

УДК 543.258:542.943.8

© Коллектив авторов

ИНТЕГРАЛЬНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ ЕМКОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПО ДАННЫМ КУЛОНОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

**И.Ф. Абдуллин¹, Г.К. Будников¹, Г.К. Зиятдинова¹, В.И. Погорельцев²,
Т.С. Ганеев³, А.Т. Ганеева³**

¹Казанский государственный университет, химический факультет
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18; эл. почта: ziyatdinovag@mail.ru

²Казанский государственный медицинский университет
420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49

³Центр внепочечных методов очищения организма, отделение гемодиализа
420045, г. Казань, ул. Ершова, 2

Предложен способ быстрой кулонометрической оценки антиоксидантной емкости крови и плазмы крови, основанный на использовании электрогенерированных соединений брома. Прослежено в ходе процедуры и с течением времени изменение интегральной антиоксидантной емкости крови у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на программном гемодиализе. Установлено, что уровни антиоксидантной емкости венозной и артериальной крови достоверно различаются. Определено содержание жирорастворимого компонента в сыворотке крови в пересчете на α -токоферол. Проведена корреляция величин бромной антиоксидантной емкости и основных показателей окислительного стресса в организме.

Ключевые слова: интегральная антиоксидантная емкость, хроническая почечная недостаточность, жирорастворимые витамины, ТБК-положительные продукты.

ВВЕДЕНИЕ. Живые клетки непрерывно подвергаются воздействиям экзогенного происхождения: химических загрязнителей окружающей среды, действию ионизирующих излучений радионуклидов и других экстремальных факторов, вызывающих окислительный стресс в организме вследствие формирования активных интермедиатов радикальной природы при восстановлении кислорода [1]. Существуют и эндогенные источники свободных радикалов, связанные с окислением гемоглобина, митохондриальным и микросомальным дыханием [2]. Количество образующихся радикалов зависит не только от скорости их генерации, но и от состояния системы антиоксидантной защиты организма и, в частности, крови. Нарушение ее антиоксидантных функций приводит к развитию патологических состояний организма [3, 4].

Существуют различные представления о механизмах антиоксидантного действия в биологических жидких средах. По одним, идет снижение уровня генерируемых активных продуктов восстановления кислорода, по другим, - устранение некоторой группы (пула) металлов переменной валентности (Fe и Cu) за счет связывания их с белками. Это, в свою очередь, приводит к торможению свободнорадикальных реакций, связанных с образованием активных форм кислорода в организме [2, 5].

Развитие электрохимических методов, используемых для исследования крови, оказалось плодотворным для выяснения ее роли в системе антиоксидантной защиты организма [6,7].

В настоящее время убедительно показана роль процессов окисления в механизмах нарушений функции почек различной этиологии [8]. Поэтому определенный интерес представляет исследование интегральной антиоксидантной емкости крови больных с хронической почечной недостаточностью в терминальной стадии, находящихся на программном гемодиализе.

МЕТОДИКА. В ходе работы обследовано 100 пациентов - больных с хронической почечной недостаточностью в терминальной стадии (ХПН), находящихся на программном гемодиализе в центре внепочечных методов очищения организма. Контрольную группу (30 человек) составили здоровые доноры. Для исследования брали артериальную и венозную кровь, добавляли гепарин для предотвращения свертывания. Параллельно анализировали общие клинико-биохимические показатели крови. В период проведения исследований пациенты соблюдали предписанный режим и диету.

Интегральную антиоксидантную емкость (АОЕ) крови исследовали способом [9]. Полагали, что содержание жирорастворимого компонента связано с антиоксидантным статусом организма. Содержание ТБК-положительных продуктов, образующихся в результате перекисного окисления, в сыворотке крови определяли спектрофотометрически [10]. Уровень липопротеинов в сыворотке крови определяли по Бурштейну и Самай [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Электрогенерированный бром использовали в качестве реагента для оценки суммарных антиоксидантных свойств биологических жидкостей, в частности, крови и плазмы крови, при решении ряда медицинских задач.

В ходе исследований установлено, что интегральная АОЕ крови у больных достоверно ниже, чем у контрольной группы (рис. 1). Это говорит о том, что у пациентов, находящихся на гемодиализе, наблюдается дефицит веществ, способных проявлять антиоксидантные свойства.

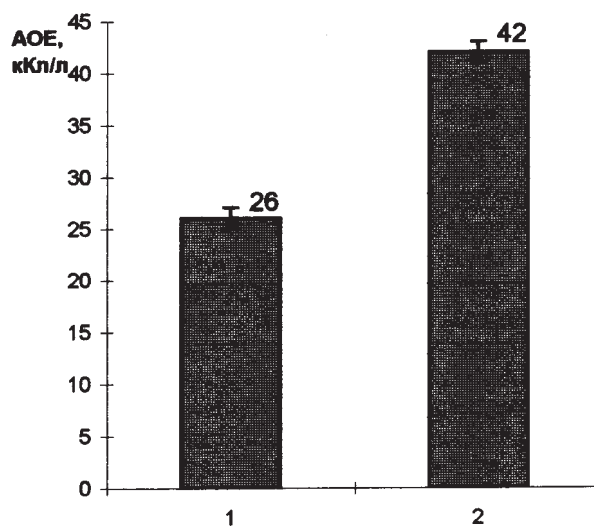


Рисунок 1.

Интегральная антиоксидантная емкость венозной крови: 1 - больных, находящихся на программном гемодиализе; 2 - контрольной группы.

В процессе сеанса гемодиализа наблюдается увеличение АОЕ крови независимо от продолжительности периода пребывания на программном гемодиализе, что можно связать с уменьшением содержания оксидантов и прооксидантов в процессе экстракорпорального очищения крови. Результаты определения представлены в таблице 1.

Таблица 1. Изменение интегральной антиоксидантной емкости крови больных хронической почечной недостаточностью в ходе гемодиализа.

Период пребывания на гемодиализе	Интегральная антиоксидантная емкость, $\mu\text{Кл/л}$			
	до гемодиализа	S_r	после гемодиализа	S_r
менее 1 года ($n=6$)	27 ± 2	0,05	39 ± 2	0,05
более 1 года ($n=15$)	27 ± 1	0,04	35 ± 2	0,04

Исследовали изменение интегральной АОЕ крови больных как в ходе сеанса гемодиализа, так и с течением времени (рис. 2). Установлено, что в ходе сеанса гемодиализа АОЕ крови увеличивается и продолжает расти в течение следующих суток, а средний прирост составляет 13,4%. Это, возможно, связано с тем, что гемодиализ, помимо описанной очистительной функции, активирует триггер-механизмы, способствующие появлению и выбросу антиоксидантов в периферическую кровь. Также выявлено, что на вторые сутки после сеанса гемодиализа АОЕ крови резко уменьшается, причем это совпадает с кратностью гемодиализа (обычно гемодиализ проводится через 2 суток).

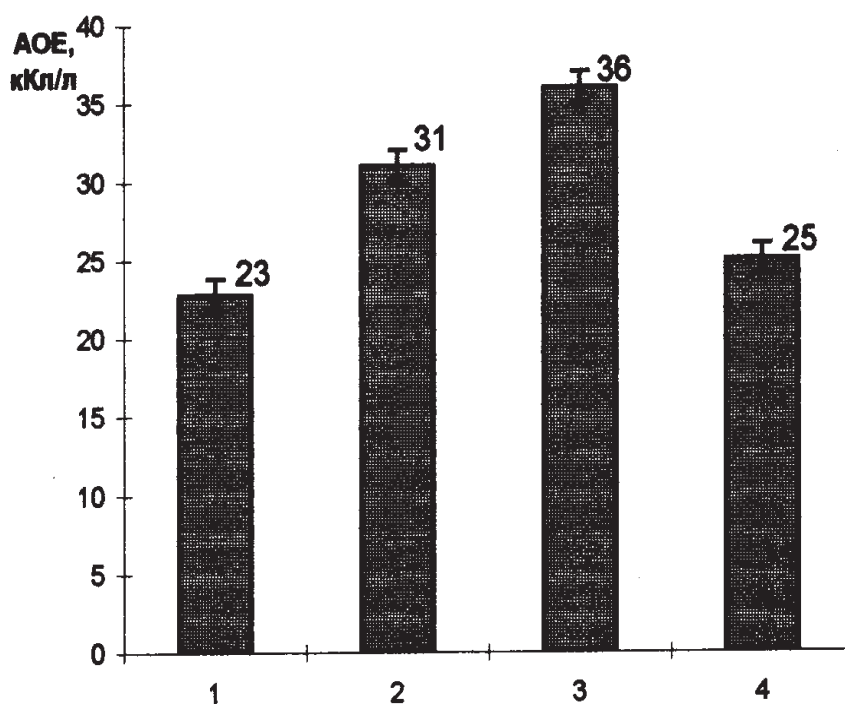


Рисунок 2.

Изменение антиоксидантной емкости артериальной крови больных, находящихся на программном гемодиализе, с течением времени:

1 - до процедуры; 2 - после процедуры; 3 - через сутки после процедуры; 4 - через 2 суток после процедуры.

Результаты исследования уровня АОЕ у больных с различными нозологическими характеристиками представлены в таблице 2.

АНТИОКСИДАНТЫ КРОВИ ПРИ ХПН

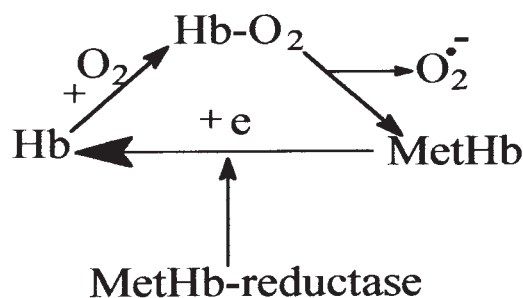
Таблица 2. Уровень АОЕ крови больных, находящихся на программном гемодиализе по нозологическим характеристикам.

Диагноз	Антиоксидантная емкость, $\mu\text{Кл/л}$	
	до гемодиализа	после гемодиализа
ХПН + хронический гломерулонефрит (n=27)	30 ± 1	37 ± 2
ХПН + хронический пиелонефрит (n=10)	29 ± 3	35 ± 2
ХПН + поликистоз почек (n=13)	33 ± 2	39 ± 3
ХПН + сахарный диабет I типа (n=5)	23 ± 3	32 ± 3

Самая низкая АОЕ наблюдается для сочетания ХПН и сахарного диабета, самая высокая при ХПН и поликистозе почек, и они достоверно отличаются. В случае ХПН и пиело- или гломерулонефрита - заболеваний, при которых поражается и паренхима почек, - уровень АОЕ примерно одинаков и недостоверно снижен при пиелонефрите. Несмотря на гемодиализ, показатели не достигают нормы, но существенно возрастают по сравнению с додиализным периодом. В случае с диабетом и поликистозом почек наблюдается наибольшее достоверное увеличение АОЕ крови. Учитывая, что сахарный диабет является конкурентным заболеванием, способным вызвать гибель больного, одновременное протекание ХПН и сахарного диабета можно рассматривать как резко ухудшающее состояние больного с крайне неблагоприятным течением и прогнозом, показателем которого служит состояние антиоксидантной системы организма. При этом необходимо отметить, что гемодиализ позволяет отчасти компенсировать нарушения в антиокислительном статусе организма. Таким образом, эксперимент показал, что

- при ХПН и конкурирующем заболевании уровень АОЕ резко понижается;
- при ХПН и заболевании, которое ее вызвало, уровень АОЕ относительно одинаков независимо от нозологической формы;
- гемодиализ достоверно повышает АОЕ, хотя не достигает нормы для здоровых;
- при ХПН и конкурентном заболевании необходимо коррегировать АОЕ, поскольку уровень ее очень низкий.

Проведенные исследования показали, что антиоксидантная емкость венозной и артериальной крови достоверно отличается (рис. 3). Известно, что артериальная кровь более насыщена кислородом, по сравнению с венозной. Поскольку первый продукт активации молекулы кислорода супероксид анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), то считается, что именно он является родоначальником всех активных форм кислорода *in vivo*, которые интенсивно понижают антиоксидантную активность. Гемоглобин, который отвечает за транспорт кислорода в организме, участвуя в окислительных процессах, продуцирует $\text{O}_2^{\cdot-}$ [2], (схема):



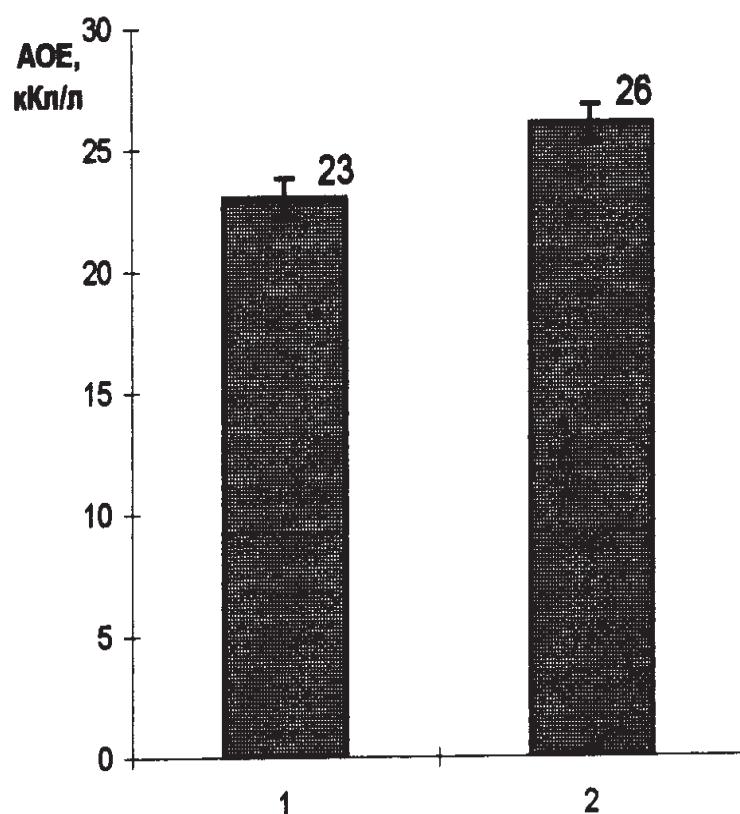


Рисунок 3.

Уровень интегральной антиоксидантной емкости крови: 1- артериальной; 2- венозной.

Чем выше оксигенация крови, тем больше образуется активных форм кислорода, что приводит к уменьшению интегральной антиоксидантной емкости.

Установлено также, что антиоксидантная емкость плазмы меньше, чем у цельной крови (для артериальной крови в 1,9 раза, для венозной в 1,7 раза). Результаты определения представлены в таблице 3. Это различие, по-видимому, связано с присутствием в цельной крови порфиринов, которые реагируют с электрогенерированным бромом.

Таблица 3. Результаты определения антиоксидантной емкости плазмы и цельной крови.

Объект	Интегральная антиоксидантная емкость, кКл/л			
	до гемодиализа	S_r	после гемодиализа	S_r
Плазма артериальной крови (n=41)	12,2±0,6	0,03	17±1	0,03
Цельная артериальная кровь (n=41)	23±1	0,04	31±1	0,04
Плазма венозной крови (n=34)	15 ±1	0,04	21,6±0,8	0,05
Цельная венозная кровь (n=34)	26±1	0,05	34,3±0,9	0,03

Помимо интегральной антиоксидантной емкости крови определяли суммарное содержание жирорастворимого компонента в сыворотке крови в пересчете на α -токоферол [12]. Результаты определения представлены в таблице 4. Корреляционный анализ показал, что существует линейная зависимость между антиоксидантной емкостью и содержанием жирорастворимых антиоксидантов ($r=0,975$).

АНТИОКСИДАНТЫ КРОВИ ПРИ ХПН

Таблица 4. Результаты кулонометрического определения содержания свободных жирорастворимых антиоксидантов в сыворотке крови пациентов с хронической почечной недостаточностью в пересчете на α -токоферол (n=5).

№	Содержание жирорастворимых витаминов в пересчете на α -токоферол, г/л	S _r
1	1,9±0,1	0,05
2	1,7±0,1	0,06
3	1,5±0,1	0,07
4	1,4±0,1	0,06
5	1,45±0,09	0,06
6	0,51±0,06	0,08
7	1,5±0,2	0,07
8	1,27±0,09	0,06
9	0,61±0,08	0,08
10	0,78±0,07	0,08
11	1,27±0,09	0,06

Определено содержание ТБК-положительных продуктов в сыворотке крови, характеризующее интенсивность перекисного окисления липидов. Как и следовало ожидать, у пациентов с хронической почечной недостаточностью наблюдается значительное увеличение их количества. Установлена линейная корреляция АОЕ с содержанием ТБК-положительных продуктов в сыворотке крови ($r = -0,994$), что иллюстрирует рисунок 4. Исследована взаимосвязь АОЕ с содержанием липопропротеидов низкой плотности. Наблюдается обратно пропорциональная зависимость ($r = -0,685$).

АОЕ, кКл/л

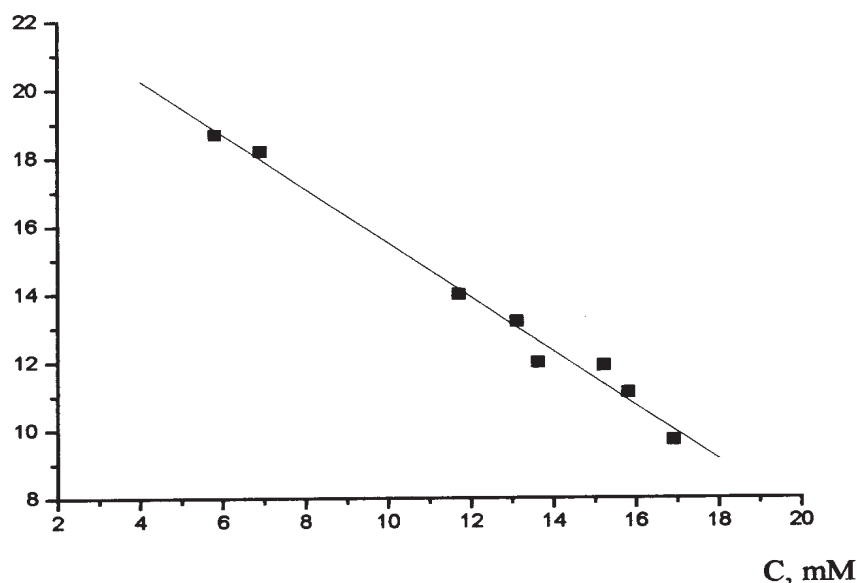


Рисунок 4.

Зависимость интегральной антиоксидантной емкости крови от содержания ТБК-положительных продуктов в сыворотке.

Таким образом, предложенный способ можно успешно применять для определения интегральной антиоксидантной емкости биологических жидкостей. Проведенные исследования показали возможность использования разработанной методики в клинике для оценки интегральной антиоксидантной емкости крови больных с целью последующей коррекции медикаментозной терапии.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Chevion S., Roberts V. A., Chevion M. (2000) Free Radical Biology & Medicine, **28**, 860-870.
2. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Роцункин Д.И. (1991) Итоги науки и техники (ВИНИТИ АН СССР), М.
3. Hennekens C.H. (1997) Pure and Applied Chemistry, **69**, 2141-2144.
4. Parthasarathy S., Santanam N., Auye N. (1998) Biochem. Pharmacol., **56**, 279-284.
5. Muchova J., Garaiova I., Sustrova M., Hruskova S., Durackova Z. (1998) Chemical Papers - Chemicke Zvesti, № 52, 537.
6. Dangles O., Dufour C., Bret S. (1999) J. Chem. Soc. - Perkin Transactions, **2**, 737-744.
7. Громова В.Ф., Шаповал Г.С., Миронюк И.Е., Луик А.И. (1997) Журн. общей химии, **67**, 510-513.
8. Балашова Т.С., Багирова Н.И., Зверев Д.В., Теблосева Л.Т., Кубатиев А.А. (1996) Тер. архив, № 3, 20-23.
9. Заявка на патент РФ № 2002134634 от 29.12.02. "Способ определения интегральной антиоксидантной емкости биологических жидкостей".
10. Орехович В.Н. (ред) (1977) Современные методы в биохимии. М.: Медицина, с. 66-68.
11. Балаховский С.Д., Балаховский И.С. (1953) Методы химического анализа крови. М.: Медгиз.
12. Абдуллин И.Ф., Турова Е.Н., Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. (2002) Журн. аналит. химии, **57**, 864-866.

Поступила: 09. 04. 2003

TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF BIOLOGICAL FLUIDS FOR CHRONIC KIDNEY INSUFFICIENCY USING COULOMETRIC TITRATION DATA

I.F. Abdullin¹, H.C. Budnikov¹, G.K. Ziyatdinova¹, V.I. Pogoreltzev²,
T.S. Ganeev³, A.T. Ganeva³

¹Kazan State University, Chemical Department, 420008, Kazan, Kremlyevskaya, 18

²Kazan State Medical University, 420012, Kazan, Butlerova, 49

³Nonkidney Clearing Methods of Organism Center, Department of Hemodialysis
420045, Kazan, Ershova, 2

E-mail: ziyatdinovag@mail.ru

Express coulometric method for estimation of blood and plasma antioxidant capacity based on the use of electrogenerated compounds of bromine is proposed. Using this method we found changes in total antioxidant capacity in patient with chronic kidney insufficiency during hemodialysis session and after it.

Key words: total antioxidant capacity, chronic kidney insufficiency, fat-soluble vitamins, TBA-positive products.