

ОЦЕНКА РЕЗЕРВА ЛИПИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ДЛЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ДИНАМИКЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У КРЫС.

Д.И.КУЗЬМЕНКО, Б.И.ЛАПТЕВ

НИИ курортологии и физиотерапии МЗ РФ. 634009, г. Томск,
ул. Р. Люксембург, 1. Телефон: 22-23-11

Разработан и при моделировании токсического (CCl_4) гепатита у крыс апробирован индекс, количественно характеризующий резерв липидов сыворотки для перекисного окисления (индекс РЛПО). Параметр представляет собой отношение концентрации малонового диальдегида (МДА) в сыворотке после стимуляции перекисного окисления ионами Fe^{2+} к исходному уровню МДА в этой же пробе.

Показано, что индекс РЛПО позволяет оценивать направленность и выраженность смещения баланса между действием прооксидантов и суммарной активностью антиоксидантной системы сывороточных липидов даже в случаях, когда отсутствуют сдвиги исходного уровня МДА.

Ключевые слова: окислительный стресс, резерв липидов сыворотки для ПОЛ.

ВВЕДЕНИЕ. Нарушение баланса между интенсивностью действия прооксидантных факторов и мощностью антиоксидантной системы клетки, приводящее к чрезмерной активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) - окислительному стрессу, является патогенетическим фактором для целого ряда заболеваний [1-3].

Методы, позволяющие оценить как собственно активность ПОЛ, так и детально охарактеризовать функциональное состояние ферментативных и неферментативных элементов антирадикальной/антиперекисной защиты биообъектов, часто требуют специального оборудования и дорогостоящих реактивов [4]. При решении ряда исследовательских или диагностических задач достаточно дать лишь интегральную оценку степени окисленности и потенциальной склонности к переокислению липидов объекта исследования. Публикации последних лет свидетельствуют о неослабевающем интересе к разработке надежных и технически доступных методик, позволяющих реализовать такую оценку. Так, предложены: метод определения индекса антиоксидантной активности биологического материала [5], критерий фактора риска пероксидации липидов [6], тест, выявляющий окислительный потенциал липидов крови [7], индекс, характеризующий склонность липидов к ПОЛ [8].

Целью настоящей работы была разработка и апробация на модели токсического гепатита, сопровождающегося выраженной активацией процессов ПОЛ, доступной методики оценки резерва липидов сыворотки для ПОЛ с использованием в качестве прооксиданта ионов Fe^{2+} .

МЕТОДИКА. Эксперименты проведены на крысах Вистар, массой 170 -180 г. Активацию процессов ПОЛ в организме животных инициировали с помощью токсического гепатита [9,10], который вызывали 3-х кратным, с интервалом в 4 суток, подкожным введением крысам 50% масляного раствора CCl_4 из расчета 0,45 мл раствора на 100 г массы тела.

Исследования проводили на 4-й, 8-й, 12-й и 42-й дни после завершения курса введения CCl_4 . При этом на каждый из указанных сроков использовали по 24 животных. Контрольную группу составили 24 интактные крысы. Каждая группа состояла из равного числа самцов и самок.

Об интенсивности процессов ПОЛ судили по содержанию в сыворотке крови крыс малонового диальдегида (МДА), определявшегося по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК) в модификации [11].

Аутоокисление сыворотки крови интактных крыс *in vitro* в "мягком" режиме осуществляли, выдерживая ее образцы в условиях контакта с кислородом воздуха в течение 23 часов при температурах $+15^\circ$ $+37^\circ\text{C}$.

В пробах сыворотки крови животных определяли исходный (базальный) уровень МДА (1) и после её окисления в присутствии Fe^{2+} (2), а также вычисляли индекс (3), количественно характеризующий резерв липидов сыворотки для перекисного окисления (индекс РЛПО), по формуле:

$$\frac{([\text{МДА}] \text{ после } \text{Fe}^{2+} \text{-окисл.}) - ([\text{МДА}] \text{ после спонт. окисл.})}{[\text{МДА}] \text{ исх.}}$$

Для определения исходного уровня МДА к 0,15 мл сыворотки добавляли 1,5 мл 1% раствора фосфорной кислоты и 0,5 мл 0,6 % раствора 2-ТБК. Полученную смесь помещали в кипящую водяную баню на 45 мин. После охлаждения проб цветной комплекс в течение 2 мин экстрагировали в 2,0 мл н-бутанола. Оптическую плотность окрашенного бутанолового экстракта определяли при 535 нм против контроля, где сыворотка была заменена 0,15 мл 0,9% раствора NaCl . Концентрацию МДА в пробе после окисления, стимулированного ионами Fe^{2+} , определяли следующим образом. К 0,15 мл сыворотки добавляли 0,05 мл водного раствора FeSO_4 различной концентрации (см. ниже), готовившегося *ex tempore*. Смесь инкубировали 30 мин в водяном термостате при 37°C при постоянном перемешивании. По истечении этого времени из смеси отбирали аликвоту в 0,15 мл и реакцию останавливали добавлением к ней 1,5 мл 1% фосфорной кислоты.

Содержание МДА в пробе после ее спонтанного окисления (в отсутствие ионов Fe^{2+}) определяли после добавления к 0,15 мл сыворотки 0,05 мл 0,9% раствора NaCl . Смесь инкубировали, останавливали реакцию и проводили определение МДА как указано выше. Прирост МДА в этих условиях за период инкубации не превышал 8-10% от исходного уровня в этой же пробе.

Содержание МДА выражали в: мкмоль/л/г общих липидов (ОЛ) сыворотки, которые определяли с помощью наборов реактивов фирмы "Лахе-ма" (Чехия). Для оценки функционального состояния печени в сыворотке крови крыс определяли активность трансаминаз (АсАТ и АлАТ) и концентрацию общего билирубина (ОБР) с помощью наборов реактивов этой же фирмы.

Эффективность процессов репаративной регенерации оценивали на основе всех вышеупомянутых биохимических показателей. Ее выражали в виде критерия (в %), учитывающего степень нормализации каждого из показателей, достоверно измененных патологическим процессом, по сравнению с контрольными значениями, принятыми за 100%. Эффективность репаративной регенерации была тем выше, чем больше величина критерия приближалась к 100%.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента, а также линейного корреляционного анализа (пакет компьютерных программ "Statgraphics").

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Первоначально для оценки резерва липидов сыворотки крови была определена оптимальная концентрация FeSO_4 . По нашим данным, что максимальное образование МДА в сыворотке за период инкубации наблюдали при конечной концентрации FeSO_4 , равной 10 мМ. В этих условиях накопление МДА было пропорционально длительности инкубации на

протяжение 60 мин (рис. 1.Б.). 10 мМ конечной концентрации Fe^{2+} соответствовало отношение - 3,7 мг FeSO_4 /мл сыворотки в инкубационной смеси. Эта величина была меньше, чем таковые в работах [6] - 6,95 мг/мл и [12], где описана методика регистрации хемилюминесценции сыворотки - 13,9 или 27,8 мг/мл (для рекомендуемых объемов сыворотки - 0,5 или 1,0 мл соответственно). Известно, что ионы Fe^{2+} , в зависимости от своей концентрации, могут оказывать как про-, так и антиоксидантный эффект [1,13,14]. Стимуляция же ПОЛ происходит в пределах узкого диапазона "критических" концентраций ионов Fe^{2+} . При этом окисление Fe^{2+} происходит в двух реакциях: разложения гидроперекисей и при взаимодействии Fe^{2+} с алкоксильными радикалами [13]. Кроме этого, активации перехода: $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ способствуют и такие факторы, как потенциальная способность конкретного биоматериала окислять Fe^{2+} и присутствие в среде инкубации ряда химических соединений и, прежде всего, орто- и пиродифосфатов [12,13,15,16]. В работах [6,12] стимуляция реакций ПОЛ в сыворотке ионами Fe^{2+} происходит в среде фосфатных буферов, с концентрациями K_2HPO_4 20 и 40 мМ соответственно.

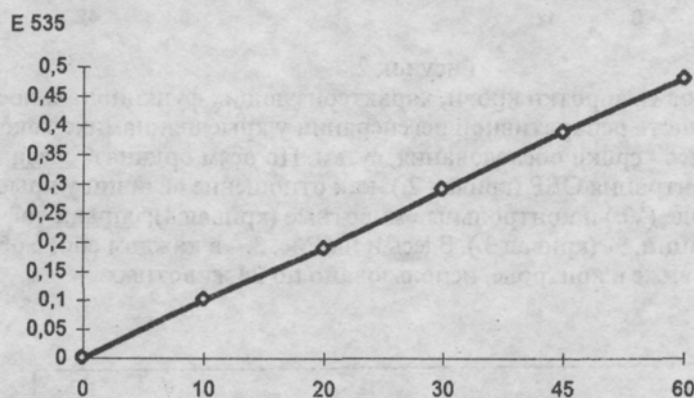


Рисунок 1

Образование МДА в сыворотке крови интактных крыс в зависимости от времени инкубации в присутствии 10 мМ FeSO_4 . По оси абсцисс - время инкубации, мин. По оси ординат - экстинкция при 535 нм. На рисунке представлены результаты 8 экспериментов.

Дальнейшие измерения были проведены при этой конечной концентрации FeSO_4 , равная 10 мМ.

В опытах с токсическим гепатитом показано, что по мере снижения выраженности патологических сдвигов в организме (рис. 2), величины предложенных параметров (1-3), характеризующих активность процессов ПОЛ (рис. 3), закономерно изменялись. Корреляционные связи между параметрами 1-3 и показателями, отражающими динамику функционального состояния ткани печени, представлены в таблице. Максимально высокие и статистически достоверные корреляции, носящие отрицательный характер, выявлены между: параметрами 1 и 3, а также между параметром 3 и активностью АлАТ. Положительные корреляции - между параметром 1 и активностью АлАТ, а также параметром 3 и эффективностью репаративных процессов.

Корреляционный анализ свидетельствует о том, что наиболее информативными оказались параметр 1 и параметр 3 (индекс РЛПО). Величина последнего определяется в основном отношением параметра 2 к параметру 1, поскольку прирост МДА в сыворотке при ее спонтанном окислении не существен. Изменения параметров 1 и 3 по мере увеличения степени нормализации функций печени носит реципрокный характер (рис. 2 и 3).

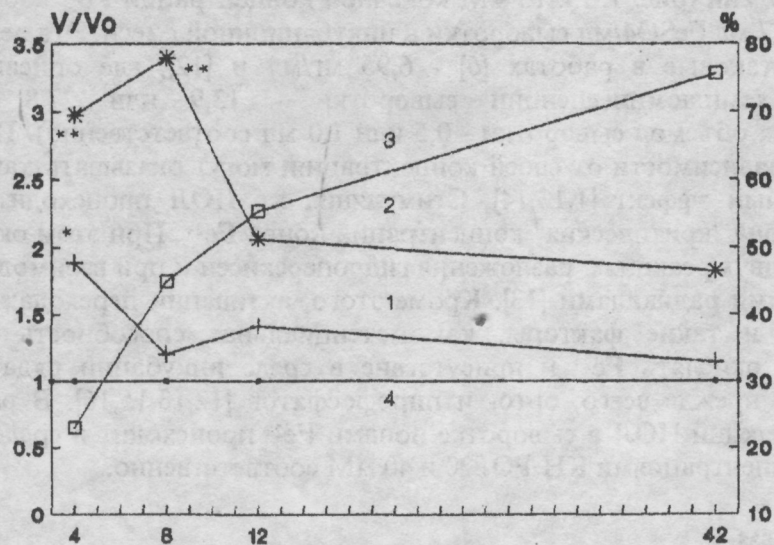


Рисунок 2.

Изменения параметров сыворотки крови, характеризующих функциональное состояние печени и эффективность репаративной регенерации у крыс в динамике токсического гепатита. По оси абсцисс - сроки обследования, сутки. По осям ординат: слева - активность АлАТ (кривая 1), концентрация ОБР (кривая 2.) - как отношение величин у крыс с гепатитом (V) к таковым в контроле (Vo) и контрольные животные (кривая 4); справа - эффективность репаративной регенерации, % (кривая 3.). Здесь и на Рис. 3. - в каждом сроке обследования, а также в контроле, использовано по 24 животных.

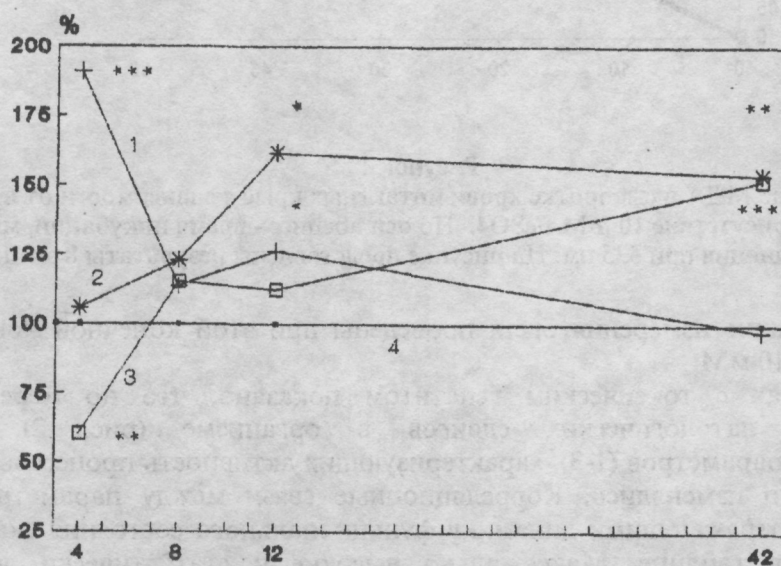


Рисунок 3.

Изменения параметров 1, 2 и 3 (индекс РЛПО) в сыворотке крови крыс в динамике токсического гепатита. По оси абсцисс - сроки обследования, сутки. По оси ординат - величина параметров в % от контроля (интактные крысы, у которых значения каждого из параметров приняты за 100 %). Кривые 1, 2, 3 и 4 - параметры 1, 2, 3 и контроль, соответственно. Значения параметров в контроле: 1 - $1,883 \pm 0,173$ мкмоль МДА /л/г ОЛ; 2 - $11,969 \pm 1,152$ мкмоль МДА /л/г ОЛ и 3 (индекс РЛПО.) $6,468 \pm 0,570$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - достоверные изменения по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что параметр 3 отражает потенциальный резерв липидов сыворотки для перекисного окисления. Этот резерв (величина индекса РЛПО) тем меньше, чем в большей степени активированы процессы ПОЛ в условиях патологического процесса. При нормализации состояния организма и протекания процессов ПОЛ величина резерва (индекса РЛПО) достоверно возрастала.

Таблица. Корреляционные взаимоотношения между динамикой биохимических показателей сыворотки крови крыс с токсическим гепатитом ($\pm r$).

	Парам 1.	Парам 2	Парам 3	АлАТ	ОБР
Параметр 1	1,0				
Параметр 2	-0,72				
Параметр 3	-0,97 ($p<0<05$)	0,76	1,0		
АлАТ	0,99 ($p<0<01$)	-0,72	-0,94 ($p<0,05$)	1,0	
ОБР	0,409	-0,84	-0,58	0,29	1,0
ЭРП	-0,89	0,86	0,97 ($p<0,05$)	-0,84	-0,76

Примечание: АлАТ и ОБР - динамики активности трансаминазы и концентрации общего билирубина, соответственно. ЭРП - динамика эффективности репаративных процессов.

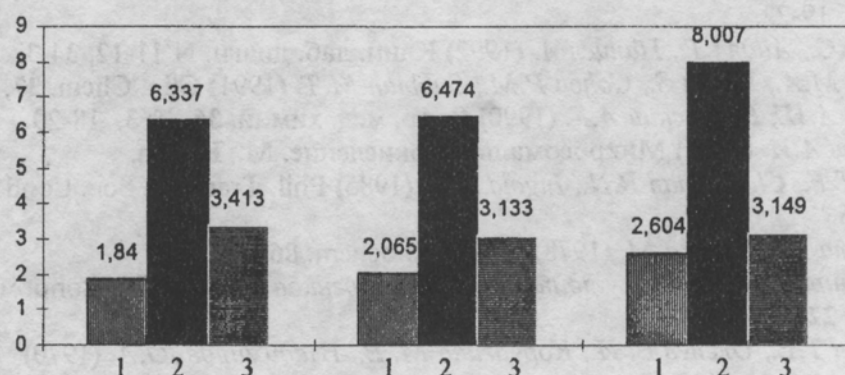


Рисунок 4.

Изменения параметров 1, 2 и 3 (индекс РЛПО) при "мягких" условиях окисления образцов сыворотки крови интактных крыс. По оси абсцисс - условия окисления: А - свежезолированная сыворотка; Б - сыворотка, окисленная в течение 23 часов при +15° С; В - сыворотка, окисленная в течение 23 часов при +37° С. 1,2 и 3-параметры 1,2 и 3 соответственно. По оси ординат - значения параметров 1 и 2 в-мкмоль МДА /л/г ОЛ (слева) и параметра 3 (справа). * $p<0,05$ - достоверные изменения параметра 2 по сравнению с параметром 1 внутри своей группы. Представлены результаты 8 экспериментов.

В "мягком" режиме окисления сыворотки интактных крыс *in vitro* (рис. 4), по мере создания все более благоприятных условий для этого процесса, при подъеме температуры (подтверждается приростом исходного уровня МДА), параметры 1, 2 и 3 менялись с той же направленностью, как и в опытах *in vivo* (рис. 3). При этом, изменения параметров были не достоверны по сравнению с контролем (свежезолированная, неокисленная сыворотка). Поскольку сыворотка интактных крыс изначально имела нормальный уровень активности процессов ПОЛ, полноценную систему антиоксидантной защиты, это, по-видимому, не позволило проактивировать в ней перекисное окисление при "мягком" режиме действия проокислительных факторов настолько, чтобы получить существенные изменения параметров 1 - 3.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что показатель 3 (индекс резерва липидов сыворотки для перекисного

окисления) адекватно отражает состояние такого важного аспекта липидного обмена, каким являются процессы ПОЛ. В случаях, когда сдвиги исходного уровня МДА в анализируемой сыворотке отсутствуют, динамика величины указанного показателя позволяет выявить направленность и выраженность смещения баланса между действием проокислительных факторов и суммарной активностью антиоксидантной системы. Разработанная методика технически доступна и позволяет более оперативно анализировать состояние организма по сравнению с рядом известных методов [6-8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука. 252
2. Sies H. *Angew. (1986) Chem. Int. Ed. Engl.* 25. 1058-1071.
3. McCord J.M. *Clin. Biochem.* (1993) 26. 351-357.
4. Казан В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. (1986) Проблемы анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. М., Итоги науки и техники, ВИНТИ, Сер. биофизика. 18.
5. Мартынюк В.Б., Ковальчук С.Н., Тымочко М.Ф., Пансюк Е.Н. (1991) Лаб. дело. 3. 19-22.
6. Чевари С., Андял Т., Панцел А. (1992) Клин. лаб. диагн. N 11-12, 34-37.
7. Arshad M.A., Bhara S., Cohen P.M., Subbiah M.T. (1991) *Clin. Chem.* 37, 1756-1758.
8. Децина А.И., Багинский А.Г. (1990) *Вопр. мед. химии*, 36, № 3, 18-20.
9. Арчаков А.И. (1975) Микросомальное окисление. М., Наука.
10. Slater T.F., Cheeseman R.N., Ingold K.U. (1985) *Phil. Trans. R. Soc. London.* 311. 633-645.
11. Ushijima M., Mihara M. (1978) *Analyt. Biochem.* 86, 271-278.
12. Владимиров Ю.А., Фархутдинов Р.Р., Молоденков М.Н. (1976) *Вопр. мед. химии*. 22, (2), 216-223.
13. Суслова Т.Е., Оленев В.И., Корчагина М.В., Владимиров Ю.А. (1970) *Биофизика*. 15, 622-631.
14. Владимиров Ю.А., Суслова Т.Б., Оленев В.И. (1976) Митохондрии: транспорт электронов и преобразование энергии. /Под ред. С.Е.Северина. М., Наука. 109-125.
15. Дремина Е.Г., Шаров В.С. (1995) *Биофизика*. 40, 335-341.
16. Погосян Г.А., Дремина Е.Г., Шаров В.С. и др. (1996) *Биофизика*. 41, 342-347.

Поступила 20.08. 1997 г.

EVALUATION OF SERUM LIPIDS RESERVE FOR PEROXIDATION IN RATS DURING OXIDATIVE STRESS.

D. I. KUZMENKO, B. I. LAPTEV

Institute of Health Research and Physiotherapy R. Luxembourg Street, 1
Tomsk-9, 634009

The index quantitatively characterizing the serum lipids reserve for peroxidation (SLRP) was developed and evaluated in rats with simulated toxic (CCl₄) hepatitis. The index represents a ratio of malondialdehyde (MDA) concentrations in serum before and after stimulation of peroxidation by Fe²⁺ ions (in the same sample). The index SLRP allows to evaluate direction and the intensity of imbalance among prooxidants action and the total activity of serum lipids antioxidant system even when there is no change of MDA basal level.

Key words: oxidative stress, serum lipids reserve for peroxidation.