

© Коллектив авторов
УДК 517.616

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ Cu^{2+} -ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ И СЫВОРОТКИ КРОВИ

А.П.Савченкова¹, Л.Б.Дудник², Н.П.Соловьева², О.А.Азизова²

¹Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эмануэля
117977 Москва, ул.Косыгина, д.4;

тел. 939-71-59, факс 7(095)137-41-01, эл.почта: lbd@sky.chph.ras.ru

²Научно-исследовательский институт физико-химической медицины МЗ РФ
119828 Москва, ул. М. Пироговская, д.1.

Определение интенсивности Cu^{2+} -индуцированного окисления липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) широко применяется для решения прикладных и исследовательских задач. Несмотря на это, механизм Cu^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) изучен не полностью. Существенное влияние на ПОЛ оказывают факторы, которые содержатся в плазме и сыворотке крови и теряются при выделении ЛПНП. Целью работы явилось определение концентрационных и временных характеристик Cu^{2+} -индуцированного окисления нефракционированных плазмы и сыворотки крови. Показано, что кинетические кривые накопления малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов и диенкетонов имеют схожий вид S-образных кривых, но существенно различаются по ряду количественных показателей: периоду индукции, времени достижения и уровню максимальной скорости, а также времени достижения максимального количества и количеству образовавшихся продуктов окисления. При образовании продуктов окисления в неразбавленной плазме наблюдался индукционный период, равный для диеновых конъюгатов и диенкетонов 2-2,5 часам, а для МДА - 11-12 часам. При разбавлениях плазмы в 10 раз и выше период индукции на кинетических кривых отсутствовал для всех исследованных продуктов ПОЛ. Скорость накопления и количество образовавшихся продуктов окисления уменьшается в ряду: диеновые конъюгаты > диенкетоны > МДА. Фактор выбора плазмы или сыворотки крови и их разбавления оказывает существенное влияние на результаты определения интенсивности Cu^{2+} -индуцированного ПОЛ. Антикоагулянт цитрат натрия, входящий в состав плазмы, обладает ингибирующим действием на ПОЛ. Разбавление плазмы и сыворотки усиливает процесс ПОЛ за счет снижения влияния водорастворимых антиоксидантов, а действие жирорастворимых антиоксидантов, растворенных в липидной фазе липопротеиновых частиц, при разбавлении меняется мало. Окисление нефракционированных сыворотки и плазмы позволяет учитывать роль входящих в ее состав веществ, влияющих на протекание свободнорадикальных реакций в липопротеинах.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, диеновые конъюгаты, диенкетоны, малоновый диальдегид, Cu^{2+} -индуцированное окисление, плазма и сыворотка крови.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ) играет ведущую роль в патогенезе ряда заболеваний, в том числе болезней сердца и сосудов [1-3], а антиоксиданты, снижающие содержание продуктов ПОЛ, являются существенным фактором терапии. В связи с этим для решения диагностических, терапевтических и исследовательских задач в медицине широко применяют определение интенсивности ПОЛ в биологических

средах организма (чаще всего в плазме или сыворотке крови).

Интенсивность ПОЛ в клиничко-биохимических исследованиях определяют по первичным продуктам окисления (диеновым конъюгатам и гидропероксидам липидов) или по продуктам глубокого окисления (среди которых наиболее распространенным является МДА) [4-7]. При этом количество первичных продуктов ПОЛ зависит от соотношения скоростей их образования и распада. Реакция же на МДА малоспецифична, содержание МДА в крови весьма незначительно [8]. Для преодоления этих недостатков в последнее время стали применять определение потенциальной способности липидов к перекисному окислению *in vitro*, так называемую окисляемость или окислительную устойчивость. В качестве инициатора процесса ПОЛ при этом обычно служат соли металлов переменной валентности, чаще всего соли меди. Механизм индуцирования ионами меди процесса плазмы крови до конца не изучен, однако методами ЭПР, атомной спектроскопии и полярографии показано, что ионы меди связываются с молекулами липопротеинов крови [9-11].

Поскольку нарушения липидного обмена, играющие ключевую роль в развитии атеросклероза, выражены в накоплении в крови и стенках сосудов больных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), накоплен большой экспериментальный материал, посвященный индуцированному *in vitro* Cu^{2+} окислению этой липопротеиновой фракции [2, 12-15]. Изучается взаимосвязь между окисляемостью ЛПНП и степенью тяжести атеросклероза. Односторонность такого подхода, на наш взгляд, не вызывает сомнений. Показано что основным носителем гидропероксидов липидов в крови являются липопротеины высокой плотности (ЛПВП) [16]. Имеются данные об особой роли окисленных ЛПВП в генезе спазмов коронарных артерий [17]. ЛПВП содержат мало липидов (45-55%) по сравнению с остальными липопротеиновыми фракциями, но эти липиды представлены в основном легкоокисляемыми фосфолипидами и эфирами холестерина с ненасыщенными жирными кислотами. Количество жирорастворимых антиоксидантов в этой фракции липопротеинов также ниже, чем в ЛПНП [2, 16]. В липопротеинах очень низкой плотности (ЛПОНП) содержание липидов достигает 85-90%, а хиломикроны имеют в своем составе 98-99% липидов. Липопротеины не являются пассивными липид-белковыми комплексами, а обмениваются своими компонентами друг с другом и с клетками организма, что и обеспечивает их основную функцию - транспорт липидов. Таким образом, в окислении липидов крови нельзя пренебречь вкладом ни одной из липопротеиновых фракций. Необходимо учитывать и длительность процесса выделения фракции ЛПНП, в течение чего они могут подвергаться окислительным изменениям.

Существенное влияние на ПОЛ оказывают факторы, которые содержатся в плазме и сыворотке крови и теряются при выделении ЛПНП. К их числу относятся: ферменты, ответственные за образование и гибель активных форм кислорода и свободных радикалов, или участвующие в разложении пероксидов; системы, регулирующие обмен липидов; водо- и жирорастворимые антиоксиданты (аскорбат, токоферол, стероидные и тиреоидные гормоны, ураты, билирубин и др.). Окисление всей плазмы позволяет учитывать роль перечисленных факторов и в большей степени приблизиться к условиям *in vivo*.

В последнее время появились работы, посвященные изучению способности к окислению нефракционированной плазмы или сыворотки [18,19]. Вместе с тем необходимо отметить, что механизм окисления липопротеинов в столь многокомпонентных системах изучен недостаточно. Так в исследованиях используются разные разбавления плазмы и сыворотки (от неразбавленных до разбавленных в 250 раз). Между тем, при использовании высоких степеней разбавления содержание водорастворимых антиоксидантов в исследуемом объекте стремится к нулевым значениям, тогда как действие жирорастворимых компонентов, находящихся в ядре липопротеиновой частицы, по-видимому, мало

КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

изменяется. При получении плазмы крови в качестве антикоагулянта используется цитрат натрия, который из-за его способности образовывать комплексные соединения с ионами металлов может влиять на интенсивность Cu^{2+} -индуцированного ПОЛ. То есть результаты определения интенсивности ПОЛ в плазме и сыворотке крови могут различаться между собой.

Целью настоящей работы явилось определение концентрационных и временных характеристик Cu^{2+} -индуцированного окисления плазмы и сыворотки крови.

МЕТОДИКА. В работе были использованы реактивы фирм "Sigma" (США) или "Merck" (Германия) квалификации чда. Для исследования ПОЛ использовали взятую натощак сыворотку и плазму крови молодых (20-35 лет), практически здоровых доноров. В качестве антикоагулянта для получения плазмы применяли наиболее часто применяемый в клинике цитрат натрия. Плазма и сыворотка подвергались Cu^{2+} -индуцированному окислению в день забора крови у доноров. Для определения влияния цитрата на параметры ПОЛ в сыворотку добавляли цитратный буферный раствор как при добавлении к крови с целью получения плазмы. Плазму и сыворотку разбавляли буферным раствором, в состав которого входили 150 мМ NaCl и 10 мМ NaH_2PO_4 , pH 7,4. В качестве инициатора окисления использовали водный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (конечная концентрация в образцах составляла 1 мкМ). За интенсивностью процесса следили по содержанию в пробах диеновых конъюгатов, диенкетонов и МДА.

Диеновые конъюгаты и диенкетоны определяли в липидах, полученных экстрагированием сыворотки и плазмы смесью хлороформа и метанола по Фолчу [20]. Светопоглощение измеряли после растворения липидов метанол-гексановой смесью в отношении 1:5 при 233 нм для диеновых конъюгатов и 270 нм для диенкетонов. Коэффициенты молярной экстинкции для диеновых конъюгатов и диенкетонов соответственно равны $2,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [21].

Количество МДА исследовали по его реакции с 2-тиобарбигуровой кислотой (ТБК-активные продукты) при $\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ нм}$, считая коэффициент молярной экстинкции для продуктов реакции ТБК с альдегидными группами, равным $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [22,23].

Концентрацию продуктов ПОЛ выражали в пересчете на 1 мл неразбавленной плазмы или сыворотки или на 1 мг липидов.

Обработка результатов выполнена методами вариационной статистики, различие между показателями считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. В таблице 1 представлены результаты, полученные при спонтанном (в отсутствие Cu^{2+}) окислении плазмы и сыворотки. Для неразбавленных сыворотки и плазмы содержание МДА после окисления равнялось 3,2 нмоль/мл, что практически совпадает с результатами, полученными для исходных объектов. При увеличении степени разбавления скорость спонтанного окисления возрастала.

Типичные кривые зависимости количества образовавшихся продуктов ПОЛ от времени Cu^{2+} -индуцированного окисления для различных разбавлений плазмы одного из доноров представлены на рисунке 1. Закономерности, наблюдаемые в представленном примере, были характерными как для плазмы, так и для сыворотки всех исследуемых доноров. Индивидуальные различия носили количественный, а не качественный характер (см. табл. 2 и 3). Кинетические кривые накопления МДА, диеновых конъюгатов и диенкетонов при окислении липидов имели схожий вид, но существенно различались по ряду количественных показателей - периоду индукции, времени достижения и уровню максимальной скорости, а также времени достижения максимального количества и количеству образовавшихся продуктов окисления. Аналогичные кинетические кривые накопления диеновых конъюгатов и МДА при Cu^{2+} -индуцированном окислении изолированных ЛПНП были получены рядом исследователей [12-15]. С увеличением степени разбавления плазмы до определенного уровня скорость образования и количество продуктов ПОЛ возрастали. Дальнейшее разбавление не

Таблица 1. Изменение содержания продуктов ПОЛ при спонтанном окислении плазмы и сыворотки.

Объект окисления	Разбавление	МДА, нмоль/мл сыворотки или плазмы	
		Исходное состояние	После 24ч инкубации
Сыворотка	Без разбавления	3,20±0,47	3,76±0,42
	X5		5,33±0,85
	X10		6,86±1,02
	X20		9,04±0,81
	X40		9,33±1,11
Плазма	Без разбавления	3,16±0,42	3,23±0,42
	X5		4,47±0,90
	X10		6,08±0,85
	X20		8,56±0,83
	X40		8,41±0,91

Примечание: Представлены средние значения (\pm ошибка средней) для шести исследованных проб.

приводило к существенным изменениям. Содержание продуктов ПОЛ возрастало с увеличением времени окисления и достигало стационарного уровня в интервале 7-24 часа. Время достижения этого уровня различалось для разных разбавлений плазмы и разных продуктов окисления. Увеличение времени инкубации проб с ионами меди до 48 часов не приводило к существенным изменениям. Такая закономерность свидетельствует о том, что в интервале времени окисления 24-48 часов исследованные продукты ПОЛ стабильны или скорость их образования равна скорости распада. Стабильность МДА может быть обусловлена тем, что он является продуктом достаточно глубокого окисления, об относительной устойчивости диеновых конъюгатов, свидетельствуют данные работы [16].

При образовании продуктов окисления в неразбавленной плазме наблюдался индукционный период, равный для диеновых конъюгатов и диенкетонов 2-2,5 часам, а для МДА - 11-12 часам (см. рис.1 и 2). Такое различие периодов индукции может свидетельствовать о том, что антиоксиданты, содержащиеся в плазме, оказывают ингибирующее действие не только на стадии образования первичных продуктов ПОЛ, но и на стадии продолжения и разветвления цепей окисления. При разбавлении плазмы в 5 раз на кривых накопления диеновых конъюгатов и диенкетонов период индукции исчезал, а для МДА он снижался до 6-7 часов. При разбавлениях плазмы в 10 раз и выше период индукции на кинетических кривых отсутствовал для всех исследованных продуктов ПОЛ. Максимальная скорость накопления продуктов ПОЛ (см.рис.2), вычисленная как производная первого порядка по времени изменения их количества ($dC_{\text{прод ПОЛ}}/dt$), также существенно зависела от разбавления. Для диеновых конъюгатов и диенкетонов при 20-кратном разбавлении плазмы она возрастала в 16 раз, для МДА - в 7 раз. Дальнейшее увеличение разбавления не приводило к увеличению скорости окисления. Время достижения максимального содержания диеновых конъюгатов при окислении неразбавленной плазмы составляло 10-12 часов, разбавленной в 20 раз - 4-5 часов. Для диенкетонов оно составило 10-12 часов, а для МДА - 23-24 часа и не зависело от степени разбавления. Количество накопленных продуктов ПОЛ также увеличивалось с возрастанием степени разбавления. Начальные участки кривых накопления продуктов ПОЛ удовлетворительно аппроксимируются кинетическим уравнением первого порядка, о чем свидетельствует их спрямление в полулогарифмических координатах (рис.3). Кинетические константы, вычисленные из этих графиков, представлены в таблице 2. Сравнение этих констант показывает, что в неразбавленной плазме диеновые конъюгаты накапливаются в 40 раз медленнее, чем в разбавленной в 20 раз, а диенкетоны и МДА - примерно в 20 раз. Скорость накопления образовавшихся продуктов окисления для каждого разбавления уменьшается в ряду: диеновые конъюгаты >

КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

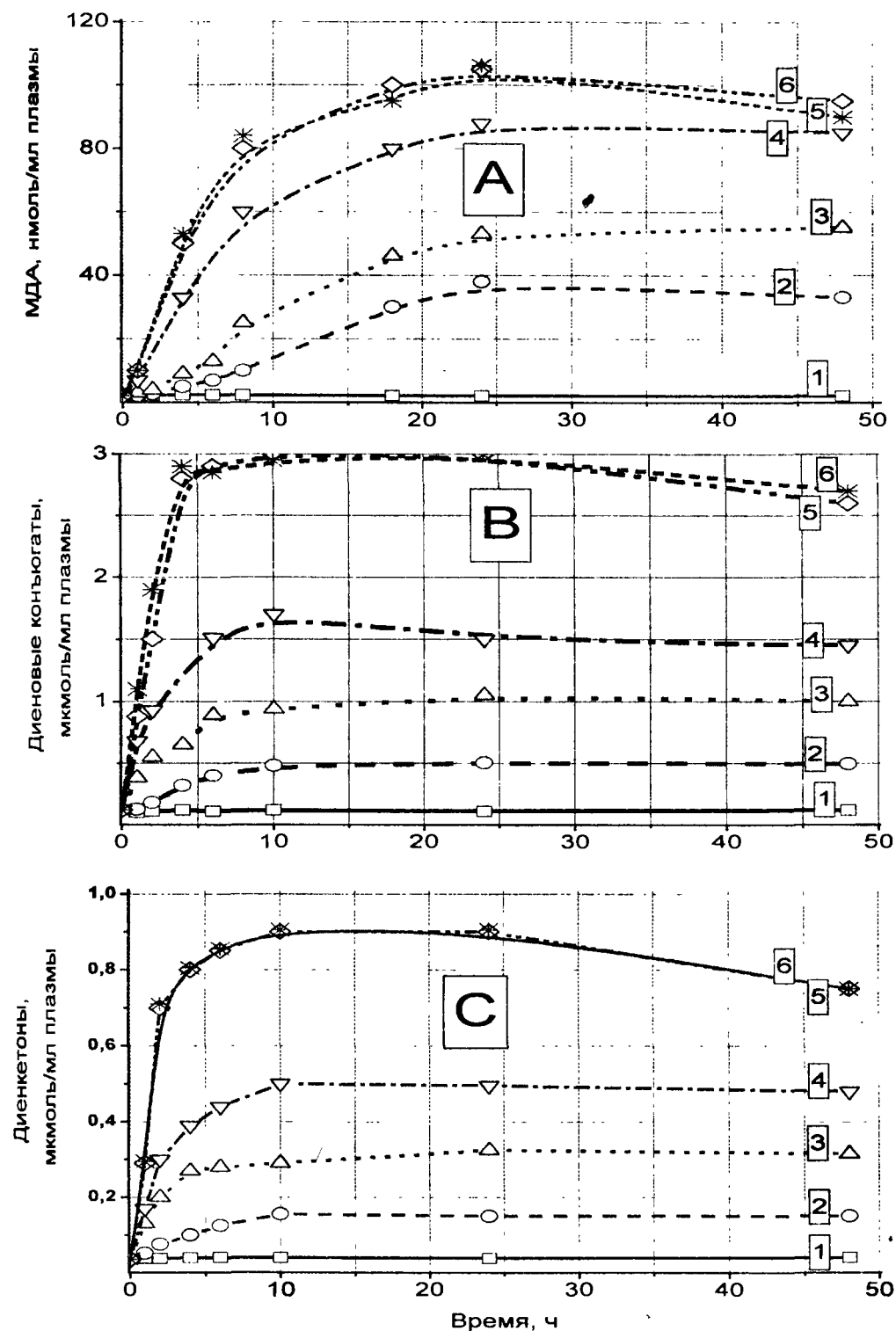


Рисунок 1.

Динамика накопления продуктов ПОЛ (А - МДА (нмоль/мл плазмы), В - диеновые конъюгаты (мкмоль/мл плазмы), С - диенкетоны (мкмоль/мл плазмы)) при спонтанном окислении и Cu^{2+} -индуцированном окислении плазмы для различных разбавлений. 1 - спонтанное окисление неразбавленной плазмы; кривые 2-6 - Cu^{2+} -индуцированное окисление плазмы: 2-неразбавленная плазма, 3 - 5-кратное, 4 - 10-кратное, 5 - 20-кратное, 6 - 40-кратное разбавление.

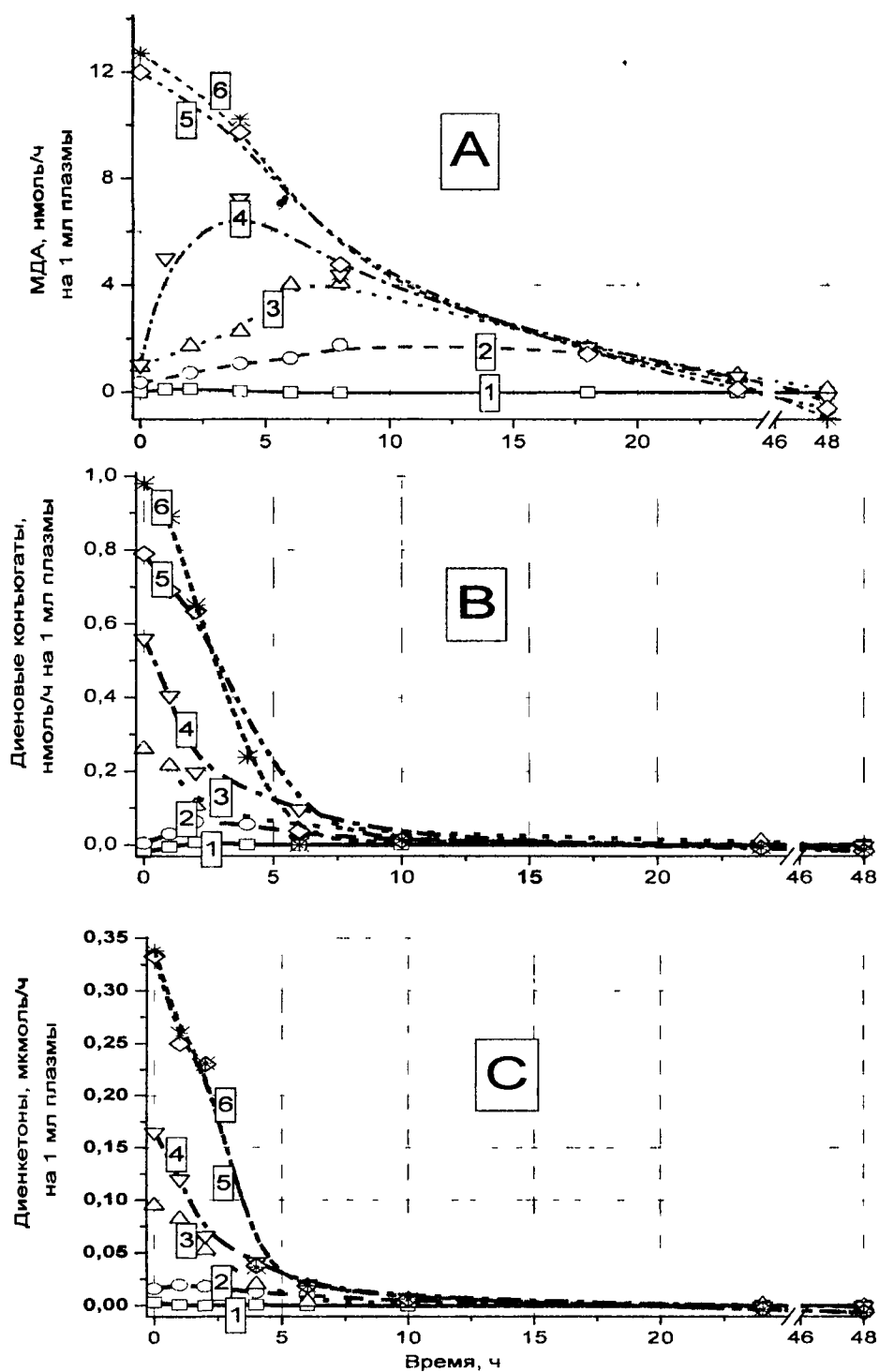


Рисунок 2

Скорость накопления продуктов ПОЛ (А - МДА (нмоль/ч на 1 мл плазмы), В - диеновые конъюгаты (нмоль/ч на 1 мл плазмы), С - диенкетоны (мкмоль/ч на 1 мл плазмы)) при спонтанном окислении и Cu^{2+} -индуцированном окислении плазмы для различных разбавлений 1 - спонтанное окисление неразбавленной плазмы; кривые 2-6 - Cu^{2+} -индуцированное окисление плазмы 2-неразбавленная плазма, 3 - 5-кратное, 4 - 10-кратное, 5 - 20-кратное, 6 - 40-кратное разбавление

КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Таблица 2. Физико-химические характеристики Cu^{2+} -индуцированного окисления различных разбавлений плазмы крови.

Продукты ПОЛ	Разбавление	Период индукции - т час	Относительное увеличение содержания продуктов ПОЛ через 24 ч окисления - C/C_0	Кинетическая константа скорости накопления продуктов ПОЛ - K , мин^{-1}
Диеновые конъюгаты ($n=7$)	Без разбавления	2-2,5	$4,21 \pm 0,86$	$12,2 \pm 1,05$
	x5	0	$8,75 \pm 0,92$	$9,1 \pm 0,86$
	x10	0	$12,9 \pm 1,03$	$3,7 \pm 0,44$
	x20	0	$25,1 \pm 2,11$	$0,3 \pm 0,26$
Диенкетоны ($n=7$)	Без разбавления	2-2,5	$4,43 \pm 0,59$	$3,30 \pm 0,09$
	x5	0	$9,29 \pm 0,98$	$1,88 \pm 0,24$
	x10	0	$14,29 \pm 1,15$	$0,54 \pm 0,07$
	x20	0	$25,86 \pm 2,10$	$0,17 \pm 0,02$
МДА ($n=12$)	Без разбавления	11-12	$18,09 \pm 2,83$	$0,188 \pm 0,026$
	x5	6-7	$26,19 \pm 2,76$	$0,087 \pm 0,009$
	x10	0	$41,90 \pm 3,44$	$0,019 \pm 0,003$
	x20	0	$50,48 \pm 4,21$	$0,007 \pm 0,001$

Примечание: В скобках указано количество исследованных проб.

диенкетоны > МДА. Результаты, представленные на рисунке 1 и в таблицах 2 и 3, показывают, что содержание продуктов ПОЛ в исходной плазме по сравнению с окисленной плазмой было ничтожно малым, то есть при определении окисляемости количеством продуктов ПОЛ в исходной плазме, а также результатами спонтанного окисления (см. табл. 1) можно пренебречь. При Cu^{2+} -индуцированном окислении после 24-часовой инкубации среди образовавшихся продуктов ПОЛ наибольшее количество приходится на диеновые конъюгаты, тогда как количество МДА составляет доли процента от общего количества образовавшихся продуктов.

Параметры ПОЛ в неразбавленной плазме определяются содержанием в ней водо- и жирорастворимых антиоксидантов, в то время как в разбавленной - влияние водорастворимых антиоксидантов стремится к нулю. Если принять, что количество накопленных продуктов ПОЛ обратно пропорционально содержанию антиоксидантов, то при сопоставлении параметров ПОЛ разбавленной и неразбавленной плазмы или сыворотки одного и того же донора можно определить относительный вклад водо- и жирорастворимых антиоксидантов в общую антиокислительную активность. Доли водо- и жирорастворимых антиоксидантов, определенные по накоплению диеновых конъюгатов составляют соответственно: 80% и 20%, а для диенкетонов - 86% и 14%. Расчеты проведены на основании данных, представленных в таблице 3. Полученные данные не различались для плазмы и сыворотки и хорошо совпадали с полученными различными методами данными других авторов. Так, например, в работе [24] показано, что основной вклад в общую антирадикальную активность вносят водорастворимые антиоксиданты - соли мочевой кислоты (53%) и аскорбиновая кислота (3%). На долю жирорастворимых антиоксидантов, главными из которых являются токоферол и неконъюгированный билирубин, приходится в общей сложности не более 4%, 33% веществ, обладающих антирадикальной активностью остались в этом исследовании неидентифицированными. В работе [5] вклад уратов и аскорбиновой кислоты в антиокислительную активность оценивается соответственно в 66% и 12%, токоферола - 11%, витамина А - 1%, а доля остальных жирорастворимых антиоксидантов (каротин, ликопин, убихинон, зеаксантин, лютеин) - доли процента.

Влияние на параметры ПОЛ объекта исследования (сыворотки и плазмы) определяли по содержанию продуктов ПОЛ в исходных объектах и окисляемости. Полученные данные представлены в таблице 3. В каждом отдельном эксперименте

КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

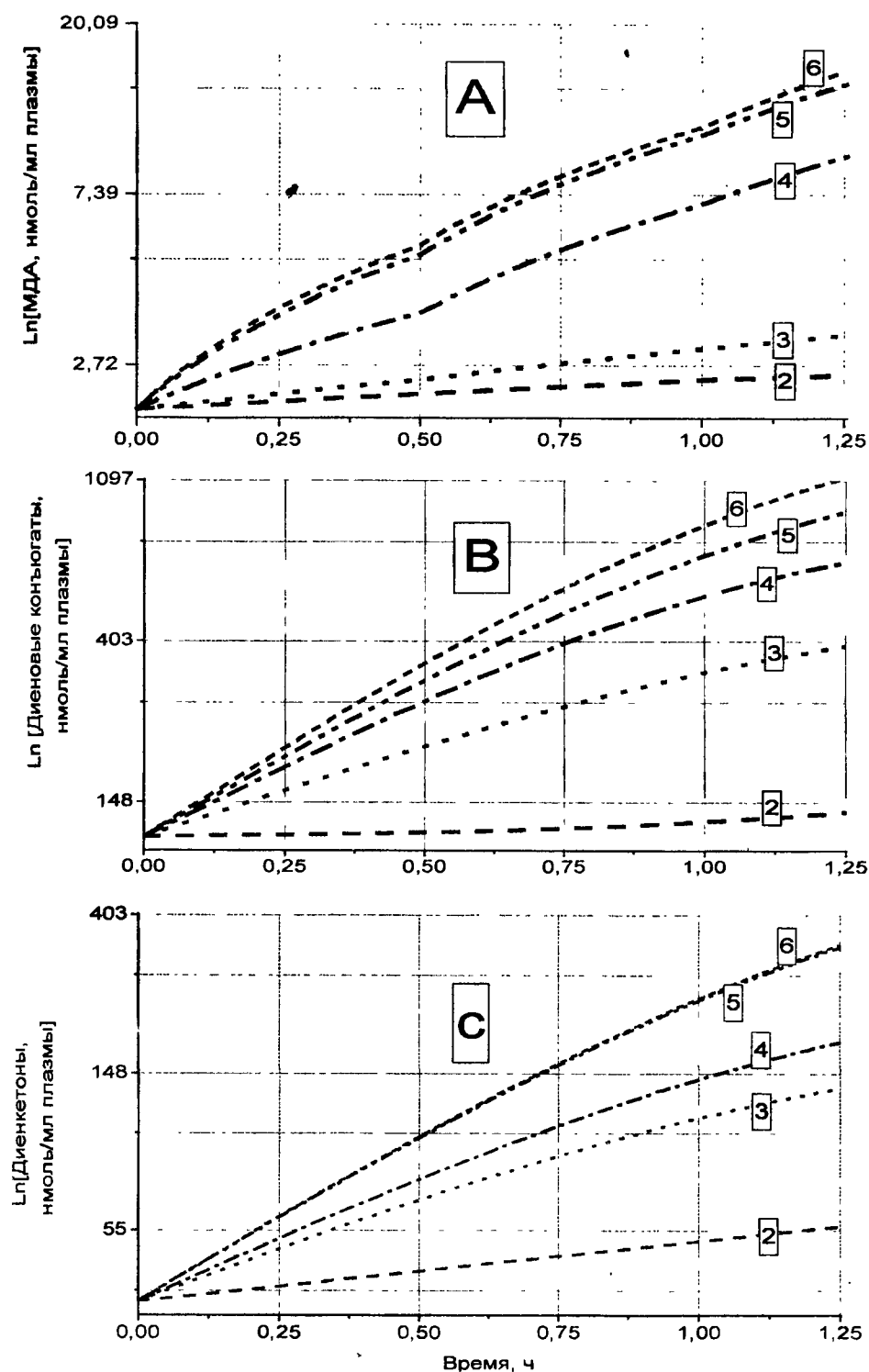


Рисунок 3.

Полулогарифмические анаморфозы начальных участков кривых накопления продуктов ПОЛ (А - МДА, В - диеновые конъюгаты, С - диенкетонны) Cu^{2+} -индуцированном окислении плазмы для различных разбавлений. 2 - неразбавленная плазма, 3 - 5-кратное, 4 - 10-кратное, 5 - 20-кратное, 6 - 40-кратное разбавление.

КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

были использованы сыворотка и плазма от одного и того же донора. Содержание продуктов ПОЛ в неокисленной плазме и сыворотке крови было практически одинаковым. Общие закономерности протекания Cu^{2+} -индуцированного окисления в сыворотке крови были такими же, как и в плазме. Однако процесс как индуцированного (табл.3), так и спонтанного окисления (см. данные табл.1), в сыворотке протекал значительно интенсивнее, чем в плазме. Различие в скоростях окисления может быть обусловлено наличием в плазме цитрата натрия или потерей сывороткой компонентов плазмы, входящих в кровяной сгусток.

Таблица 3 Содержание продуктов ПОЛ в окисленной и неокисленной плазме и сыворотке крови.

Продукты ПОЛ	Содержание продуктов ПОЛ до окисления		Содержание продуктов ПОЛ после 24 часов Cu^{2+} -индуцированного окисления			
			Без разбавления		20-кратное разбавление	
	Плазма	Сыворотка	Плазма	Сыворотка	Плазма	Сыворотка
Диеновые конъюгаты, мкмоль/мл	$0,17 \pm 0,07$ (n=12)	$0,17 \pm 0,01$ (n=12)	$0,51 \pm 0,01$ (n=7)	$0,63 \pm 0,03$ (n=7)	$2,63 \pm 0,09$ (n=12)	$3,03 \pm 0,11$ (n=12)
	$p > 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,05$	
Диенкетонны, нмоль/мл	$0,06 \pm 0,01$ (n=12)	$0,07 \pm 0,01$ (n=12)	$0,12 \pm 0,01$ (n=7)	$0,15 \pm 0,01$ (n=7)	$0,94 \pm 0,04$ (n=12)	$1,08 \pm 0,04$ (n=12)
	$p > 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,05$	
МДА, нмоль/мл	$2,6 \pm 0,4$ (n=10)	$3,83 \pm 0,5$ (n=10)	$60,0 \pm 3,0$ (n=12)	$77,3 \pm 4,8$ (n=12)	117 ± 7 (n=7)	191 ± 21 (n=7)
	$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,05$	

Примечание. В скобках указано количество исследованных проб, $p < 0,05$ - достоверная разница между плазмой и сывороткой.

Для выявления влияния цитрата натрия в сыворотку добавляли цитратный буферный раствор в том же объемном соотношении, что и при добавлении к крови с целью получения плазмы. Представленные в таблице 4 результаты по окисляемости сыворотки свидетельствуют о снижении уровня интенсивности процесса ПОЛ в пробах, содержащих цитрат. Можно предположить, что действие цитрата на интенсивность Cu^{2+} -индуцированного окисления обусловлено образованием комплексных соединений цитрата и меди. Влияние цитрата на кинетику Cu^{2+} -индуцированного окисления липидов было обнаружено в работе [25].

Таблица 4 Влияние цитрата на окисляемость липидов сыворотки крови.

Образцы сыворотки, разбавление	МДА, нмоль/мл, время окисления, часы		Диеновые конъюгаты, мкмоль/мл, время окисления, часы		Диенкетонны, нмоль/мл, время окисления, часы	
	0 ч	24 ч	0 ч	24 ч	0 ч	24 ч
Неразбавленная	3,65	73,3	0,11	0,66	0,02	0,12
Неразбавленная + цитрат		48,0		0,51		0,11
X20		177,0		3,56		1,02
X20 + цитрат		124,5		2,83		0,71

При сравнении окисляемости сыворотки, сыворотки с добавлением цитрата и плазмы, полученной из крови одного и того же донора, оказалось, что хоть окисляемость сыворотки с цитратом ниже, чем окисляемость сыворотки без цитрата, однако она превышает окисляемость плазмы того же донора (рис. 4). То есть кроме цитрата снижение окисляемости плазмы по сравнению с сывороткой крови определяется и другими факторами. Главное отличие плазмы от сыворотки крови состоит в отсутствии в сыворотке фибриногена. То есть, можно предположить, что в различие окисляемости сыворотки и плазмы вносит вклад

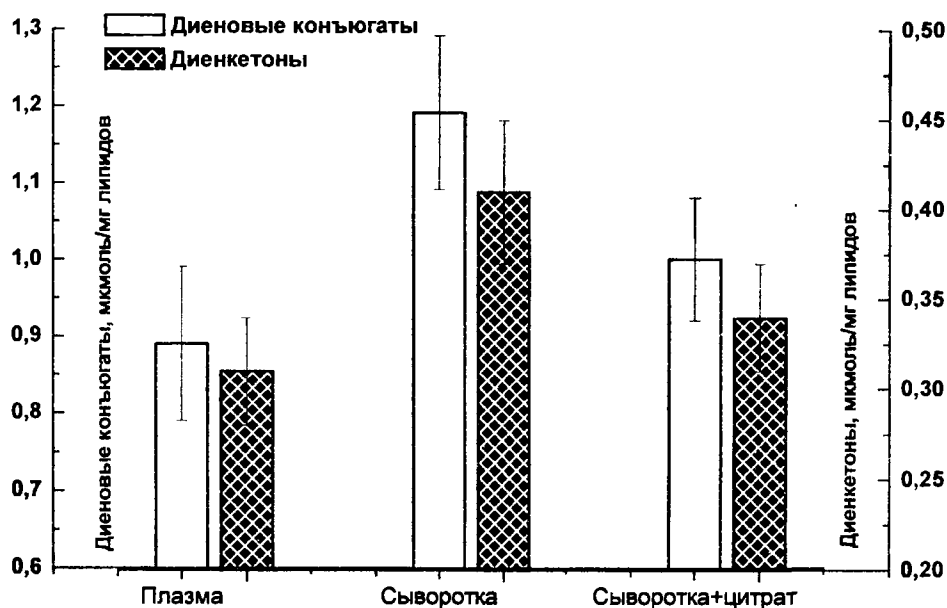


Рисунок 4.

Влияние добавления цитрата на окисляемость сыворотки крови. Результаты получены при окислении разбавленных в 50 раз плазмы, сыворотки и сыворотки с добавлением цитрата. Приведены средние значения содержания диеновых конъюгатов и диенкетонов (мкмоль/мг липидов), полученных при окислении плазмы и сыворотки 5 доноров.

фибриноген. В пользу такого предположения свидетельствует и особая восприимчивость фибриногена, по сравнению с остальными белками плазмы, к окислению [26]. Более того, в работе [27] хемилюминесцентным методом продемонстрировано ингибирующее действие на процессы ПОЛ при добавлении его в сыворотку донорской крови.

Таким образом, нами показано, что фактор выбора плазмы или сыворотки крови и их разбавления оказывает существенное влияние на результаты определения интенсивности Cu^{2+} -индуцированного ПОЛ. Разбавление усиливает процесс ПОЛ за счет снижения влияния водорастворимых антиоксидантов, а действие жирорастворимых антиоксидантов, растворенных в липидной фазе липопротеинов частиц, при разбавлении меняется мало. Окисление нефракционированных сыворотки и плазмы позволяет учитывать роль входящих в ее состав веществ, влияющих на протекание свободнорадикальных реакций в липопротеинах. Такой подход может быть использован, например, для выявления лиц с антиоксидантной недостаточностью с целью дифференцированного назначения им, в случае необходимости, водо- или жирорастворимых препаратов антиоксидантного действия. Проведенное нами исследование может способствовать стандартизации применяемых методик, что позволит сопоставлять результаты, полученные в разных лабораториях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рошупкин Д.И. (1991) Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники, **29**, 249с.
2. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. (1998) Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения.

КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

3. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Пальмина Н.П., Молочкина Е.М., Храпова Н.Г. (1975) Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте.
4. Ahotupa M., Vasankari T.J. (1999) *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 1141-1150.
5. Mecocci P., Polidori C., Troiano L., Cherubini A., Cecchetti R., Pini G., Straatman M., Monti D., Stahl W., Sies H., Franceschi C., Senin U. (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1243-1248.
6. Pryor W. A. (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 141-164.
7. Nieto J.F., Iribarren C., Gross M.D., Comstock G.W., Cutler R.G. (2000) *Atherosclerosis*, **148**, 131-139.
8. Bermejo P., Gomez-Serranillos P., Santos J., Pastor E., Gil P., Martin-Aragon S. (1997) *Gerontology*, **43**, 218-222.
9. Sattler W., Kosthner G.H., Waeg G., Esterbauer H. (1991) *Biochim. Biophys Acta*, **1081**, 65-67.
10. Kalyanaraman B., Antholine W.E., Parthasarathy S. (1990) *Biochim. Biophys Acta*, **1035**, 286-292.
11. Kuzuya M., Yamada K., Hayashi T., Funaki C., Naito M., Asai K., Kuzuya F. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1123**, 334-341.
12. Pinchuk I., Lichtenberg D. (1999) *FEBS Letters*, **450**, 186-190.
13. Ziouzenkova O., Sevanian A., Abuja P.M., Ramos P., Esterbauer H. (1998) *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 607-623.
14. Pinchuk I., Lichtenberg D., Schnitzer E. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1389**, 155-172.
15. Visiol F., Bordone R., Perugini C., Bagnati M., Cau C., Bellomo G. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **268**, 818-822.
16. Bowry V.W., Stanley K.K., Stocker R. (1992) *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10316-10320.
17. Ohmura H., Watanabe Y., Hatsumi C., Sato H., Daida H., Mokuno H., Yamaguchi H. (1999) *Atherosclerosis*, **142**, 179-184.
18. Karten B., Beisiegel U., Gercken G., Kontush A. (1997) *Chem. Phys. Lipids*, **88**, 83-96.
19. Kontush A., Spranger T., Reich A., Djahansouzi S., Karten B., Braesen J.H., Finckh B., Kohlschutter A., Beisiegel U. (1997) *Biofactors*, **6**, 99-109.
20. Кеймс М. (1975) Техника липидологии, М., Мир.
21. Комаров П.Г., Биленко М.В., Шведова А.А. (1985) *Вопр. мед. химии*, №2, 40-45.
22. Uchiyama M., Michara M. (1978) *Anal. Biochem.*, **89**, 271-278.
23. Вахрушева Т.В., Дремина Е.С., Шаров В.С., Азизова О.А. (1997) *Биофизика*, **42**, 662-670.
24. Дремина Е.С., Власова И.И., Вахрушева Т.В., Шаров В.С., Азизова О.А. (1997) *Биофизика*, **42**, 1079-1087.
25. Schnitzer E., Pinchuk I., Bor A., Fainaru M., Samuni A.M., Lichtenberg D. (1998) *Chem. Phys. Lipids*, **92**, 151-170.
26. Gilbert R., Walsh T.M., Loscalzo J. (1998) *J. Thrombosis Thrombolysis*, **5**, 9-14.
27. Olinescu R., Nita S., Popovici D., Hertoghe J. (1994) *Rom. J. Intern. Med.*, **32**, 185-193.

Поступила 25.10.2001

KINETIC PARAMETERS OF COPPER-INDUCED LIPID PEROXIDATION
IN BLOOD PLASMA AND SERUM

A.P. Savchenkova¹, L.B. Dudnik², N.P. Solovyova¹, O.A. Azyzova¹

¹Scientific Research Institute of Physicochemical Medicine, Russian Ministry of public healths, 1 M.
Pyrogovskaya Street, Moscow, 119328 Russia;
fax: (095) 246-4630, e-mail azyz@fbm.msu.ru

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygin Street,
Moscow, 117977 Russia

The aim of this study was to determine the concentration parameters and time-course of copper-induced oxidation in serum and whole blood plasma. We investigated the oxidizability of undiluted and (2-60-fold) diluted whole plasma (prepared with citrate as an anticoagulant) and serum by monitoring the change in the level of conjugated dienes, ketodienes and malondialdehyde in the samples. The kinetic curves of the accumulation of different lipid peroxidation (LPO) products had similar S-shape, but they differed by a number of quantitative parameters - lag-time, time of improvement and the level of maximal rate of oxidation, as well as time of improvement of the maximal accumulation and maximal amount of LPO products. When the LPO products were formed in undiluted plasma and serum, the lag phase of 2-2.5 h for conjugated dienes and ketodienes, and 11-12 h for malondialdehyde was observed. Oxidation profile showed a negligibly short period of inhibition followed by rapid oxidation for all investigated LPO products when plasma and serum were diluted at least 10-fold. The rate of accumulation and amount of LPO products decreased in the following order: conjugated dienes > ketodienes > malondialdehyde. Choice of blood plasma or serum and a dilution factor strongly influenced intensity of copper-induced LPO. Anticoagulant (sodium citrate), that was used by preparation of plasma, possessed an inhibitory action on LPO, due to formation of copper-citrate chelates. Dilution of plasma and serum increased LPO through lowering of influence of water-soluble antioxidants, but action of fat-soluble antioxidants (dissolved in the lipid phase of lipoprotein particles) by was unchanged. These results indicate that measurement of lipid oxidation induced *in vitro* in the whole plasma or serum might be more relevant model of the lipoprotein oxidation in the blood than the *in vitro* oxidation of single isolated lipoproteins.

Key words: lipid peroxidation, conjugated dienes, ketodienes, malondialdehyde, copper-induced oxidation, blood plasma and serum.