

Ląstelės biologija

Laboratorinis darbas

Lipidų peroksidacijos įvertinimas

Teorija

Ląstelės antioksidacinės sistemos sutrikimai ir nepalankios aplinkos sąlygos gali nevaldomai pagreitinti laisvųjų deguonies formų (angl. k. – *reactive oxygen species*, santr. **ROS**) susidarymą. Šie radikalai, pvz. superoksido anijono radikalas ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilo radikalas (OH^{\bullet}), vandenilio peroksidas (H_2O_2), susidaro kai molekulinis deguonis nepilnai redukuojamas (norint kad susidarytų H_2O , O_2 turi prisijungti 4 elektronus). Tai lemia **oksidacinį** ląstelės **stresą**. Šiai būsenai yra būdingi tam tikri įvairių ląstelės struktūrų pažeidimai. Žinoma daug ligų, kurių patogenezėi ROS labai svarbūs. Kenksmingi aplinkos veiksniai – ultragarsas, radiacija, sunkieji metalai ir kt. – taip pat sukelia oksidacinį stresą. Stiprus oksidacinis stresas sukelia ląstelės mirtį.

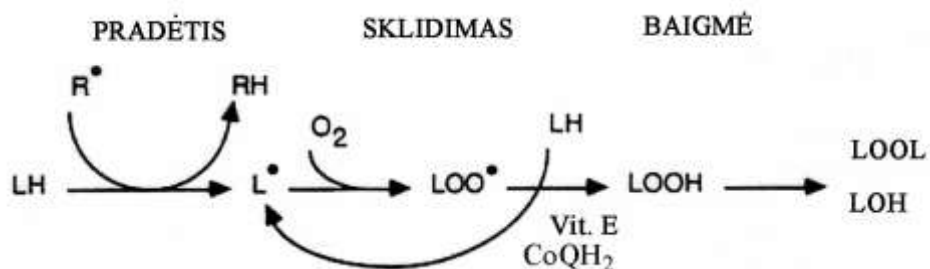
ROS sąveikauja su visomis svarbiausiomis biomolekulėmis (baltymais, DNR, lipidais, sacharidais) ir sukelia jų oksidacinius pažeidimus. Oksidacinio streso padariniai priklauso nuo oksiduotų biomolekulių funkcijos ir pažaidos pobūdžio. Tam tikros pažaidos gali būti grįžtamos, nes ląstelėje veikia savitieji pažaidų taisymo fermentai. Jeigu pažaidos negrįžtamos, oksiduota molekulė turi būti laiku suardyta ir pakeista nauja.

Lipidų peroksidacija. Lipidų sąveika su deguonies radikalais vadinama lipidų peroksidacija ir prasideda nuo arachidoninės rūgšties. Tai viena iš labiausiai paplitusių nesočių membranos riebalų rūgščių (RH), kurios sąveikauja su visais laisvaisiais deguonies radikalais (R^{\bullet}), susidarant riebalų rūgšties radikalui (L^{\bullet}). Šis radikalas greitai reaguoja su O_2 ir susidaro laisvas riebalų rūgšties radikalas (LOO^{\bullet}) kuris sukelia grandininę kitų membranos lipidų peroksidaciją (1 pav.). Lipidų peroksidacijai būdingos grandininės reakcijos. Skiriami trys jų etapai (1 pav.): **pradėtis** (angl. k. – *initiation*), **sklidimas** (angl. k. – *propagation*) ir **baigmė** (angl. k. – *termination*).

Įprasta lipidų peroksidacijos pradėties reakcija yra H atomo atėmimas iš nesočiosios riebalų rūgšties grandinės (2 pav.). Tada susidaręs **lipidinis radikalas L^{\bullet}** reaguoja su 3O_2 molekule (tripletinis O_2 reaguoja su radikalais) ir susidaro **lipidinis peroksidradikalas LOO^{\bullet}** . Šis

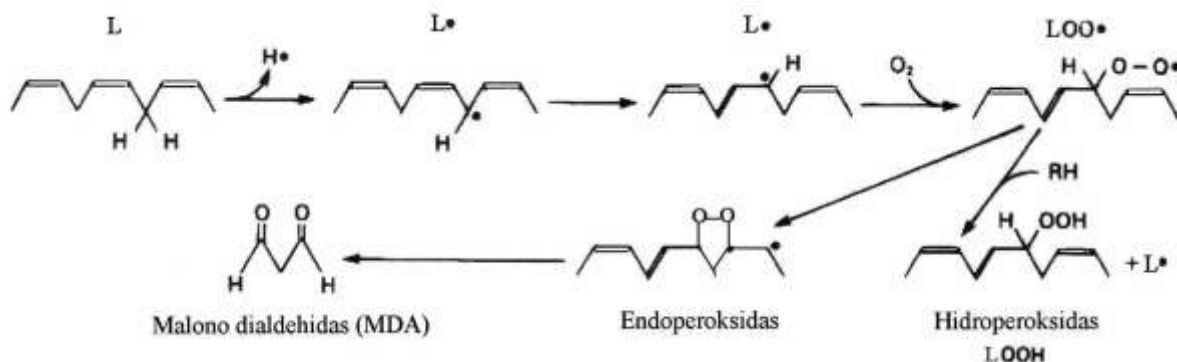
radikalas atima H atomą iš šalia esančios kitos riebalų rūgšties grandinės, paversdamas ją radikalu L^\bullet , o pats virsta **hidroperoksiradikalu LOOH**. Pastarasis gali sudaryti nestabilius hidroperoksidus ir endoperoksidus (17.10 pav.).

Tolesnė reakcijų grandinė tęsiama, kol neįvyksta baigmės reakcija. Viena peroksiduoto lipido molekulė gali sukelti kitų lipidų peroksidaciją, nes grandininė reakcija gali sukelti daugelio molekulių pažeidimą. Todėl labai svarbu yra ją kuo greičiau sustabdyti.



1 pav. Grandininė lipidų peroksidacijos reakcija ir jos baigmė.

Lipidų peroksidaciniai pažeidimai gali būti nutraukiami, veikiant tokoferoliams ir redukuotam kofermentui Q (1 pav.). Oksiduotą vitaminą E po to redukuoja askorbatas, o pastarąjį – GSH. Grandininė peroksidacija nutraukiama, jei du laisvieji radikalai susijungia ir sudaro produktus, kurie nėra radikalai ($L^\bullet + L^\bullet \rightarrow L-L$; $L^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow L-OOL$; $LOO^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow LOOL + O_2$). Tokie peroksidacijos produktai dažniausiai yra didelės susiūtos rie-



2 pav. Lipidų peroksidacijos metu susidaro riebalų rūgščių hidroperoksidai, endoperoksidai ir malono dialdehidai.

balų rūgštys ar fosfolipidai, kurių susikaupimas būdingas peroksiduotoms membranoms. Hidroperoksiradikalas lengvai skyla į kelis reaktyvius junginius – lipidinius alkoksilo radikalus LO^{\bullet} , konjuguotus lipidinius dienus, epoksidus, alkoholius, aldehydus. **Lipidų peroksidacijos rodiklis yra membranose susikaupusio malono dialdehido (MDA) kiekis (2 pav.).**

Lipidų peroksidacijos žalingas poveikis nesiriboja membranų pažeidimu. Jos kenksmingumą ląstelei didina tai, kad vandenyje tirpūs peroksidacijos produktai difunduoja į kitas ląstelės dalis ir sukelia antrines pažeidimus. Jie veikia kaip endogeniniai tvirtikliai, susiuvantys veiksniai, sudarantys tiltelius baltymų ir nukleorūgščių molekulėse. Aldehydai sukelia baltymų agregaciją (tuo paaiškinamas lipofuscino – amžiaus pigmento kaupimasis), sudaro aduktus su DNR (tai lemia mutacijas ir pakitusią genų raišką), slopina baltymų funkcijas. Bendras lipidų peroksidacijos ir antrinių efektų poveikis lemia aterosklerozę, hemolizinę anemiją, iš dalies – išemijos ir reperfuzijos pažeidimus.

Pagrindiniai lipidų peroksidacijos požymiai yra šie: nesočiųjų riebalų rūgščių grandinių irimas, peroksidacijos produktų (susiūtų lipidų darinių, aldehydų) susikaupimas. Tokie procesai nuolat vyksta ląstelėse, net nesant išorinių oksidacinių poveikių. Peroksidaciją *in vivo* sužadina natūralūs lipidų radikalai, todėl tai vadinama autooksidacija. Lipidų peroksidacija *in vivo* ir *in vitro* suintensyvėja hipoksijos sąlygomis esant antioksidantų stokai.

Lipidų pažeidimų taisymas. Oksiduotų lipidų sluoksnius gali pasiekti lipidų skaidymo fermentai – fosfolipazės. Fosfolipazė A_2 hidrolizuoja fosfolipidų 2-osios padėties ryšius, susidaro laisvosios riebalų rūgštys ir lizofosfolipidai. Fosfolipazė A_2 oksidacinio streso metu šalina riebalų rūgščių peroksidus iš membranos ir stabdo tolesnę grandininę peroksidaciją. Riebalų rūgščių peroksidai patenka į citozolį ir ten detoksikuojami glutationo peroksidazės, kuri juos verčia hidroksiriebalų rūgštimis. Likę membranoje lizofosfolipidai veikia kaip detergentai ir sukelia membranos pažeidimą. Tačiau lizofosfolipidai taip pat gali būti panaudoti fosfolipidų resintezei. Glutationo peroksidazių šeimos narys – fermentas **fosfolipidperoksidų glutationo reduktazė** – katalizuoja riebalų rūgščių hidroperoksidų virtimą alkoholiais dar jiems tebesant membranoje.

Šiame darbe jūs įvertinsite stipraus oksidatoriaus FeSO₄ ir lipiduose tirpaus antioksidanto α-tokoferolio (vitamino E) poveikį galutinio membranos lipidų peroksidacijos produkto malono dialdehido susidarymui.

Praktinė dalis

Įranga ir priemonės:

Centrifuga, centrifuginiai mėgintuvėliai, mėgintuvėliai, stiklinės pipetės, 10-25 μl švirkštai, ependorfiniai mėgintuvėliai, ependorfinė centrifuga, spektrofotometras, spektrofotometrines kiuvetės, verdančio H₂O vonia (traukos spintoje).

Reagentai

0.4 M NaCl + 0.1 M Tris, pH 8.0

0.1 M FeSO₄

0.05 M α-tokoferolio acetatas

0.5% 2-tiobarbitūrinė rūgštis (20% trichloracto rūgštyje).

Darbo eiga

1. 1 g raumenų homogenizuoti trintuvėje arba homogenizatoriumi su 20 ml 0.4 M NaCl + 0.1 M Tris, pH 8.0. Jei naudojate trintuvę stenkitės sutrinti iki vientisos masės.
2. Homogenatas perpilamas į centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojama prie 860 aps/min (200 x g) 5 min prie 4° C.
3. Supernatantą perpilkite į švarų mėgintuvėlį.
4. Paruoškite 4 mėgintuvėlius pagal lentelėje pateiktą schemą:

Mėgintuvėlio Nr.	Homogenatas, ml	0.4 M NaCl + 0.1 M Tris, pH 8.0, ml	Kiti priedai
1	0.5	4.5	-
2	0.5	4.5	50 μl 0.1 M FeSO ₄
3	0.5	4.5	100 μl 0,05 M α-tokoferolio acetato
4	0.5	4.5	50 μl 0,1 M FeSO ₄ ir

			100 µl 0,05 M α-tokoferolio acetato
--	--	--	-------------------------------------

5. Mėgintuvėlius inkubuokite 30 min 37 °C.
6. Po inkubacijos į mėgintuvėlius pridėkite po 1 ml 0.5 % 2-tiobarbitūrinės rūgšties. Gerai sumaišykite. Mėgintuvėlius sandariai uždenkite aliuminio folija ir traukos spintoje kaitinkite verdančio vandens vonioje 30 min.
7. Mėgintuvėlius ataušinkite po šalto vandens srove. Tirpalą perpilkite į ependorfą ir centrifuguokite 5 min, 10000 x g.
8. Supernatantą perpilkite į kiuvetę ir pamatuokite absorbciją prie 532 nm ir 600 nm. Reakcijos su tiobarbitūrine rūgštimi produktai sugeria šviesą prie 532 nm, bet nesugeria prie 600 nm. Matavimas prie 600 nm reikalingas tolesniam skaičiavimui, kadangi norime atsižvelgti į nespecifinę absorbciją.
9. Paskaičiuokite malono dialdehido (MDA) koncentraciją mėginiuose pagal formulę:

$$c_{MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{0.156 \cdot L}$$

kur c_{MDA} – malono dialdehido koncentracija išreikšta µM, A_{532} ir A_{600} absorbcija prie 532 nm ir 600 nm, $0.156 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – malonaldehido molinis ekstinkcijos koeficientas, L – kiuvetės plotis išreikštas cm (paprastai 1 cm).

10. Paskaičiuoti malono dialdehido koncentraciją išreikštą µmol / g raumens audinio. Ar skiriasi malondialdehido koncentracija skirtinguose mėginiuose? Paaiškinkite kodėl.