

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ ГЕМОГЛОБИН-ПЕРОКСИД ВОДОРОДА-ЛЮМИНОЛ

Ю.О. ТЕСЕЛКИН, И.В. БАБЕНКОВА, О.Б. ЛЮБИЦКИЙ, Г.И. КЛЕБАНОВ,
Ю.А. ВЛАДИМИРОВ

Кафедра биофизики Российского государственного медицинского университета, 117869,
Москва, ул. Островитянова, д. 1

Предложен способ определения антиоксидантной активности (АОА) плазмы крови на основе системы гемоглобин-пероксид водорода-люминол. Способ заключается в определении латентного периода хемилюминесценции модельной системы, который прямо пропорционален объему добавленной плазмы или концентрации стандартного антиоксиданта. В качестве стандарта использовался аскорбат. АОА плазмы крови представляли в виде концентрации эквивалентного раствора аскорбата (аскорбатный эквивалент). Исследовано влияние гемолиза и условий хранения плазмы на измеряемую величину АОА. Изучено изменение АОА плазмы крови человека после однократного приема 2 г аскорбата (доноры), а также ее динамика у больных острым панкреатитом.

Ключевые слова: свободнорадикальное окисление люминола, хемилюминесценция, антиоксиданты плазмы крови, антиоксидантная активность.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что развитие многих патологических состояний организма человека сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления (СРО), которая может привести к свободнорадикальному повреждению клеток и, в конечном итоге, быть причиной их гибели [1]. Защита тканей и органов человека от агрессивного действия свободных радикалов обеспечивается слаженной работой антиоксидантной системы, которая включает в себя внутри- и внеклеточные антиоксиданты. Среди внутриклеточных антиоксидантов прежде всего следует назвать такие антиоксидантные ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза. К внеклеточным антиоксидантам относятся аскорбат, урат, церулоплазмин, трансферрин, белки, содержащие SH-группы, и другие [2]. Существуют антиоксиданты, например, витамин Е, которые входят в состав биологических мембран, а также белок-липидных комплексов, присутствующих в плазме крови [1].

Для оценки состояния антиоксидантной системы человека широко используют определение антиоксидантной активности (АОА) плазмы (сыворотки) крови, которая отражает ее способность тормозить СРО какого-либо субстрата [3]. При этом регистрируемая АОА плазмы крови является, по-видимому, не просто сложением вкладов перечисленных выше антиоксидантов, но и зависит от синергизма между отдельными радикальными ингибиторами [4]. В настоящее время известны различные способы определения АОА плазмы крови [4-8]. Однако на практике далеко не все они могут быть использованы в клинических условиях.

В нашей предыдущей работе [9] было показано, что плазма крови и ее отдельные компоненты тормозят окисление люминола, индуцированное с помощью гемоглобина (Hb) и пероксида водорода (H_2O_2). Указанный подход в инициировании СРО молекулы-мишени обладает рядом преимуществ, поскольку радикалы-инициаторы окисления, в качестве которых рассматривают феррил - радикалы Hb и гидроксильные радикалы, образующиеся

при взаимодействии Hb и H₂O₂, могут составлять один из путей инициирования свободнорадикальных реакций *in vivo* [10].

Целью настоящей работы являлось создание теста для определения АОА плазмы крови на основе системы Hb-H₂O₂-люминол.

МЕТОДИКА. В работе использовали Hb ("Sigma", США), люминол ("Merck", Германия), остальные реактивы были отечественного производства. Все растворы готовили на бидистиллированной воде. Венозную кровь от здоровых доноров (n=11) и больных острым панкреатитом (n=7) мужского пола в возрасте от 25 до 50 лет получали с помощью венопункции утром натощак, используя в качестве антикоагулянта гепарин (20 ЕД/мл). Плазму крови отделяли путем центрифугирования цельной крови в течение 15 мин при 900 g.

Хемилюминесценцию (ХЛ) системы Hb-H₂O₂-люминол регистрировали при 37°C и постоянном перемешивании на хемилюминометре ХЛМ-3 ("Бикап", Москва). Реакционная среда общим объемом 5 мл содержала 0,21 мкМ Hb и 10 мкМ люминола в фосфатном буфере (50 мМ КН₂РO₄, 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4). Инициирование СРО люминола осуществляли введением H₂O₂ (20 мкМ). В качестве измеряемых параметров использовали максимальную интенсивность ХЛ (I₀) и латентный период (t₀), который определяли как время от момента инициирования СРО люминола до начала развития свечения. Добавление к системе Hb-H₂O₂-люминол плазмы крови или стандартного раствора аскорбата (10 мМ), приготовленного на фосфатном буфере в день эксперимента, вызывало уменьшение интенсивности ее ХЛ (I) и увеличение латентного периода (t). Поскольку зависимость изменения латентного периода (t/t₀) от объема добавленной плазмы крови и концентрации аскорбата (С) носит линейный характер [9], то АОА плазмы можно представить в виде концентрации эквивалентного раствора используемого стандарта. Для этого в модельную систему вносили 10-20 мкл плазмы крови, измеряли латентный период и с помощью уравнения $t/t_0 = 2,75C + 1,29$ (r=0,998) для аскорбата, полученного в наших условиях, находили соответствующее значение С. Умножив С на разведение плазмы крови получали ее АОА в мМ аскорбата (аскорбатный эквивалент).

Для выяснения влияния гемолиза в плазме крови на интенсивность и латентный период ХЛ системы Hb-H₂O₂-люминол эритроцитарную массу отделяли от плазмы и трижды промывали физиологическим раствором (1:10). С целью получения гемолизированных эритроцитов к одному объему эритроцитарной массы добавляли девять объемов бидистиллированной воды и тщательно перемешивали. Затем готовили образцы с различной степенью гемолиза, добавляя к 100 мкл плазмы крови от 4 до 50 мкл гемолизата эритроцитов и доводя общий объем фосфатным буфером до 1 мл. Оптические плотности полученных образцов измеряли при 415 и 700 нм. Первая соответствует максимуму поглощения Hb, а вторая обусловлена вкладом светорассеяния. Разность D₄₁₅-D₇₀₀ умножали на 10 и использовали в качестве характеристики степени гемолиза в плазме. В модельную систему вносили 50, 100 и 200 мкл приготовленных образцов, что эквивалентно добавлению 5, 10 и 20 мкл цельной плазмы крови соответственно.

Влияние приема антиоксидантов на уровень АОА плазмы крови человека изучали на примере аскорбата. Для этого здоровые доноры (n=3) принимали перорально натощак 2 г аскорбата, растворенного в дистиллированной воде. Забор крови из пальца в количестве 125 мкл проводили до и после приема аскорбата, используя в качестве антикоагулянта гепарин. Аналогичные эксперименты были выполнены на кроликах породы шиншилла (n=3) массой 2,5 кг при пероральном введении аскорбата в дозе 100 мг/кг веса. Забор крови проводили из ушной вены в объеме 0,4 мл. Для определения АОА в модельную систему вносили 50 мкл плазмы.

АОА плазмы крови каждого из испытуемых определяли по результатам трех отдельных измерений. Результаты представлены как средние величины плюс-минус среднеквадратическое отклонение. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При определении АОА плазмы крови необходимо учитывать влияние таких факторов, как степень гемолиза, а также продолжительность и условия ее хранения. Изучение влияния гемолиза на величину АОА плазмы крови представлялось особенно важным в связи с тем, что наличие его следов в плазме может привести не только к увеличению содержания в ней Hb, но и к повышению уровня антиоксидантных ферментов из разрушенных эритроцитов. Видно (рис. 1а), что с увеличением объема негемолизированной

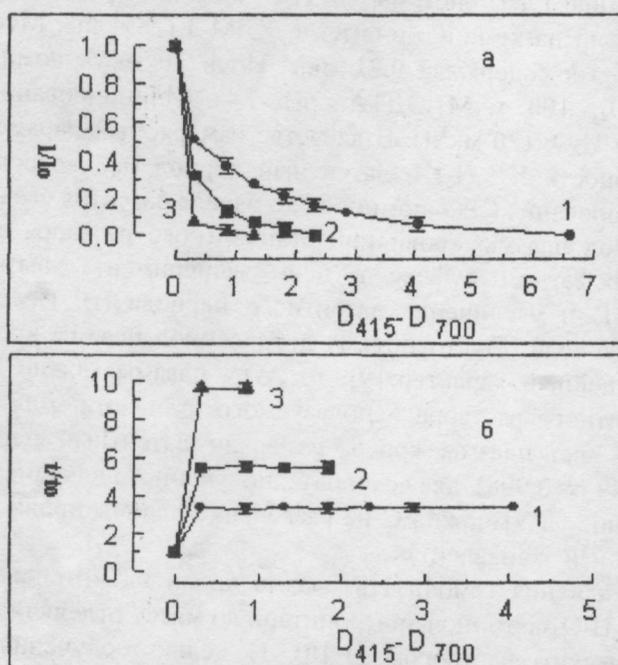


Рисунок 1.

Влияние степени гемолиза в плазме крови на интенсивность ХЛ (а) и латентный период (б) системы Hb-H₂O₂-люминол. По оси абсцисс - оптическая плотность плазмы крови (D₄₁₅-D₇₀₀). 1,2,3 - добавление в модельную систему 5, 10 и 20 мкл плазмы крови соответственно.

плазмы крови (D₄₁₅-D₇₀₀=0,31), добавляемой к системе Hb-H₂O₂-люминол, происходило уменьшение интенсивности ХЛ последней. С повышением степени гемолиза в плазме наблюдаемое уменьшение интенсивности свечения возрастало. При этом, чем большее количество исследуемой плазмы крови вводилось в модельную систему, тем при меньших значениях ее оптической плотности регистрировалось полное ингибирование ХЛ. Например, при добавлении 5 мкл плазмы крови полное ингибирование ХЛ было при D₄₁₅-D₇₀₀ равной 6,60, а в случае 20 мкл эта величина составила 1,31. На рис. 1б показано изменение латентного периода ХЛ системы Hb-H₂O₂-люминол в зависимости от степени гемолиза в плазме крови. Из него следует, что увеличение степени гемолиза в плазме крови не влияет на величину латентного периода при добавлении в модельную систему фиксированного объема плазмы. Полученный результат можно объяснить тем, что антиоксидантные ферменты эритроцитов, присутствующие в плазме, вызывают уменьшение интенсивности

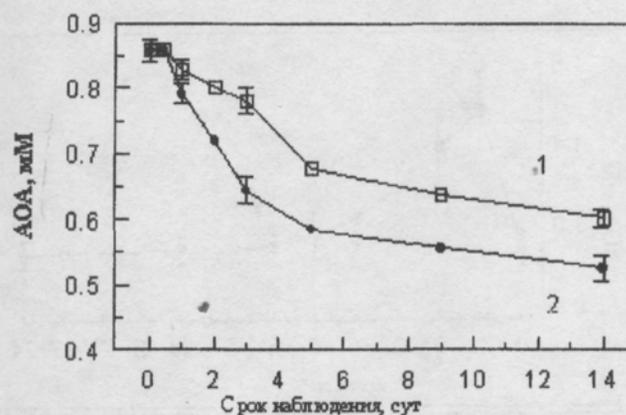


Рисунок 2.

Влияние условий хранения на АОА плазмы крови. 1,2 - хранение при -15°C и $+4^{\circ}\text{C}$ соответственно.

свечения, не влияя на латентный период ХЛ [9]. Таким образом, латентный период является наиболее оптимальным параметром для определения АОА плазмы крови. Исключение составляет наличие сильного гемолиза, когда происходит практически полное ингибирование интенсивности ХЛ, в связи с чем определение латентного периода становится невозможным.

Для выяснения влияния условий хранения плазмы на состояние ее антиоксидантов исследовали АОА плазмы крови трех здоровых доноров, хранившуюся при температуре -15°C и $+4^{\circ}\text{C}$. На рис. 2 показано изменение АОА плазмы одного из них. Обнаружено, что с течением времени АОА плазмы, хранившейся при обоих температурных режимах, уменьшалась. Однако это уменьшение было более выраженным для плазмы крови, хранившейся при $+4^{\circ}\text{C}$, чем в случае ее хранения при -15°C . Так, например, к третьим суткам проведения эксперимента АОА плазмы крови, хранившейся при -15°C , уменьшилась в среднем на 9,2%, тогда как плазмы, хранившейся при $+4^{\circ}\text{C}$ - на 25% соответственно. Значения АОА плазмы крови, хранившейся при -15°C и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 ч с момента забора крови, а также в замороженном состоянии в течение суток, достоверно не отличались от исходного уровня АОА. Аналогичные изменения АОА были обнаружены и при исследовании образцов плазмы крови, взятой у других доноров. Таким образом, из полученных данных следует, что наиболее предпочтительным является хранение плазмы крови при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 ч или при -15°C в течение суток.

В настоящее время большое внимание уделяется возможности коррекции АОА плазмы крови с помощью увеличения поступления в организм человека различных антиоксидантов природного происхождения [11]. Это представляется весьма важным, поскольку приводит к повышению АОА плазмы крови и, следовательно, увеличению ее защиты от повреждающего действия свободных радикалов. Так, например, на рис. 3а показано влияние приема 2 г аскорбата на величину АОА плазмы крови здоровых доноров. Видно, что уже через 1 ч после приема аскорбата величина АОА плазмы повышалась в среднем на 77,3% ($P < 0,01$), постепенно уменьшаясь до исходных значений к четвертому часу. В ходе аналогичного эксперимента было исследовано изменение АОА плазмы крови кролика. Обнаружено (рис. 3б), что при введении кроликам аскорбата в дозе 100 мг/кг веса АОА плазмы крови также увеличивалась, достигая максимальных значений через 2 ч ($P < 0,001$) после его приема, и оставалась неизменной в течение продолжительного времени.

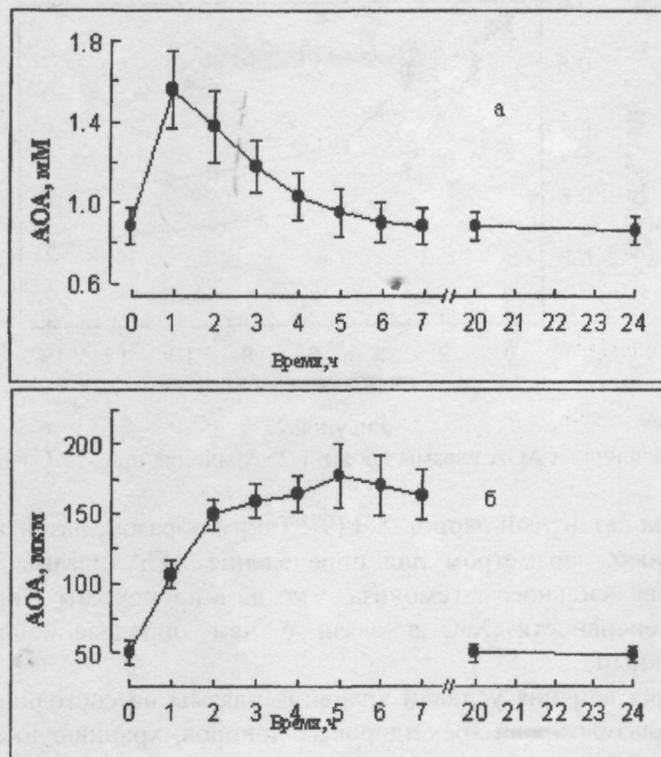


Рисунок 3.

Изменение АОА плазмы крови человека (а) и кролика (б) после однократного перорального приема аскорбата.

Известно, что изменения АОА плазмы крови могут также происходить при различных физиологических состояниях и заболеваниях организма человека [8,12]. В последнем случае определение АОА плазмы крови позволяет не только следить за ее антиоксидантной защитой, но и оценить эффективность проводимой лекарственной терапии [13]. В связи с этим для изучения возможностей предлагаемого теста была исследована АОА плазмы крови у здоровых доноров и больных острым панкреатитом. Уровень АОА плазмы крови у доноров составил $0,92 \pm 0,15$ мМ, в то время как у больных острым панкреатитом в процессе их лечения наблюдалась следующая динамика АОА. В первые сутки с момента поступления больных в стационар уровень АОА плазмы крови составил $1,61 \pm 0,21$ мМ, что в 1,8 раза выше, чем у здоровых доноров ($P < 0,001$). На 3-7 сутки у больных острым панкреатитом отмечалось снижение АОА плазмы крови до нормальных значений. Однако к 14 суткам вновь наблюдалось повышение АОА плазмы крови до уровня первых суток с последующим ее понижением до нормальных значений к 21 суткам лечения. Такая динамика АОА плазмы крови, вероятно, связана с особенностями течения острого панкреатита, а именно с явлениями цитолиза и последующей регенерацией ткани поджелудочной железы в процессе выздоровления [14].

Хотя АОА плазмы крови обусловлена присутствием в ней многих антиоксидантов, их вклад в величину общей АОА плазмы может быть различным в зависимости от того, какие радикалы-инициаторы генерируются в модельной системе и какие молекулы используются в качестве субстрата окисления [4,5,6,7]. Игнорирование этих факторов приводит к искусственному занижению роли одних антиоксидантов и завышению роли

других [3]. В связи с этим следует указать, что предлагаемый способ направлен главным образом на определение активности низкомолекулярных антиоксидантов плазмы крови, поскольку именно эти антиоксиданты вызывают увеличение латентного периода ХЛ при добавлении их к системе Нв-Н₂О₂-люминол. Что касается белковых антиоксидантов, то они в основном оказывают влияние на интенсивность свечения. Однако указанный параметр, во-первых, сильно зависит от степени гемолиза в плазме крови, а, во-вторых, в отличие от латентного периода его изменение от объема добавленной плазмы или концентрации исследуемого вещества является нелинейным [9]. Предлагаемый способ определения АОО плазмы крови имеет некоторое преимущество перед другими аналогичными тестами, в которых в качестве инициатора СРО люминола используется 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) гидрохлорид [6,8]. В отличие от пероксил-радикалов, образующихся при термическом распаде указанного соединения, взаимодействие Нв с Н₂О₂ сопровождается образованием радикалов, принимающих участие в иницировании свободнорадикальных процессов в живом организме [10].

Таким образом, использование системы Нв-Н₂О₂-люминол позволяет изучать АОО плазмы крови в условиях поступления в организм радикальных ингибиторов, а также следить за изменениями антиоксидантного потенциала плазмы в процессе лечения заболеваний, сопровождающихся усилением реакций СРО. Кроме того, предлагаемая система дает возможность тестировать уже известные и апробируемые лекарственные препараты на предмет наличия у них антиоксидантных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Halliwell B.* (1991). *Am. J. Med.* - **91**, Suppl. 3 - 14-22.
2. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Шергин С.М.* (1994). Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты. - Новосибирск, - 203 с.
3. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* (1995). *Free Radic. Biol. Med.* - **18**, 125-126
4. *Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E.* (1995). *Free Radic. Biol. Med.* - **18**, № 1. - P. 29 -36.
5. *Дремина Е.С., Шаров В.С., Владимироа Ю.А.* (1993). *Биофизика.* - **38**, 1047-1052.
6. *Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C., del Castillo M.D.* (1995). *Free Radic. Biol. Med.* - **18**, № 2. - P. 153-158.
7. *Stocks J., Gutteridge J.M.C., Sharp R.J., Dormandy T.L.* (1974). *Clin. Sci. Mol. Med.* - **47** 223-224.
8. *Uotila J.T., Kirkkola A.L., Rorarius M.* (1994). *Free Radic. Biol. Med.* - **16**, 581-590.
9. *Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б. и др.* (1997). *Вопр. мед. химии.* - **43**, 87-93.
10. *Puppo A., Halliwell B.* (1988). *Biochem J.* - **249**, 185-190.
11. *Whitehead T., Robinson D., Allaway S. et al.* (1995). *Clin. Chem.* - **41**, P. 32-35.
12. *Linderman J., van Zoeren-Grobbe D., Schrijver J. et al.* (1989). *Pediatr. Res.* - **26**, 20-24.
13. *Miesel R., Zuber M., Hartung R. et al.* (1995). *Redox Report.* - **1**, 323-330.
14. *Арутюнян В.М., Григорян Р.А.* (1995). *Диагностика и патогенетические основы лечения панкреатита.* - Ереван, "Айастан", 284 с.

THE MEASURING OF BLOOD PLASMA ANTIOXIDANT ACTIVITY BY THE HEMOGLOBIN-HYDROGEN PEROXIDE-LUMINOL SYSTEM

**YU.O. TESELKIN, I.V. BABENKOVA, O.B. LYUBITSKY, G.I. KLEBANOV,
YU.A. VLADIMIROV**

Department of Biophysics, Russian State Medical University,
Ostrovityanova ul. 1, Moscow, 117869, Russia

The method of valuation of the blood plasma antioxidant activity (AOA) by the hemoglobin-hydrogen peroxide-luminol chemiluminescence system has been proposed. The method is based on the measuring the induction time of chemiluminescence that is directly proportional to the added volume of plasma or concentration of standard antioxidant. The ascorbate was taken as a standard. Blood plasma AOA has been expressed through the concentration of equivalent ascorbate solution (ascorbate equivalent). The influence of hemolysis and storage conditions of plasma on its detected AOA was investigated. The change of human blood plasma AOA after single administration of 2 g the ascorbate and its dynamics in patients with acute pancreatitis was studied.

Key words: free radical oxidation of luminol, chemiluminescence, blood plasma antioxidants, antioxidant activity.