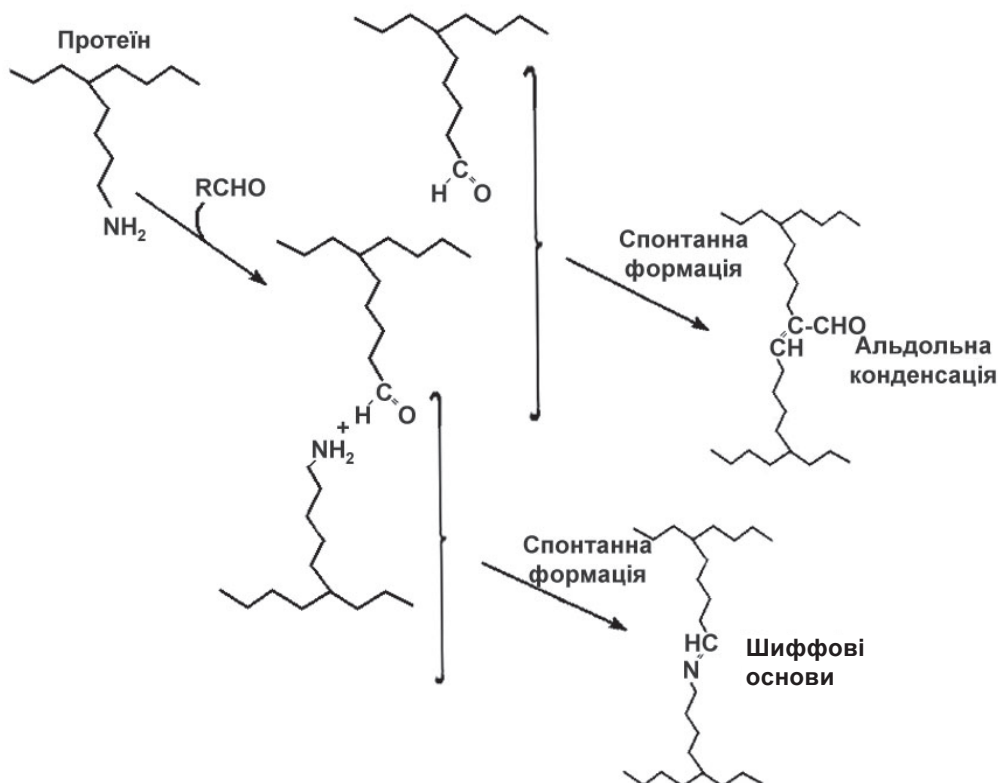


Рис. 4. Утворення протеїн–протеїнових зшивок через шиффові основи та альдольну конденсацію

альдегідів також відрізняються. Наприклад, дані, які наведено на рис. 5, А, свідчать про монотонне зростання з часом інтенсивності флуоресценції за дії рибози, як і за дії формальдегіду, гліоксалу (останні не наведено на рис.). Однак під впливом метилгліоксалу відбувається спочатку стрімке зростання цього параметра, та з 2-ї доби реєструється постійний спад, а на 30-ту добу інтенсивність флуоресценції складає всього 20% від її значення на 2-гу добу. Такий немонотонний характер змін, на нашу думку, характеризує поступову модифікацію утворених флуоресцентних аддуктів до таких, що є нефлуоресцентними. Тому виникає питання, чи дійсно використання показників «блакитної» флуоресценції повною мірою характеризує постсинтетичні модифікації протеїнів, які спричинені дією активних карбонільних сполук.

На рис. 5, Б, представлено залежність вмісту СО-груп альбуміну від часу інкубації останнього з рибозою та метилгліоксалем. З результатів видно, що ці альдегіди характеризуються різною динамікою процесу. Так, за дії рибози до п'ятої доби відбувається стрімке зростання вмісту СО-груп альбуміну, але в подальшому

цей процес гальмується. За дії метилгліоксалу, навпаки, реєструється початкове повільне зростання цього показника, яке переходить у стрімке збільшення після 20-ї доби. Темп зміни вмісту протеїнових СО-груп для рибози та метилгліоксалу становить до 5-ї доби інкубації  $1,04 \pm 0,04$  та  $0,38 \pm 0,02$  нмоль/мг за добу; після 20-ї доби  $0,031 \pm 0,002$  та  $0,82 \pm 0,06$  нмоль/мг за добу відповідно. Таким чином, досліджувані альдегіди різняться не тільки спроможністю карбонілювати протеїни, але і за динамікою цього процесу.

Одним із методів дослідження міжмолекулярних протеїнових модифікацій є електрофорез із подальшою оцінкою розподілу молекул протеїну за молекулярною масою. На рис. 6 наведено електрофореграми альбуміну після інкубації без та з альдегідами, а на рис. 7 і 8 їхні денситограми. Молекулярна маса контрольного протеїну на 88% локалізована у діапазоні 60–70 кДа, але після інкубації протягом 25 діб без альдегідів цей показник зменшився до 75%. За додавання до інкубаційного середовища альдегідів відбувається перерозподіл молекулярної маси в бік її збільшення шляхом

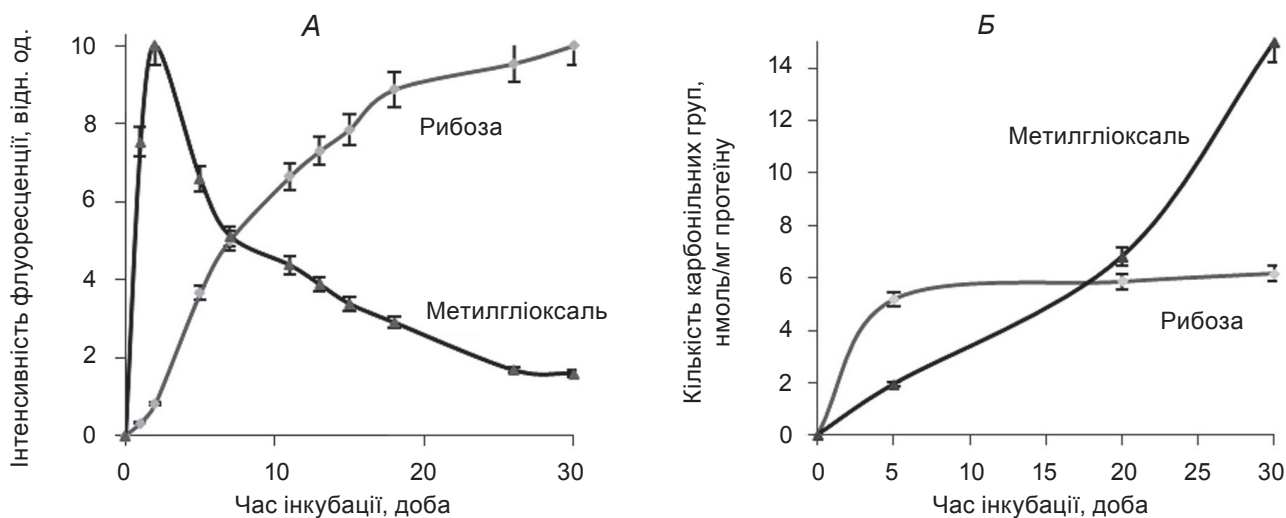
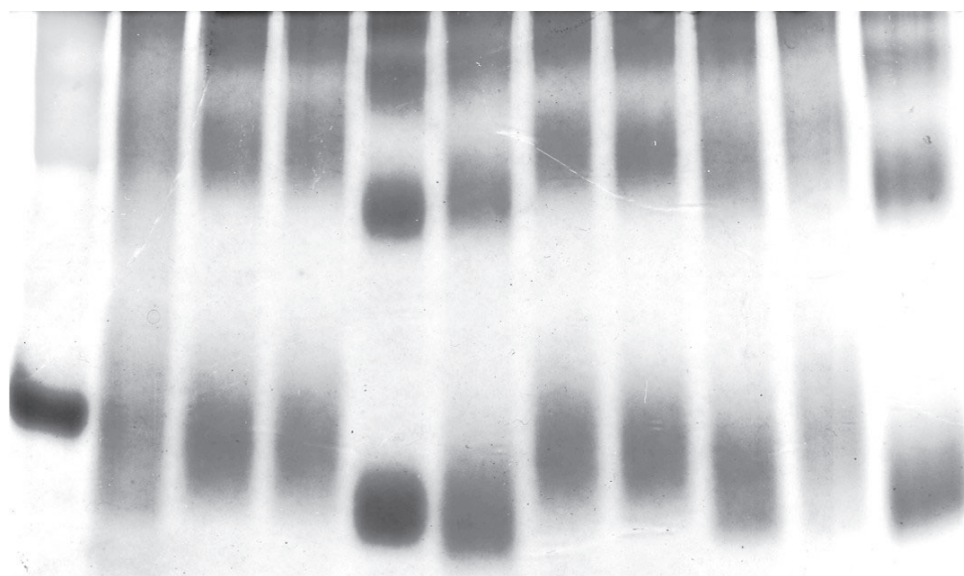


Рис. 5. Зміна в часі інтенсивності флуоресценції ( $\lambda_{360} = 360$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм) (A) та вмісту протеїнових карбонільних груп (B) у зразках альбуміну людини після інкубації без світла при 37 °С, рН 7,4 з рибозою та метилгліоксалем ( $n = 3$ )



Альбумін	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рибоза		+		+		+	+			+	
Формальдегід					+	+	+	+			+
Метилгліоксаль			+	+			+	+			
Гліоксаль									+	+	+

Рис. 6. Електрофореграма зразків альбуміну людини в ПААГ після інкубації без світла при 37 °С, рН 7,4 протягом 25 діб з альдегідами

утворення міжмолекулярних зшивок. Істотно зростає густина розподілу в діапазонах 120–210 кДа та 210–340 кДа, що свідчить про формування високомолекулярних полімерів. Наприклад, за додавання до інкубаційної суміші формальдегіду через 25 діб в «основному» діапазоні альбуміну 60–70 кДа залишило-

ся тільки 37% протеїну. Решта розподілилася наступним чином: у діапазоні 120–210 кДа – 26%; 210–340 кДа – 38%. Таким чином, дія різних альдегідів призводить до збільшення утворення «важких» полімерів (210–340 кДа) у кілька разів, наприклад: рибоза – у 1,8 раза, метилгліоксаль – у 2,6 раза, гліоксаль – у 3,7 раза,

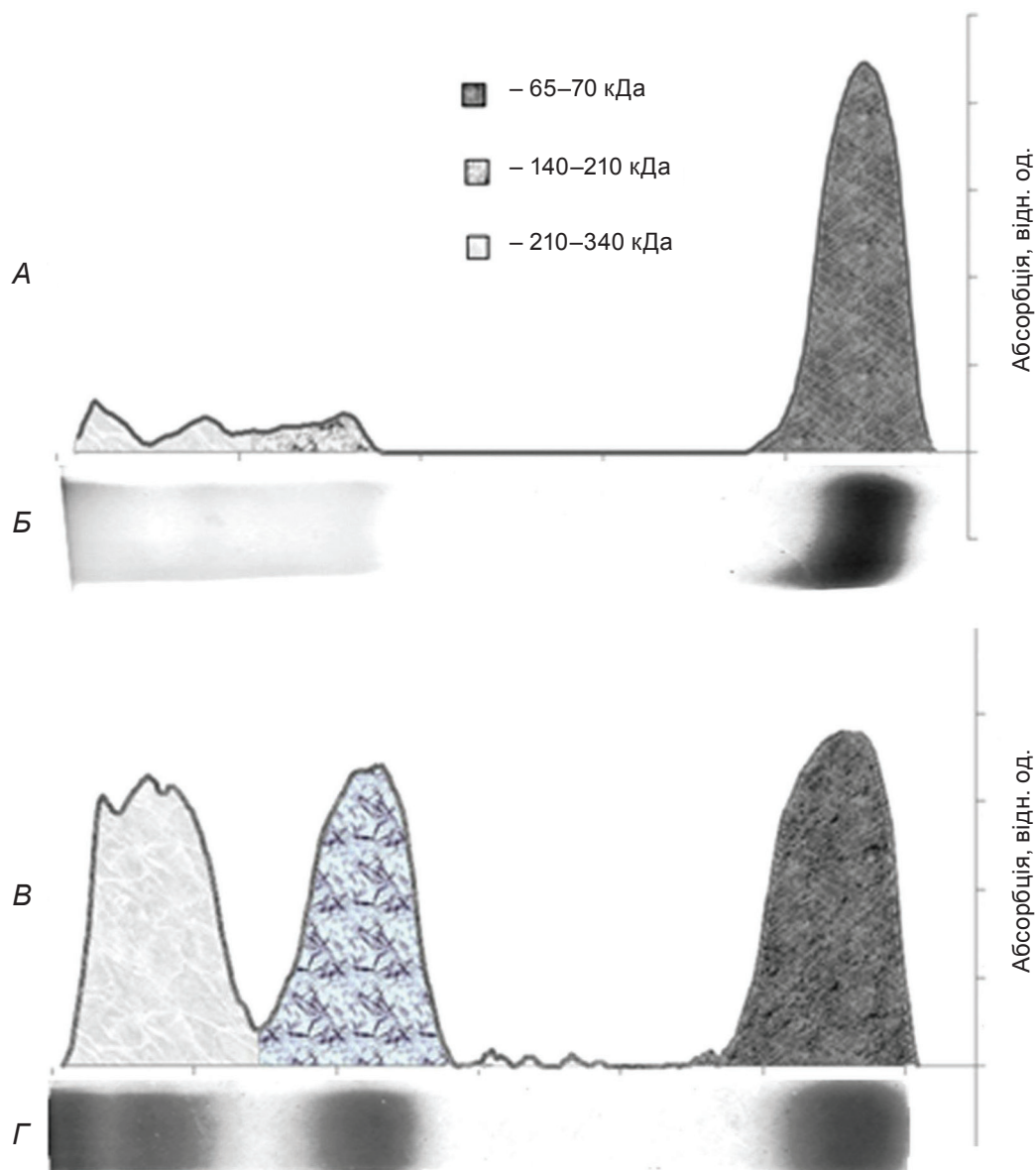


Рис. 7. Розподіл абсорбції електрофореграми за молекулярною масою зразка альбуміну людини без альдегідів (А) та після інкубації без світла при 37 °С, рН 7,4, з формальдегідом протягом 25 діб (В); відповідні електрофореграми (Б, Г)

формальдегід – у 3,8 раза. Ця шкала властивостей альдегідів до полімеризації не збігається зі шкалою утворення флуоресцентних аддуктів та карбонілювання протеїну. Так, наприклад, серед досліджених альдегідів формальдегід найменшою мірою формує флуоресцентні продукти та не вирізняється високою активністю утворення протеїнових СО-груп, однак має найвищу полімеризуючу здатність.

Останнім часом «блакитна» автофлуоресценція поверхні шкіри пацієнта використовується як маркер інтенсивності

процесів постсинтетичної модифікації протеїнів та накопичення кінцевих продуктів ліпидування та глікування [26, 27]. Вважається, що цей показник є прогностичним до розвитку низки патологій, що асоційовані з посиленням протеїнових модифікацій, таких як кардіоваскулярні, нейродегенеративні, ниркові захворювання, ускладнення діабету тощо. Однак у разі використання цього маркера необхідно враховувати, що певні випадки карбонільного стресу, наприклад гіперпродукція в організмі формальдегіду, не призведуть до істотного по-



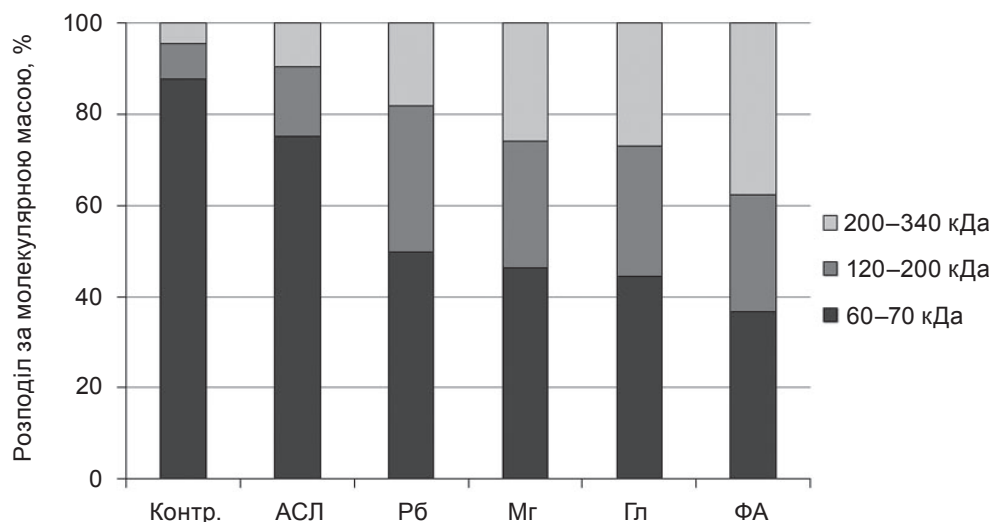


Рис. 8. Розподіл величин абсорбції електрофореграми АСЛ за трьома діапазонами молекулярної маси до та після інкубації без світла при 37 °С, рН 7,4, протягом 25 діб без/з додаванням альдегідів

силення автофлуоресценції шкіри, але будуть значно посилювати протеїнові постсинтетичні модифікації.

У досліджах *in vitro* на альбуміні порівняли модифікуючі властивості ендогенних альдегідів. Так, шкала від найнижчої до найбільшої здатності формувати флуоресцентні аддукти альбуміну має вигляд: формальдегід, метилглюксаль, рибоза, глюксаль; до карбонілювання протеїну: рибоза, формальдегід, глюксаль, метилглюксаль; до полімеризації альбуміну – утворенню міжмолекулярних зшивок: рибоза, метилглюксаль, глюксаль, формальдегід. Результати дослідження свідчать, що ці альдегіди різняться за спрямованістю утворення протеїнових модифікацій. Так, формальдегід із найнижчою здатністю утворювати флуоресцентні аддукти має найвищу спроможність формувати міжмолекулярні протеїнові зшивки. Тому залежно від особливостей перебігу в організмі карбонільного стресу необхідно коректно вибирати значущі показники постсинтетичних модифікацій. Наприклад, за гіперпродукції формальдегіду флуоресценція поверхні шкіри або інших біологічних зразків не повною мірою буде характеризувати інтенсивність постсинтетичних модифікацій протеїнів.

### СРАВНЕНИЕ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ БИОАКТИВНЫХ АЛЬДЕГИДОВ НА АЛЬБУМИН ЧЕЛОВЕКА

И. П. Крисяк, А. Я. Кнауб, С. Г. Шандренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: iryna-kr @yandex.ua

Постсинтетические модификации протеинов являются причиной и следствием многих заболеваний, а альдегиды – одними из основных факторов образования этих модификаций. В опытах *in vitro* проведено сравнительное исследование модифицирующего действия на альбумин человека ряда эндогенных альдегидов. Раствор альбумина человека (20 мМ) инкубировали с альдегидами: рибозой, глюксалем, метилглюксалем и формальдегидом (20 мМ каждый) и с их смесями в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,02% азида натрия, при 37 °С в темноте в течение 30 суток. Определяли флуоресцентные свойства аддуктов, содержание протеиновых карбонильных групп, перераспределение молекулярной массы протеина.

Получены следующие рейтинги альдегидов от низшего к самому высокому уровню по

способности формировать на альбумине флуоресцентные аддукты: формальдегид, метилглиоксаль, рибоза, глиоксаль; карбонилировать протеины: рибоза, формальдегид, глиоксаль, метилглиоксаль; формировать межмолекулярные связи альбумина: рибоза, метилглиоксаль, глиоксаль, формальдегид. Установлено, что альдегиды, различаются по направленности образования протеиновых модификаций. Так, например, формальдегид, обладая низкой способностью формировать флуоресцентные аддукты, проявляет наивысшую способность образовывать межмолекулярные протеиновые связи. Поэтому в зависимости от особенностей протекания в организме карбонильного стресса необходимо корректно выбирать значимые показатели пост-синтетических модификаций.

**Ключевые слова:** альбумин, альдегиды, флуоресценция, протеиновые сшивки, модификация протеинов.

#### COMPARISON OF BIOACTIVE ALDEHYDES MODIFYING ACTION ON HUMAN ALBUMIN

*I. P. Krysiuk, A. J. Knaub, S. G. Shandrenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: iryna-kr@yandex.ua

Protein's postsynthetic modifications are a cause and a consequence of many diseases. Endogenous aldehydes are one of the main factors of these modifications formation. The human albumin's modification under some aldehydes influence in *in vitro* experiment has been investigated. Human albumin (20 mM) was incubated with following aldehydes: ribose, glyoxal, methylglyoxal and formaldehyde (20 mM each) and their combinations in 0.1 M Naphosphate buffer (pH 7.4) with 0.02% sodium azide at 37 °C in the dark for up to 30 days. We have determined the fluorescent properties of the samples, the content of protein's carbonyl groups and the redistribution of protein's molecular weight.

The following ratings of aldehydes from the lowest to the highest effect have been obtained. Fluorescent albumin adducts formation: formaldehyde, methylglyoxal, ribose, glyoxal; carbonylation of the protein: ribose, formaldehyde, glyoxal, methylglyoxal; polymerization of albumin - the formation of intermolecular crosslinks: ribose, methyl-

glyoxal, glyoxal, formaldehyde. The results indicate that these aldehydes have different capability for protein's modifications. For example, formaldehyde, having the lowest ability to form fluorescent adducts, shows the highest ability to form protein's intermolecular crosslinks. Therefore, methods and parameters in order to evaluate the protein postsynthetic modification intensity have to be chosen correctly according to carbonyl stress peculiarity in order to evaluate the protein's postsynthetic modification intensity.

**Key words:** albumin, aldehydes, fluorescence, protein's cross-link, protein's postsynthetic modification.

1. *Echtay K. S., Esteves T. C., Pakay J. L. et al. // EMBO J. – 2003. – 22, N 16. – P. 4103–4110.*
2. *Haynes R. L., Szeweda L., Pickin K. et al. // Mol. Pharmacol. – 2000. – 58, N 4. – P. 788–794.*
3. *Kaushik M. D., Tuanjie C., Hui W. et al. // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2010. – 88, N 3. – P. 273–284.*
4. *Singh R., Barben F., Mori T., Beilin L. // Diabetologia. – 2001. – 44, N 2. – P. 129–146.*
5. *Baynes J. W. // Biogerontology. – 2000. – 1, N 3. – P. 235–246.*
6. *Mostafa A. A., Randell E. W., Vasdev S. C. et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2007. – 302, N 1–2. – P. 35–42.*
7. *Shaikh S., Nicholson L. F. // J. Neurosci. Res. – 2008. – 86, N 9. – P. 2071–2082.*
8. *Fuentealba D., Friguet B., Silva E. // Photochem. Photobiol. – 2009. – 85, N 1. – P. 185–194.*
9. *Krautwald M., Münch G. // Exp. Gerontol. – 2010. – 45, N 10. – P. 744–751.*
10. *Schmitt A., Schmitt J., Münch G., Gasic-Milencovic J. // Anal. Biochem. – 2005. – 338, N 2. – P. 201–215.*
11. *Goldin A., Beckman J. A., Schmidt A. M., Creager M. A. // Circulation. – 2006. – 114, N 6. – P. 597–605.*
12. *Grimsrud P. A., Hongwei X., Griffin T. J., Bernlohr D. A. // J. Biol. Chem. – 2008. – 283, N 32. – P. 21837–21841.*
13. *Cloos P. A., Christgau S. // Matrix Biol. – 2002. – 21, N 1. – P. 39–52.*
14. *Desai K. M., Wu L. // Drug Metabol. Drug Interact. – 2008. – 23, N 1–2. – P. 151–173.*
15. *Kuhla B., Luth H. J., Haferburg D. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2005. – 1043, N 1. – P. 211–216.*

16. Glenn J., Stitt A. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – **1790**, N 10. – P. 1109–1116.
17. Kalousova M., Zima T., Tesar V. et al. // *Mutat. Res./Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2005. – **579**, N 1–2. – P. 37–46.
18. Levine R. L., Garland D., Oliver C. N. et al. // *Methods Enzymol.* – 1990. – **186**. – P. 464–478.
19. Зайцева О. В., Шандренко С. Г. // *Укр. біохім. журн.* – 2012. – **84**, № 5. – С. 112–116.
20. Володіна Т. Т., Печенова Т. М., Дзвонкевич Н. Д. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 65–73.
21. Шандренко С. Г., Головін А. С., Дмитренко М. П. та ін. // *Журн. хроматогр. т-ва.* – 2003. – **2**, № 4. – С. 22–30.
22. Meerwaldt R., Graaff R., Oomen P. H. et al. // *Diabetologia.* – 2004. – **47**, N 7. – P. 1324–1330.
23. Medina-Navarro R., Nieto-Aguilar R., Alvares-Aguilar C. // *Lipids Health Dis.* – 2011. – **10**. – P. 201.
24. Halliwell B., Gutteridge J. M. *Free Radicals in Biology and Medicine.* – Oxford, USA: Clarendon Press, 2007. – 704 p.
25. Britt Hofmann, Anne-Catrin Adam, Kathleen Jacobs et al. // *Exp. Gerontol.* – 2013. – **48**, N 1. – P. 38–44.
26. Makulska I., Szczepańska M., Drożdż D. et al. // *Pediatr. Nephrol.* – 2013. – **28**, N 1. – P. 121–128.
27. de Vos L. C., Noordzij M. J., Mulder D. J. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2013. – **33**, N 1. – P. 131–138.

Отримано 16.05.2013