

УДК 576:579.22:616-092

ОЦІНЮВАННЯ ЕФЕКТІВ СТРЕСУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ ЗА ІНТЕНСИВНІСТЮ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ТА ОКИСНЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ПРОТЕЇНІВ У МЕМБРАНАХ КЛІТИН МІКОПЛАЗМ

М. Є. Романько

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків

E-mail: marina_biochem@list.ru

Встановлено, що зберігання клітин тест-штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* та *A. Laidlawii* в ліофілізованому стані впродовж року приводить до зростання ступеня окиснювальної модифікації протеїнів. Регуляторні механізми інтенсивності ліпопероксидації в мембранах деліофілізованих клітин штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* та *A. Laidlawii* характеризуються інтенсивністю реакцій посилення антиокиснювальної активності, гальмуванням активності каталази та накопиченням продуктів нейтрального й основного характеру. Потенціалу власної антиокиснювальної системи мембран деліофілізованих клітин досліджуваних тест-штамів недостатньо для зберігання нативної структури протеїнів мембрани та запобігання впливу активних метаболітів кисню, тобто роль антиокиснювальної системи в захисті мембран клітин мікроорганізмів доцільно розглядати не лише як регуляторну, а й як прогностичну. Результати роботи можуть бути корисними як прогностичні параметри в різноманітних біотехнологічних процесах, пов'язаних з накопиченням біомаси мікроорганізмів у середовищах, збагачених або лімітованих за будь-яким компонентом, та для контролювання якості імунобіологічних препаратів за допомогою цих тест-штамів.

Ключові слова: клітина, ліофілізація, ліпопероксидація, мембрана, мікоплазма, окиснювальна модифікація протеїнів, тест-штам.

Згідно з ISO 13408-3:2006 [1], ліофілізація — це фізико-хімічний процес висушування, розроблений для видалення розчинників з обох водних та неводних систем, передусім, щоб досягти стабільності продукту або матеріалу. Ліофілізація є синонімом терміна «заморожування-висушування», тому включає заморожування водної системи та видалення розчинника, спочатку випарюванням (первинне висушування), а потім десорбцією (вторинне висушування) до рівня, який не підтримує хімічні реакції або біологічний ріст. Результатом є стабільний, правильно створений продукт, здатний швидко розсіпатися або розчинятися, водночас зберігаючи біологічну активність.

З другого боку, вплив на клітину заморожування та висушування можна розглядати як екстремальні ефекти, що призводять до різних порушень її структурно-фізіолого-біохімічного стану, у тому числі — летальних. Відомо, що цитоплазматична мембрана ушкоджується в першу чергу, оскільки вона є однією з основних мішеней дії різноманітних чинників [2, 3]. Активні метаболіти

кисню (АМК), утворені у стресованій клітині, у великих концентраціях можуть модифікувати макромолекули та спричинювати її деструктивні зміни, а в низьких — виконувати сигнальні функції. Тому навіть відносно невеликі кількості АМК впливатимуть на експресію генів, репараційні та метаболічні процеси [4–6].

Важливим стартовим чинником запуску механізмів як окиснювання протеїнів, так і пероксидного окиснювання ліпідів є радикали O_2^* та інші АМК. У зв'язку з тим, що протеїни й ліпіди входять до клітинних мембран як структурні елементи, їх ураження зумовлює порушення регуляції хімізму та проникливості живої клітини, а також руйнування, що згодом призводить до її загибелі. Наприклад, зміна вмісту ненасичених жирних кислот у мембрані впливає на ступінь плинності її ліпідних компонентів, а отже на інтенсивність процесів ліпопероксидації тощо, унаслідок чого вона втрачає резистентність до низькотемпературної та іншої дії [7, 8].

Згідно з цим розвиток ланцюгових реакцій під дією будь-якого чинника відбувається на фоні ураження або інгібування природних антиокиснювальних (антиоксидантних) систем, функція яких полягає в запобіганні надлишковому окиснюванню [9]. Зрушення в роботі однієї або кількох ланок скоординованої системи регуляції та/або запобігання надлишковому окиснюванню призводить до ушкодження структурно-функціонального стану мембран та зміни важливих метаболічних процесів — інактивації ферментів, розладу головних систем детоксикації та інших тяжких наслідків [10–12].

Виходячи з вищезазначеного, дослідження інтенсивності ліпопероксидації й окиснювання протеїнів та показників їх регуляції може мати значення в оцінюванні впливу стресорів, у тому числі — технологічного походження. Тому метою досліджень було визначення рівня пероксидного окиснювання ліпідів (ПОЛ), похідних окиснювальної модифікації протеїнів (ОМП) та показників антиокиснювальної системи (АОС) у мембранах клітин тест-штамів мікоплазм за умов ефектів ліофілізації.

Матеріали і методи

Як експериментальні моделі було використано нативні бульйонні концентрати та деліофілізовані клітини паспортизованих тест-штамів *Mycoplasma orale* ATCC 23714, *Mycoplasma arginini* G 230, *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 19610 і *Acholeplasma laidlawii* ATCC 23206, які було культивовано впродовж 4–5 діб на живильному середовищі з додаванням інактивованої кінської сироватки ($t = 56 \pm 1$ °C; pH 7,49), виготовленому за оригінальним прописом Національного центру штампів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штампів мікроорганізмів (ДНКІБШМ, м. Київ).

Концентрація клітин у культурах тест-штамів була в межах $5,6 \cdot 10^7$ – $5,5 \cdot 10^9$ клітин/см³. Ліофільне висушування здійснювали на ліофільній установці (Jouan LP, Франція) відповідно до вимог «Методических рекомендаций по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов» (1981). Деліофілізацію клітин проводили таким чином: ліофілізовані культури досліджуваних штампів мікоплазм розчиняли відповідним живильним середовищем до початкового об'єму (2,0 см³) з подальшим висіванням на середовище культивування в концентрації у середньому $2 \cdot 10^6$ клітин/см³.

Сумарні мембранні фракції (СМФ) клітин мікоплазм одержували за таким регла-

ментом: клітини відмивали від культуральної рідини і ресуспендували в середовищі А (10 мМ Трис-НСL, pH 7,4; 4 мМ MgCl₂, 1 мМ феназинметилсульфонілфториду, 1 мМ дитіотреїтолу) центрифугуванням при 6 000 об/хв двічі впродовж 10 хв; піддавали руйнуванню шляхом осмотичного лізису дистильованою водою протягом 20–25 хв. Колбу із суспензією (25 см³, концентрація клітин — 16–20 мг сухої маси/см³) вміщували в льодяну баню. Ступінь руйнування контролювали за зростанням у середовищі концентрації протеїну, що звільнюється із цитоплазми при деструкції клітинних оболонок. За таких умов диспергування концентрація протеїну суттєво зростала і стабілізувалася на максимальному рівні через 2,5–3,0 хв, тому час дезінтеграції клітин звичайно становив 3,0–3,5 хв. Одержаний таким чином диспергат центрифугували при 3 000 об/хв впродовж 15–20 хв. Осад (залишок та фрагмент клітинної оболонки) відкидали, а супернатант знову центрифугували при 10 000 об/хв протягом 1 год. При цьому фрагменти плазмалеми, руйнованої ультразвуком, залишались в осаді. З метою відмивання осад центрифугували, ресуспендували в невеликій кількості середовища А, стабілізували, додаючи мертвіолят з розрахунку 1:100 та використовували в досліді, за необхідності — розводили гліцеролом на 20% (за об'ємом) і зберігали при температурі -18 ± 1 °C. Для стандартизації препаратів СМФ визначали наявність у їхньому складі протеїну за методом Лоурі в модифікації Miller [13].

У СМФ відмитих нативних та деліофілізованих клітин досліджували інтенсивність процесів ПОЛ за визначенням концентрації дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) у гептанізопропанольних екстрактах з використанням модифікованої нами методики В. Б. Гаврилової і М. І. Мішкорудної [14]. Принцип методу визначення інтенсивності ОМП у СМФ ґрунтувався на здатності радикальних залишків аліфатичних амінокислот утворювати альдегідні й кетонні групи. Останні взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру реєстрували за довжини хвилі 370 нм, а основного характеру — за 430 нм відповідно. Враховуючи значення молярного коефіцієнта екстинції ($2,1 \cdot 10^4$ М⁻¹см⁻¹) визначали вміст фенілгідразонів основного (ОХ) і нейтрального (НХ) характеру, як описано в роботі [15].

Стан АОС визначали спектрофотометрично за активністю каталази (КФ 1.11.1.6) з використанням H_2O_2 за довжини хвилі 410 нм [16]. АОА ліпідів, екстрагованих із СМФ клітин бактерій, визначали, як описано в роботі [17].

Для одержання статистично вірогідних результатів визначення вищезазначених параметрів проводили у 10-кратній повторюваності з трьома паралельними пробами зразків. Математичну обробку одержаних даних виконували за допомогою методів варіаційної статистики, як описано в роботі [18].

Результати та обговорення

Встановлено, що в СМФ нативних і деліюфілізованих клітин майже усіх досліджуваних штамів мікоплазм інтенсивність процесів ПОЛ є близькою за вмістом продуктів ліпопероксидації — ДК і МДА (табл. 1). Було зареєстровано тенденцію до зростання рівня МДА в СМФ деліюфілізованих клітин штамів *M. gallisepticum* і *A. laidlawii*, що становило 12,9 і 6,1% відповідно.

Відомо, що одним із пріоритетних критеріїв використання мікоплазм як моделі у мембранних дослідженнях є те, що ліпідний склад їхніх мембран можна контролювати [19]. Така можливість пов'язана із загальною або частковою нездатністю цих організмів до синтезу жирних кислот з довгим ланцюгом і холестеролу, що зумовлює залежність їх від наявності

цих компонентів у середовищі росту. У зв'язку з цим можна припустити, що ліпіди мембран клітин досліджуваних нами тест-штамів мікоплазм виявилися певною мірою резистентними до активації пероксидного окиснювання внаслідок ефектів технологічного чинника — ліюфілізації. Однак, з іншого боку — фізичний стан мембранних ліпідів клітин мікоплазм впливає на активність АТР-ази, локалізація якої пов'язана виключно з мембраною [20]. Попередніми дослідженнями було встановлено, що внаслідок процесів ліюфілізації реєструється посилення мембранної АТР-ази в деліюфілізованих клітинах штамів *M. orale* ATCC 23714, *M. arginini* G 230, *M. gallisepticum* ATCC 19610 та *A. laidlawii* ATCC 23206, що свідчить про активацію швидкості гідролізу АТР у їхніх мембранах [21]. Поряд із цим інші дослідники виявили наявність ламаючості кривих Арреніуса для АТР-азної активності мембран *A. Laidlawii* і *M. mycoides var. capri* за температури, яка відповідає фазовим переходам у ліпідній фазі цих мембран [20, 22].

Встановлено, що процеси ліюфілізації не вплинули на інтенсивність ОМП за рівнем їхніх карбонільних похідних нейтрального й основного характеру клітин штаму *M. orale* ATCC 23714. Однак у СМФ нативних клітин саме цього штаму реєстрували найвищі значення показників ОМП НХ і ОХ — $2,67 \pm 0,25$ і $1,92 \pm 0,25$ ммоль/г протеїну — серед відповідних показників інших штамів (табл. 2). З результатів досліджень ОМП у СМФ клітин мікоплазм, що наведені в табл. 2, випливає, що після деліюфілізації клітин штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* й *A. laidlawii* у їхніх мембранах встановлено активацію процесів окиснювання протеїнів ($p \leq 0,05$). Дослідження рівня ОМП на основі визначення вмісту динітрофенілгідразонів похідних їхніх амінокислот показало значне зростання кількості карбонільних похідних у мембранах деліюфілізованих клітин порівняно з нативними. Так, зростання вмісту карбонільних похідних НХ та ОХ у мембранах штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* й *A. laidlawii* становило: 76,8 та 127,0%, 101,1 та 116,2% і 671,1 і 500,0% відповідно.

У зв'язку з тим, що утворення продуктів окиснювання протеїнів може призводити до їх швидкого розкладання і деструкції, саме карбоніли ОМП є первинним маркерами окиснювання протеїнів [23]. Відомо, що деградовані протеїни можуть знаходитись у клітинах годинами і навіть днями, а продукти ПОЛ піддаються детоксикації вже

Таблиця 1. Інтенсивність процесів пероксидного окиснювання ліпідів у сумарних мембранних фракціях нативних та деліюфілізованих клітин тест-штамів мікоплазм ($M \pm m$; $n = 10$)

| Клітини тест-штамів | Продукти ПОЛ | |
|-------------------------|--------------|-----------|
| | ДК, мкмоль/л | МДА, ΔD |
| Нативні клітини | | |
| <i>M. orale</i> | 14,88±1,45 | 2,45±0,52 |
| <i>M. arginini</i> | 14,99±1,34 | 2,51±0,10 |
| <i>M. gallisepticum</i> | 14,95±3,12 | 2,48±0,11 |
| <i>A. laidlawii</i> | 15,71±1,95 | 2,64±0,15 |
| Деліюфілізовані клітини | | |
| <i>M. orale</i> | 14,88±1,25 | 2,58±0,40 |
| <i>M. arginini</i> | 14,88±1,25 | 2,64±0,35 |
| <i>M. gallisepticum</i> | 14,99±1,40 | 2,80±0,15 |
| <i>A. laidlawii</i> | 15,35±2,00 | 2,80±0,04 |

Таблиця 2. Інтенсивність процесів окиснювальної модифікації протеїнів у сумарних мембранних фракціях нативних та деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм ($M \pm m$; $n = 10$)

| Клітини тест-штамів | Продукти ОМП | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | НХ370, ммоль/г протеїну | ОХ430, ммоль/г протеїну |
| Нативні клітини | | |
| <i>M. orale</i> | 2,67±0,25 | 1,92±0,25 |
| <i>M. arginini</i> | 0,95±0,01 | 0,37±0,02 |
| <i>M. gallisepticum</i> | 0,95±0,12 | 0,37±0,01 |
| <i>A. laidlawii</i> | 0,38±0,02 | 0,24±0,02 |
| Деліофілізовані клітини | | |
| <i>M. orale</i> | 2,51±0,25 | 0,97±0,40 |
| <i>M. arginini</i> | 1,68±0,09* | 0,84±0,05* |
| <i>M. gallisepticum</i> | 1,91±0,05* | 0,80±0,01* |
| <i>A. laidlawii</i> | 2,93±0,18* | 1,44±0,03* |

Примітка: * — різниця значень показників деліофілізованих клітин вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно їх рівня у нативних клітинах.

через декілька хвилин [24]. Одержані дані дозволяють розглядати окиснювання протеїнів як відносно стабільні показники окиснювального стресу, що має значення для дослідницької практики. Оскільки важливим стартовим чинником запуску механізмів як окиснювання протеїнів, так і ліпопероксидації є радикали O_2^{\cdot} , можна припустити визначальну роль АОС в захисті мембран досліджуваних клітин не лише як регуляторну, а й як прогностичну.

Так, було визначено рівень показників, що характеризують стан як ензиматичної ланки, так і загального ендогенного потенціалу АОС мембран клітин. Дані про результати дослідження активності каталази та показника АОА в СМФ нативних і деліофілізованих клітин мікоплазм різних тест-штамів наведено в табл. 3. Встановлено, що в СМФ деліофілізованих клітин *M. orale* значення показників продуктів ПОЛ і ОМБ були статистично близькими до їхніх значень у мембранах нативних клітин цього штаму. При цьому рівень активності індукбельної каталази істотно не змінювався. У СМФ деліофілізованих клітин інших досліджуваних штамів мікоплазм значення активності каталази, навпаки, були меншими відносно значень в СМФ їхніх нативних клітин, що для штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* та *A. laidlawii* становило 2,6, 1,5 і 2,8 рази відповідно ($p \leq 0,05$). Одержані результати узгоджуються з даними [25] щодо надмірно-

Таблиця 3. Активність каталази та рівень антиокиснювальної активності в сумарних мембранних фракціях нативних та деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм ($M \pm m$; $n = 10$).

| Клітини тест-штамів | Показник | |
|-------------------------|---|--------------------|
| | Каталаза, ммоль H_2O_2 /с мг протеїну | АОА, % інгібування |
| Нативні клітини | | |
| <i>M. orale</i> | 22,60±1,50 | 63,30±4,00 |
| <i>M. arginini</i> | 38,50±2,00 | 26,70±2,05 |
| <i>M. gallisepticum</i> | 57,20±3,55 | 6,70±0,25 |
| <i>A. laidlawii</i> | 21,11±1,90 | 60,00±3,25 |
| Деліофілізовані клітини | | |
| <i>M. orale</i> | 24,63±2,45 | 60,0±3,45 |
| <i>M. arginini</i> | 14,60±1,95* | 20,00±4,05 |
| <i>M. gallisepticum</i> | 38,50±2,10* | 13,30±1,05* |
| <i>A. laidlawii</i> | 7,60±0,70* | 73,30±2,80* |

Г

О

утворення карбонільних похідних на фоні різкого падіння активності каталази та зростання рівня активності супероксиддисмутази. Слід зазначити, що зареєстрована тенденція до посилення процесів ПОЛ у мембранах деліофілізованих клітин штамів *M. gallisepticum* і *A. Laidlawii* супроводжувалась значним зростанням рівня показника АОА — до 2,0 і 1,2 рази відповідно ($p \leq 0,05$). Процеси активації неензиматичної ланки АОС очевидно носять компенсаторний характер для мембран стресованих клітин.

Отже, можна зробити висновок про те, що ліофілізація справляла індукуючий вплив на окиснювання протеїнів мембран досліджуваних клітин штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* та *A. Laidlawii*, на відміну від штаму *M. orale*. Окиснювальна деградація протеїнів еукаріотів і прокаріотів пов'язана з їх денатурацією, гідрофобністю і посиленою протеолітичною чутливістю. Денатурація й гідрофобність зростають на початкових стадіях ОМП і фактично розглядаються як «сигнал» для внутрішньоклітинного протеолізу окиснювальних протеїнів. Доведено, що за багатьох патологічних станів саме окиснювальні модифікації протеїнів, а не ліпідів і нуклеїнових кислот, є одним із ранніх та надійних маркерів окиснювального стресу [26]. Регуляторні механізми інтенсивності ліпопероксидації та окиснювання про-

теїнів у мембранах деліофілізованих клітин цих штамів характеризуються посиленням реакції загальної АОА і гальмуванням активності каталази та накопиченням похідних ОМП нейтрального і основного характеру, що може зумовлювати потенціал клітин мікоплазм щодо їх протективності та резистентності за умов дії стресорних чинників. Потенціалу власної АОС мембран деліофілізованих клітин тест-штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *A. Laidlawii* виявилось не-

достатньо для зберігання нативної структури протеїнів мембрани та запобігання впливу АМК, що підтверджується посиленням окиснювальної деструкції протеїнів.

Автор висловлює вдячність співробітникам Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІВШМ д-ру вет. наук В. О. Ушкалову і наук. співр. В. В. Андрущенко за сприяння у проведенні досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

- ISO 13408-3:2006. Aseptic processing of health care products — Part 3: Lyophilization. — 2006. — 28 p.
- Дубинина Е. Е., Пустыгина А. В. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях // Укр. біохім. журн. — 2008. — Т. 80, № 6. — С. 5–18.
- Calcott P. H. Freezing and thawing microbes // Meadowfield Ltd., 1980.
- Дубинина Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме ткани при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. — 2001. — Т. 47, № 6. — С. 561–581.
- Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект. — М.: Маик, 2001. — 343 с.
- Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и экспрессия генов // Биохимия. — 2002. — Т. 67, № 3. — С. 339–352.
- Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Бондарь И. А. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Фирма «Слово», 2006. — 556 с.
- Пушкарь Н. С., Билоус А. М., Цветков Ц. Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования. — К.: Наук. думка, 1984. — 264 с.
- Старчеус А. П., Сокирко Т. О., Долецкий С. П. Оцінка рівня перекисного окиснення ліпідів і системи антиоксидантного захисту в організмі тварин: Метод. рекомендації. — К., 2004. — 26 с.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах — М.: Атомиздат, 1972. — 245 с.
- Барабой В. А., Брехман И. И., Головин В. Г. Перекисное окисление липидов и стресс. — СПб.: Наука, 1992. — 268 с.
- Оксенгендлер Г. И., Абрамова Ж. И. Человек и антиокислительные вещества. — Л.: Наука, 1985. — 230 с.
- Miller G. L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem. — 1959. — V. 31, N5. — P. 964–966.
- Гаврилова В. Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. — 1985. — № 3. — С. 33–35.
- Арчаков А. И., Михосоев И. М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия. — 1998. — Т. 54, № 2. — С. 179–186.
- Королюк М. А. Определение активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
- Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Там же. — 1988. — № 5. — С. 59–62.
- Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 230 с.
- Мэдди Э. Биохимическое исследование мембран. — М.: «Мир», 1979. — 460 с.
- Грузина, Т. Г., Балакина М. Н., Карамушка В. И. и др. АТФ-аза плазматических мембран бактерий в оценке токсичности тяжелых металлов // Микробиология. — 1997. — Т. 66, № 1. — С. 14–15.
- Романько М. Є., Ушкалов В. О., Андрущенко В. В. АТФ-аза плазматичних мембран клітин тест-штамів мікоплазм за умов ефектів ліофілізації // Вісн. Білоцерківського держ. агр. ун-ту. — Біла Церква, 2008. — Вип. 56. — С. 142–145.
- Карамушка В. И., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. Энергозависимая аккумуляция Au (III) приводит к ингибированию систем трансформации энергии у бактерий // Прикл. биохим. и микробиол. — 1991. — Т. 27, вып. 1. — С. 119–126.
- Гуськов, Е. П., Лукаш А. И. Избыточность фенотипа, окислительный мутагенез и концепция буферного катаболизма. — Ростов-на-Дону, 1986. — 20 с. — Деп. в ВИНТИ 11.05.86, № 3363–В86.
- Кения М. В. Динамика свободнорадикальных процессов и продуктов азотистого катаболизма в тканях системы крови при гипероксии: автореф. дис. ... канд. биол. наук: химия» — Ростов-на-Дону, 1991. — 19 с.
- Кения М. В., Лукаш А. И., Гуськов Е. П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи