

- 1) пациентки с низким качеством эмбриона и пониженной антиоксидантной активностью, АОА 11.4 ± 2.5 мМ аскорбата ($n=16$);
- 2) пациентки с эмбрионом хорошего качества, АОА 21.4 ± 3.8 мМ ($n=10$);
- 3) пациентки с низким качеством эмбриона и повышенной АОА, равной 33.7 ± 2.9 мМ ($n=6$).

Таким образом, можно предположить, что для развития качественного эмбриона требуется, чтобы в фолликуле, из которого происходит ооцит, соблюдалось оптимальное значение антиоксидантной активности, так как и уменьшение её (окислительный стресс), и увеличение (антиоксидантный стресс) отрицательно сказываются на качестве эмбриона. Эти данные соответствуют современной концепции о том, что для успешного развития ооцита требуется оптимальный уровень продукции активных форм кислорода.

Выводы. Исходя из сопоставления АОА (в единицах аскорбата) с качеством эмбриона, можно предложить три области:

- 1) зона сниженной антиоксидантной активности (менее 15 мкМ, оксидативный стресс) – у этих пациенток наблюдали эмбрионы плохого качества;
- 2) зона нормальной АОА (15-30 мкМ) – у пациенток получены эмбрионы хорошего качества;
- 3) зона повышенной АОА (более 30 мкМ, антиоксидантный стресс) – у пациенток получены эмбрионы плохого качества.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-015-00234.

Литература

1. Алексеев А.В., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис (2-амидинопропана) // Вестник Московского Университета. – 2012. – Т. 53, № 3. – С. 187-193.
2. Oyawoye O., Gadir A.A., Garner A., Constantinovici N., Perrett C., Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome // Human reproduction. – 2003. – Т. 18, № 11. – С. 2270-2274.

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

Шолух М. В., Бондарюк Е. В., Брилевская С. И.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

msholukh@mail.ru

Митохондриальный изофермент аспартатаминотрансферазы (мАспАТ) катализирует обратимый перенос аминогруппы от аспарагиновой кислоты на α -кетоглутаровую кислоту с образованием щавелевоуксусной (ЩУК) и глутаминовой кислот. Являясь ключевым ферментом азотистого обмена, он играет важнейшую роль в сопряжении углеводного, энергетического и азотистого обменов, а также выполняет функцию белка связывающего жирные кислоты

[1]. Синтезируясь в цитоплазме клетки, мАспАТ транспортируется в митохондрии [1] и способна возвращаться в цитоплазму [2]. Необходимой стадией переноса фермента между цитоплазмой и митохондриями является разворачивание белковой молекулы, в результате чего полипептидная цепь более подвержена воздействию активных форм кислорода, источником которых является митохондрия. Следствием окислительного повреждения молекулы фермента является повышенная склонность к агрегации и необратимой инактивации. То есть окислительный стресс может явиться фактором, воздействующим через АспАТ на углеводный, энергетический и азотистый обмен. В данной работе мы оценивали влияние воздействия перекисей на процессы инактивации и термоагрегации митохондриальной АспАТ.

Материалы и методы. Активность мАспАТ определяли спектрофотометрическим методом Кармен [3] по поглощению НАДН при 340 нм в сопряженной реакции восстановления оксалоацетата до малата, катализируемой малатдегидрогеназой (МДГ). Реакционная среда содержала: 50 ммоль/л фосфатного буфера (рН 7,5), 20 ммоль/л α -кетоглутарата, 20 ммоль/л L-аспартата, 10 ммоль/л НАДН, 10 единиц МДГ, 1 ммоль/л пиридоксальфосфата. Реакцию запускали добавлением препарата мАспАТ из сердца свиньи. Реакцию проводили в лунках стандартного 96-луночного планшета. Изменение оптической плотности при 340 нм регистрировали с помощью планшетного ридера Multiscan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия).

Для оценки влияния H_2O_2 , органических гидроперекисей кумола и терт-бутила на активность и степень агрегации АспАТ фермент инкубировали в присутствии разных концентраций перекисей – 10, 100, 200, 500 мкмоль/л при рН 6,0 или 7,5 и температуре 37°C.

Степень агрегации фермента оценивали при нагревании в термостатируемой кювете, регистрируя изменение оптической плотности при 340 нм на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Австралия).

Результаты и их обсуждение. При инкубации мАспАТ из сердца свиньи с пероксидом водорода наблюдается дозо-зависимое падение активности со временем при рН 6,0: через 60 минут инкубации в присутствии 500 мкмоль/л H_2O_2 остаточная активность составляет менее 20%; при концентрации H_2O_2 10 мкмоль/л – около 40%. В более щелочной среде при рН 7,5, фермент проявляет большую устойчивость к действию H_2O_2 – остаточная активность составляет 20, 40 и 60% соответственно для концентрации H_2O_2 500, 200 и 10 мкмоль/л соответственно. Гидроперекиси кумола и терт-бутила практически не оказывали влияния на активность АспАТ независимо от рН.

Изучение влияния H_2O_2 на кинетику термоинактивации при 65 °С в качестве модели воздействия окислителя на развернутый белок также показало большую устойчивость фермента при значении рН 7,5. При рН 6,0 наблюдалась практически полная инактивация фермента при любой концентрации H_2O_2 . Падение активности фермента при рН 7,5 составляло от 87 до 96% в зависимости от концентрации H_2O_2 – от 0 до 500 мкмоль/л, соответственно.

В присутствии органических гидроперекисей изменений в кинетике термоагрегации митохондриальной АспАТ при pH 6,0 не наблюдалось, в то время как при pH 7,5 имело место увеличение светорассеяния, что говорит об образовании агрегатов белка. Наибольший эффект на процесс термоагрегации при обоих значениях pH оказывал H_2O_2 .

Для изучения эффектов перекисей на кинетику термоагрегации фермента оказалось удобнее использовать более термостабильную рекомбинантную бактериальную АспАТ *Bacillus circulans*, полученную в культуре *Escherichia coli*.

Установлено, что все изученные перекиси приводят к незначительному увеличению термоагрегации рекомбинантного фермента: гидроперекиси терт-бутила на 5%, кумола и H_2O_2 – на 10%. В присутствии в среде инкубации шаперонов GroEL процессы термоагрегации как нативного, так и окисленного фермента замедляются. Однако присутствие шаперонов не может свести степень агрегации окисленного белка к контрольному уровню. То есть окислительное повреждение молекулы фермента препятствует его полному восстановлению с помощью шаперонов.

Выводы. Митохондриальный изофермент АспАТ демонстрирует большую подверженность воздействию окислительных агентов в более кислой среде, при этом наибольшее повреждающее действие оказывал H_2O_2 . Денатурация фермента делает его более подверженным процессам окисления, а окисленный фермент не может быть полностью восстановлен шаперонами.

Литература

1. Stump D.D., Zhou S.-L., Berk P.D. Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver // Am. J. Physiol. – 1993. – Vol. 265. – G. 894-G902.
2. Шолух М.В., Пикулев А.Т. Роль адренорецепторов в регуляции активности изоферментов аспартат-аминотрансферазы сердца белых крыс // Вопр. мед. химии. – 1977. – Т. 236, № 6. – С. 808-812
4. Karmen A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum // J. Clin. Invest. – 1955. – Vol. 34. – P. 131.

СПЕКТРЫ ЯМР ^{31}P КРОВИ КРЫС ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА

Яфарова Г. Г.^{1,2}, Юртаева С. В.², Волков М. Ю.²,
Силантьева Д. И.¹, Ямалитдинова Э. И.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет,

² Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН, Казань, Россия

gusadila@mail.ru

Одним из источников новых данных о патогенезе травмы спинного мозга (ТСМ) может стать ^{31}P ядерная магнитно-резонансная спектроскопия крови, позволяющая неинвазивным методом получить информацию о метаболических сдвигах при данной патологии и наблюдать за процессом в динамике.