

## ИЗМЕРЕНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА С ПОМОЩЬЮ MBCL

А.И. Долгих, студент; О.А. Стельмашук, аспирант; Е.А. Жеребцов, к.т.н., с.н.с.  
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орёл  
e-mail: [matoka\\_97@mail.ru](mailto:matoka_97@mail.ru)

*Показано, что измерение уровня восстановленного глутатиона важно для предупреждения развития различных заболеваний, особенно деменций. Представлено описание экспериментальной установки для измерения уровня восстановленного глутатиона методом эндогенной флуоресценции в острых срезах мозга.*

Измерение восстановленного глутатиона важно для предупреждения различных заболеваний, особенно деменций. Согласно Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) с каждым годом количество данных больных в мире значительно увеличивается. Так, в 2015 году насчитывалось более 46 млн. людей с деменцией, а уже в 2020 году наблюдается 50 млн. случаев этого заболевания.

Глутатион является трипептидом ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицином), синтезирующимся в цитозоле в результате двух реакций. Сначала образуется  $\gamma$ -глутамилцистеин, а потом глутатион. Данное вещество накапливается в основном в цитозоле (почти 90%) [1-4, 9, 11].

Глутатион – антиоксидант клетки, который участвует в защите организма от активных форм кислорода (АФК), образующихся в результате деятельности митохондрий при возникновении оксидативного стресса [2, 9]. Нейтрализация происходит путём прямого контакта с АФК или путём активации ферментов биотрансформации (глутатион-пероксидазы и глутатион-трансферазы). Данный процесс крайне необходим для нервной системы, а особенно для мозга, так как именно он наиболее чувствителен к оксидативному стрессу из-за большего потребления кислорода [5, 6]. Кроме того, повышенное образование АФК и понижение уровня восстановленного глутатиона наиболее часто встречается у людей в возрасте, следовательно данный процесс может считаться одной из причин возникновения таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона [1, 9].

Таким образом, измерение уровня глутатиона может предупредить развитие различных заболеваний в связи с тем, что его дефицит или избыток могут вызвать развитие патологических процессов.

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar возраста 12 недель. Эвтаназию проводили путем дислокации шейного отдела позвоночника. Все экспериментальные протоколы соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными, принятыми в Орловском государственном университете имени И.С. Тургенева. После выделения, головной мозг крыс помещали в HBSS. Горизонтальные срезы мозга толщиной 500 мкм нарезали ручным методом. Их хранили до эксперимента в охлаждаемом HBSS с периодическим оксигенированием один раз в 10 минут. Также в раствор был добавлен mBCl, срезы находились в нём в течение 30 минут. Было проведено 6 циклов, в каждом из которых рассматривались 3 точки.

Экспериментальная установка для измерения уровня флуоресценции была собрана в двух вариантах: с лазерным источником BDL-SMN-375 (Becker&Hickl, Германия) для возбуждения флуоресценции на длине волны 375 нм, либо LED M455F1 (Thorlabs etc, США) для возбуждения флуоресценции на длине волны 445 нм. Эксперимент заключался в том, что излучение возбуждения через оптическое волокно проходило через коллиматор и полосовой фильтр (при использовании LED M455F1), далее через светоделительный фильтр-пластинку и объектив направлялось на исследуемую область. Поле зрения камеры на образце составляло прямоугольный участок с площадью порядка 1 мм<sup>2</sup>. В канале флуоресцентной визуализации обратно-отраженное излучение источника проходило через светофильтры и регистрировалось высокочувствительной охлаждаемой CCD-камерой DCC 3260C (Thorlabs etc, США). Таким образом, измерялась флуоресценция только конъюгата mBC1 и глутатиона. Результаты измерения показаны на рисунке 1.

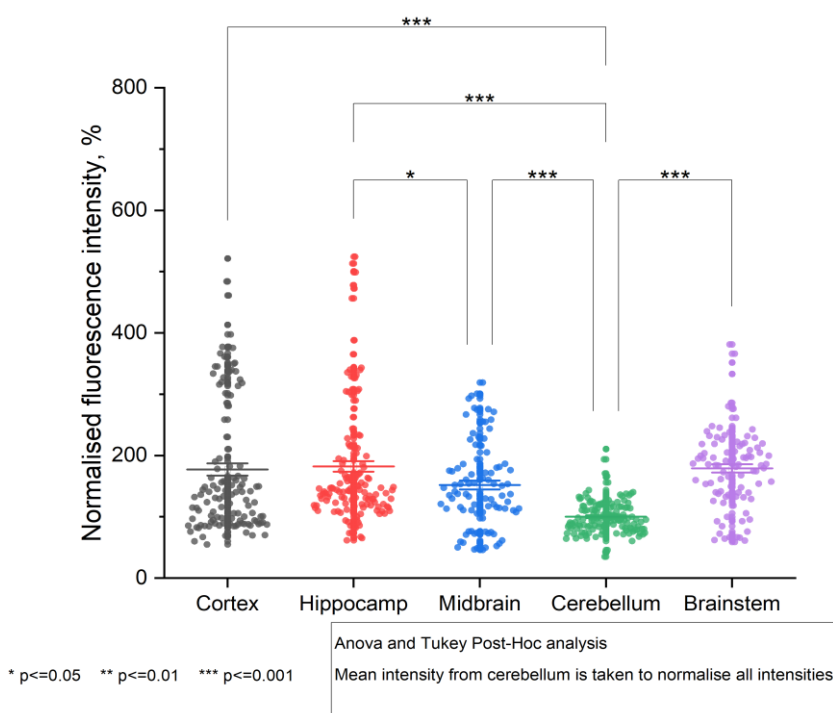
Для вычисления уровня глутатиона в клетке применяют monochlorobimane. Он не обладает собственной флуоресценцией, но легко реагирует с рядом низкомолекулярных тиолов, включая глутатион [3, 5].

Образование конъюгата (B-SG conjugate) катализируется изоферментом глутатион-S-трансферазой (GST) [7, 10]. Он имеет способность к флуоресценции с максимумом поглощения – 394 нм и максимумом эмиссии – 490 нм. Эффективность данной реакции зависит от класса изофермента.

Наиболее сильная реакция с mBC1 и глутатионом наблюдается с  $\mu$ -изоферментами, наименее слабая – с  $\pi$ -изоферментами [8].

Данный метод имеет недостатки. Во-первых, так как образование конъюгата mBC1 и глутатиона является зависимым от GST изофермента, то полного взаимодействия веществ может не произойти. Во-вторых, в клетке могут наблюдаться изменения уровня конъюгата, следовательно измерение нельзя назвать точным [3].

Исследование заключалось в измерении интенсивности флуоресценции, которая прямо пропорциональна уровню восстановленного глутатиона. Наиболее высокое содержание данного эндогенного антиоксиданта наблюдалось в коре и гиппокампе, меньшее количество – в среднем мозге и стволе, наименьший показатель глутатиона был у мозжечка. Из данных результатов можно сделать вывод, что кора и гиппокамп наиболее устойчивы к действию оксидативного стресса по сравнению с другими отделами головного мозга.



**Рис. 1. Сравнительная оценка содержания восстановленного глутатиона в срезах различных отделов мозга с помощью зонда monochlorobimane**

Таким образом, интенсивность флуоресценции может служить основой для сравнительного анализа содержания эндогенного антиоксиданта глутатиона в исследуемых образцах, что позволит контролировать окислительный статус клетки и, следовательно, развитие различных патологических состояний, выражающихся, главным образом, в виде нейродегенеративных заболеваний.

Работа выполнена в рамках проекта «Митохондрии как мишени в механизме нейродегенеративных заболеваний» на основании подписанного соглашения № 075-15-2019-1877 от 03.12.2019 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1 Незнанов, Н.Г. Исследование параметров окислительного стресса при психических нарушениях в позднем возрасте / Н.Г. Незнанов [и др.] // Обзор. – 2013.

2 Смирнов, Л.П. Роль глутатиона в функционировании систем антиоксидантной защиты и биотрансформации (Обзор 2014) / Л.П. Смирнов, И.В. Суховская // Ученые записки Петрозаводского ГУ. Биологические науки, №6 (143). – С. 56-62.

3 Barhoumi, R. Kinetic analysis of glu-tathione in anchored cells with monochlorobimane / R. Barhoumi [et al.] // Cytometry. – 1995. – Vol. 19 (3). – P. 226-234.

4 Engelmann J., Leyhausen G., Leibfritz D., & Geurtsen W. (2002). Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 63(6), 746-751.

5 Hajdinák P., Czobor Á., Lőrincz T. & Szark A. (2019). The problem of glutathione determination: a comparative study on the measurement of glutathione from plant cells. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 63(1), 1-10.

6 Leverve X. (2009). Oxidative stress and antioxidant defense. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 44(5), 219-224.

7 Machado M. D. & Soares E. V. (2012). Assessment of cellular reduced glutathione content in *Pseudokirchneriella subcapitata* using monochlorobimane. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1509-1516.

8 Millis K. K., Lesko S. A. & Gamcsik M. P. (1997). Formation, intracellular distribution and efflux of glutathione-bimane conjugates in drug-sensitive and resistant MCF-7 cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 40(2), 101-111.

9 Munoz L.E., Janko C., Schorn C. & Schett G. (2014). Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. 11(11), 2685-2700.

10 Sagara Y., Dargusch R. [et al.] (1998). Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1375-1389.

11 Sebastià J., Cristòfol R., Martín M., Rodríguez-Farré E. & Sanfeliu C. (2003). Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. *Cytometry Part A*, 51(1), 16-25.

### *Сведения об авторах:*

*Долгих Ангелина Игоревна*, студент I курса группы 91-СТ Медицинского института, г. Орёл.

*Стельмащук Ольга Андреевна*, аспирант кафедры приборостроения, метрологии и сертификации, стажёр-исследователь научно-технологического центра биомедицинской фотоники, г. Орёл.

*Жеребцов Евгений Андреевич*, канд. техн. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии и патологии, г. Орёл.

### *Представляемая организация:*

Медицинский институт ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева»; 302028, г. Орёл, ул. Октябрьская, 25.