

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СПОСОБНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И ТКАНЕЙ

© 2019 г. Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, А.Н. Осипов

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава РФ,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

E-mail: teselkin-box@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2019 г.

После доработки 15.05.2019 г.

Принята к публикации 21.05.2019 г.

Представлен модифицированный метод определения антиоксидантной способности биологических жидкостей и тканей на основе использования хемилюминесцентной модельной системы, в которой окисление люминола индуцировали 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлоридом. Показано, что включение в состав системы дополнительного компонента — ЭДТА — придает последней ряд преимуществ. Заметно увеличивается (в шесть-семь раз) интенсивность хемилюминесценции на стадии стационарного свечения, стационарность сохраняется в течение длительного времени (более одного часа). Кроме того, не регистрируется значительного усиления интенсивности свечения в присутствии биологических жидкостей или отдельных антиоксидантов (сывороточного альбумина человека, аскорбиновой кислоты), наблюдаемого после окончания латентного периода хемилюминесценции в отсутствие ЭДТА. Поскольку величины латентных периодов, определяемые при введении в изучаемую систему некоторых низкомолекулярных антиоксидантов (тролокса, мочевиной кислоты), а также биологических жидкостей человека (сыворотки крови, слезной жидкости) существенно не отличались от полученных в системе без ЭДТА, можно полагать, что ЭДТА не оказывает влияния на реакции окисления люминола. Предлагаемая система может применяться и для оценки антиоксидантной способности различных тканей. Представленные данные обсуждаются в плане перспектив использования предлагаемого модифицированного метода определения антиоксидантной способности биологического материала в клинической практике.

Ключевые слова: оксидативный стресс, антиоксиданты, антиоксидантная способность, сыворотка крови, слезная жидкость, хемилюминесценция.

DOI: 10.1134/S0006302919050077

Определение антиоксидантной способности (АОС) биологических жидкостей широко используется при проведении клинических и экспериментальных исследований, направленных на изучение механизмов развития оксидативного стресса и его роли в патогенезе заболеваний [1–4]. АОС биологических жидкостей — интегральный показатель, зависящий не только от количества присутствующих в исследуемом объекте антиоксидантов, но и от синергизма между ними [5]. Этот показатель позволяет количественно оценивать состояние антиоксидантной системы, влияние на него физиологических, экологиче-

ских и пищевых факторов, а также осуществлять контроль эффективности коррекции этого состояния, например за счет введения в организм дополнительного количества антиоксидантов с профилактической или лечебной целью [5–7].

Для изучения АОС биологических жидкостей применяют модельные системы, основными компонентами которых являются система генерации радикалов и молекулы-мишени, подвергающиеся свободнорадикальному окислению. Известно много способов определения АОС биологических жидкостей, которые отличаются друг от друга и типом радикалов-инициаторов, и молекулами-мишенями [2,8,9]. Среди них большой популярностью пользуются хемилюминесцентные методы, основанные, как правило, на взаимодействии антиоксидантов, входящих в состав биологических жидкостей, с радикалами-инициаторами, индуцирующими окисление хемилюминесцентных кра-

Сокращения: АОС — антиоксидантная способность, АБАП — 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, САЧ — сывороточный альбумин человека, RO_2^* — пероксильные радикалы, образующиеся в процессе термического распада 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида, TRAP — Total Radical-trapping Antioxidant Parameter.

сителей, например люминола [10–14]. В результате этого взаимодействия происходит ингибирование окисления хемилюминесцентного красителя и появляется латентный период хемилюминесценции, длительность которого прямо пропорциональна содержанию антиоксидантов в исследуемом образце [3,15–17]. Хемилюминесцентные методы обладают высокой чувствительностью и позволяют проводить кинетические измерения. Один из таких методов состоит в окислении люминола радикалами-инициаторами, образующимися при термическом распаде водорастворимого азо-соединения – 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида (АБАП) [18]. Модельная система для определения АОС биологических жидкостей на основе АБАП и люминола используется в различных модификациях, которые различаются соотношением концентраций основных компонентов, значениями рН среды, временем введения анализируемой биологической жидкости [1,19,20]. Так, биологическая жидкость добавляется в модельную систему либо до введения в нее АБАП (до момента инициирования окисления люминола) [15,19,21], либо после введения АБАП, когда хемилюминесценция модельной системы достигает стационарного уровня [20,22,23]. Однако не все варианты существующего метода являются универсальными и приспособлены для определения АОС как биологических жидкостей, так и других биологических объектов, в частности тканей экспериментальных животных. При проведении исследований мы обнаружили, что натриевая соль ЭДТА, которая часто используется в качестве хелатора ионов двух- и трехвалентных металлов (например, при получении плазмы крови, приготовлении гомогенатов тканей), может существенным образом влиять на кинетику хемилюминесценции системы «АБАП–люминол» и придает ей некоторые преимущества по сравнению с аналогичной системой без ЭДТА.

Цель исследования – разработка модифицированного метода определения АОС биологических жидкостей и тканей на основе системы «АБАП–люминол», содержащей ЭДТА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применяли реактивы: аскорбиновую кислоту, мочевую кислоту, сывороточный альбумин человека (САЧ), тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновую кислоту), динатриевую соль ЭДТА, АБАП, диметилсульфоксид, неорганические соли (все – производства Sigma-Aldrich, США), люминол (Fluka, Швейцария).

В исследовании использовали кровь десяти практически здоровых добровольцев мужского пола в возрасте 19–60 лет. Проводили взятие крови из пальца, без антикоагулянта, натощак. Для получения сыворотки крови образец инкубиро-

вали при комнатной температуре в течение 30 мин и далее центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g и 4°C. Процесс выделения слезы стимулировали с помощью летучих соединений репчатого лука. Слезу собирали из нижнего конъюнктивального свода. Биологические жидкости хранили при 4°C в течение эксперимента (5–6 ч).

Печень аутбредных белых крыс-самцов линии Wistar ($n = 10$) массой 200–220 г выделяли, промывали физиологическим раствором (4°C) и готовили 2% гомогенаты (масса/объем) с использованием физиологического раствора, содержащего 1 мМ ЭДТА для ингибирования металл-катализируемых свободнорадикальных процессов. Далее образцы центрифугировали в течение 20 мин при 4000 g и 4°C. Супернатанты отбирали и хранили так же, как и биологические жидкости.

Измерение АОС биологических жидкостей, супернатантов гомогенатов печени и антиоксидантов (тролокса, аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, САЧ) проводили на 12-канальном хемилюминометре Lum-1200 (ООО «ДиСофт», Россия) с оригинальным программным обеспечением PowerGraph 3.3 Professional (www.powergraph.ru). Были использованы две хемилюминесцентные системы: одна из них, двухкомпонентная, содержала люминол и АБАП, в другую был включен дополнительный компонент – ЭДТА. Реакционная среда общим объемом 1500 мкл имела следующий состав: 10 мкМ люминола и 1 мМ ЭДТА (в первой системе ЭДТА не было) в 50 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 0,14 М NaCl, рН 8,0. Исследуемые пробы предварительно инкубировали в измерительной ячейке хемилюминометра в темноте в течение 5 мин для достижения температуры 37°C. Затем индуцировали свободнорадикальное окисление люминола добавлением АБАП в конечной концентрации 1 мМ. Рабочий раствор АБАП (50 мМ) готовили на бидистиллированной воде непосредственно перед проведением исследования и хранили на протяжении эксперимента в бане со льдом. Биологические жидкости, супернатанты гомогенатов печени, растворы антиоксидантов добавляли в реакционную среду после выхода кинетики хемилюминесценции модельной системы на стационарный уровень – через 10–15 мин с момента инициирования окисления люминола. Объем анализируемых образцов не превышал 50 мкл, поскольку при введении в систему на стадии стационарного свечения буфера в объеме до 50 мкл происходило быстрое восстановление свечения до исходного уровня. Так как в хемилюминометре Lum-1200 перемешивание не предусмотрено, после внесения в пробы добавок (АБАП, антиоксидантов, биологических материалов) их быстро перемешивали с использованием вортекса Reax top (Heidolph, Германия). Раствор люминола

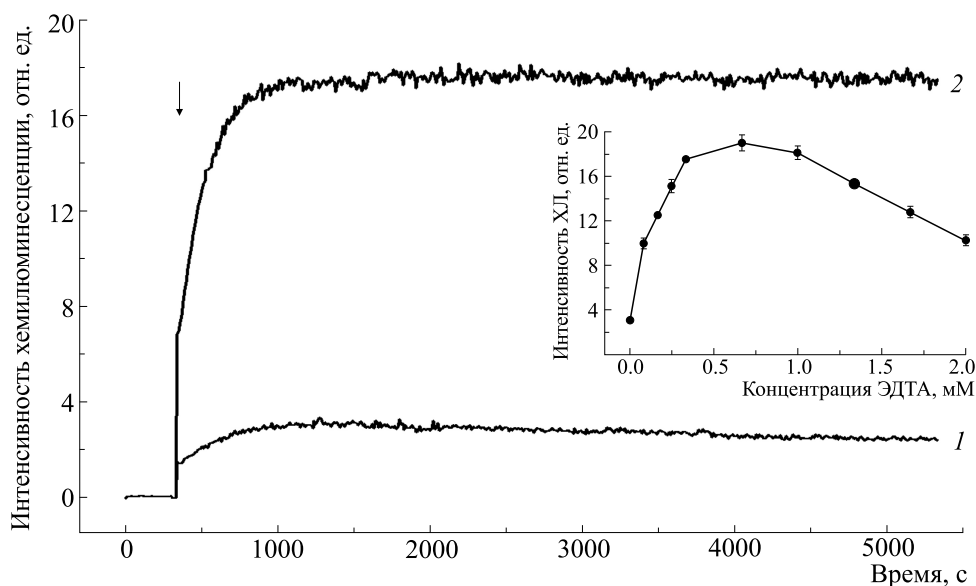


Рис. 1. Типичные кинетики хемилюминесценции системы «АБАП–люминол» в отсутствие (1) и в присутствии (2) ЭДТА. Стрелкой отмечен момент введения АБАП. На врезке – зависимость максимальной интенсивности хемилюминесценции системы от концентрации ЭДТА.

(5 мМ) готовили на 50 мМ боратном буфере, рН 10,0 и хранили в замороженном состоянии при температуре -30°C не более шести месяцев.

Для приготовления 2 мМ раствора тролокса (использовался в качестве стандартного антиоксиданта) навеску растворяли в 5%-м (по объему) растворе диметилсульфоксида, приготовленном на 50 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 0,14 М NaCl, рН 8,0. Приготовленный раствор тролокса хранили при температуре -30°C не более трех месяцев. Перед определением АОС раствор тролокса размораживали, разводили буферным раствором до концентрации 25 мкМ и держали в течение эксперимента при $5\text{--}10^{\circ}\text{C}$. Растворы других антиоксидантов – аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, САЧ – также готовили перед использованием на 50 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 0,14 М NaCl, рН 8,0.

Результаты исследований были обработаны стандартными методами вариационной статистики и представлены в форме средней величины и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Оценку достоверности различий между сравниваемыми показателями проводили с помощью t -критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Один из подходов, используемых для определения АОС биологических материалов с помощью системы «АБАП–люминол», основан на получении стационарного свечения [17,20,22], когда скорость продукции радикалов-инициаторов

окисления люминола, образующихся при термическом распаде АБАП, постоянна. Нами обнаружено (рис. 1, кривая 1), что при соотношении концентраций АБАП (1 мМ) и люминола (10 мкМ), равном 100, стационарность свечения сохраняется в течение продолжительного времени (более 1 ч). Добавление в состав реакционной среды 1 мМ ЭДТА не нарушало стационарности свечения (рис 1, кривая 2), однако его интенсивность увеличивалась в шесть-семь раз по сравнению с контролем (без ЭДТА). Зависимость максимальной интенсивности свечения системы «АБАП–люминол» от концентрации ЭДТА имеет куполообразный характер с максимумом в области концентраций 0,33–1,0 мМ (рис. 1, врезка). Наилучшая стационарность свечения наблюдалась в том же диапазоне концентраций (данные не представлены). В последующих экспериментах концентрация ЭДТА в системе составляла 1 мМ.

При изучении антиоксидантных свойств биологических субстратов в качестве стандартного антиоксиданта обычно используют тролокс, который является водорастворимым структурным аналогом витамина Е. Показано, что добавление тролокса в систему «АБАП–люминол» приводит к появлению латентного периода хемилюминесценции, который увеличивается прямо пропорционально концентрации данного антиоксиданта [17,20,22]. В нашем исследовании латентный период, возникающий при введении тролокса в систему «АБАП–люминол» на стадии стационарного свечения, не зависел от присутствия в среде ЭДТА и также увеличивался прямо пропорцио-

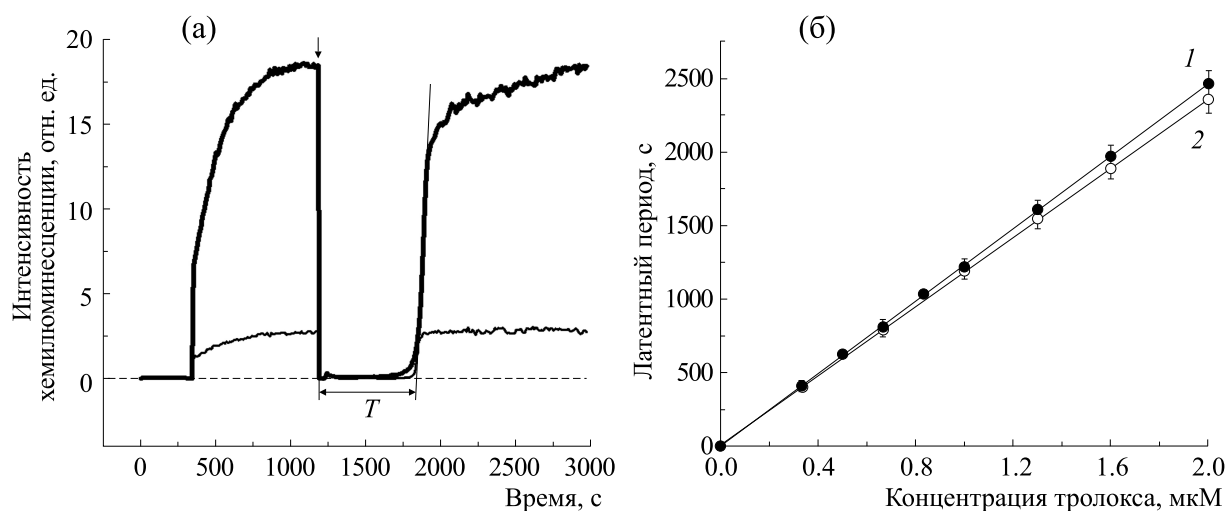


Рис. 2. Влияние тролокса на хемилюминесценцию системы «АБАП–люминол». (а) – Изменение кинетических кривых хемилюминесценции при добавлении тролокса (0,5 мкМ). Верхняя кривая – система с ЭДТА; нижняя кривая – система без ЭДТА. Стрелкой отмечен момент введения тролокса. (б) – Зависимости латентного периода хемилюминесценции системы с ЭДТА (1) и без ЭДТА (2) от концентрации тролокса. Уравнения прямых: (1) – $y = 1228,55x + 5,62$, $r^2 = 0,999$; (2) – $y = 1177,38x + 3,17$, $r^2 = 0,999$.

нально концентрации этого ингибитора (рис. 2а,б). Возникновение латентного периода связывают с тем, что тролокс перехватывает образующиеся в системе водорастворимые радикалы-инициаторы окисления люминола, в качестве которых рассматривают пероксильные радикалы (RO_2^{\bullet}). Это вызывает торможение окисления люминола. В работе [24] установлено, что одна молекула тролокса взаимодействует с двумя радикалами RO_2^{\bullet} (коэффициент стехиометрии $n_{\text{трол}} = 2$). Как только весь антиоксидант инактивируется, латентный период заканчивается, и процесс окисления люминола возобновляется.

Введение в систему «АБАП–люминол» сыворотки крови или слезной жидкости также сопровождалось появлением латентного периода (рис. 3а,б), продолжительность которого была прямо пропорциональна количеству добавленной биологической жидкости. При этом существенных различий между значениями латентных периодов в системах с ЭДТА и без ЭДТА не обнаружено (рис. 3в). Величина латентного периода не зависела от того, в какой момент времени на стадии стационарного свечения вводили анализируемый образец (данные не приводятся). Следует отметить, что в отсутствие ЭДТА после окончания латентного периода регистрировалось усиление свечения, максимальная интенсивность которого превышала интенсивность стационарного уровня. В то же время в присутствии ЭДТА такого усиления хемилюминесценции либо совсем не происходило (сыворотка крови), либо оно было менее выраженным (слезная жидкость). На рис. 3 представлены данные по одному добро-

вольцу. Для других обследованных добровольцев указанные зависимости имели аналогичный характер.

Существует предположение, что наблюдаемое усиление свечения в системе «АБАП–люминол» без ЭДТА при добавлении в нее сыворотки крови человека обусловлено САЧ [23]. Результаты наших экспериментов свидетельствуют в пользу этого мнения. На рис. 4а видно, что добавление САЧ в систему без ЭДТА приводило к подъему кинетических кривых хемилюминесценции выше стационарного уровня. В присутствии ЭДТА, наоборот, было установлено концентрационно-зависимое ингибирующее действие САЧ на интенсивность свечения модельной системы (рис. 4б). При этом в обеих системах не наблюдалось латентных периодов (рис. 4а,б).

Влияние низкомолекулярных антиоксидантов – мочевой кислоты и аскорбиновой кислоты – на хемилюминесценцию системы «АБАП–люминол» показано на рис. 5 и 6. В случае мочевой кислоты изменение латентных периодов хемилюминесценции в зависимости от концентрации в изучаемых системах было практически одинаковым. Что касается аскорбиновой кислоты, то увеличение латентного периода с повышением ее концентрации было менее выраженным в системе без ЭДТА. Это связано, по-видимому, с тем, что аскорбиновая кислота может подвергаться окислению с участием ионов металлов переменной валентности, которые в следовых количествах содержатся в бидистиллированной воде и химических реактивах. При введении мочевой кислоты интенсивность хемилюминесценции, регистрируемая после окончания латентного перио-

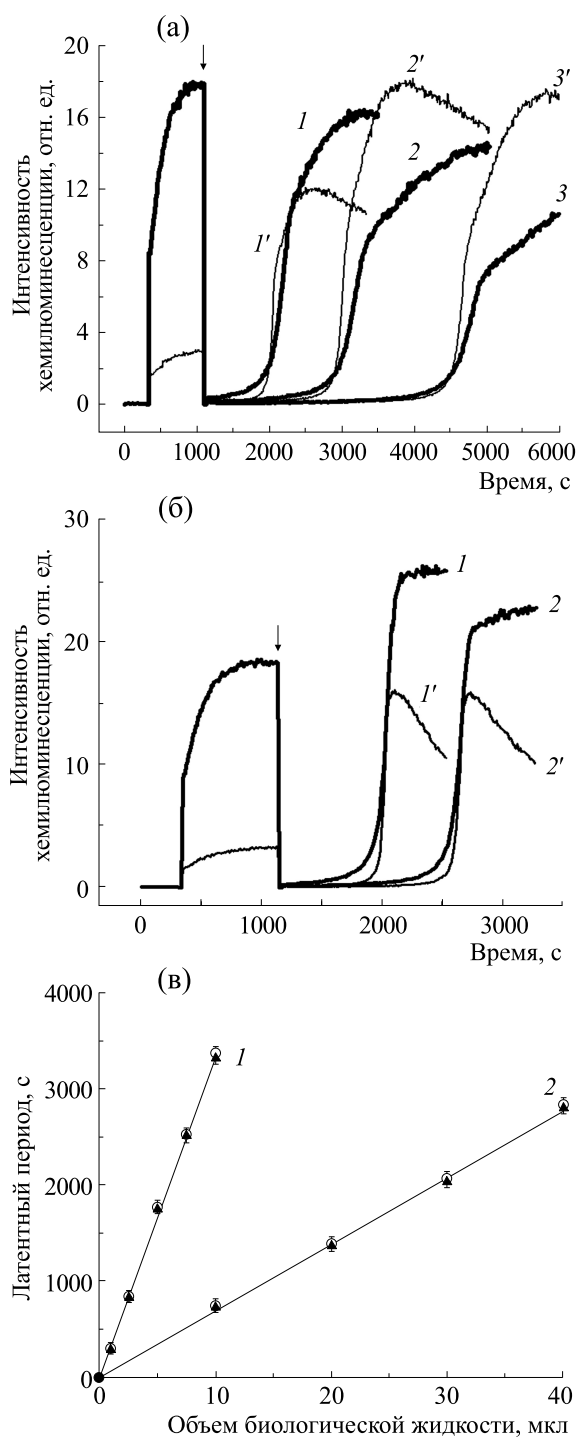


Рис. 3. Влияние биологических жидкостей человека на хемилюминесценцию системы «АБАП–люминол». (а) – Сыворотка крови (1, 1' – 2,5 мкл, 2, 2' – 5 мкл и 3, 3' – 10 мкл); (б) – слезная жидкость (1, 1' – 10 мкл, 2, 2' – 20 мкл). Стрелками отмечены моменты введения сыворотки крови или слезной жидкости. 1, 2, 3 – система с ЭДТА; 1', 2', 3' – система без ЭДТА. (в) – Зависимости латентного периода хемилюминесценции системы от объема биологической жидкости: 1 – сыворотка крови; 2 – слезная жидкость. Треугольниками показаны значения латентных периодов хемилюминесценции, полученные в системе с ЭДТА, кружками – в системе без ЭДТА.

да, не превышала уровень стационарного свечения в обеих системах, тогда как добавление аскорбиновой кислоты в систему без ЭДТА сопровождалось некоторым нарастанием интенсивности свечения в аналогичную фазу кинетической кривой.

Для определения антиоксидантного потенциала различных биологических жидкостей используются латентные периоды хемилюминесценции, регистрируемые при их добавлении в систему «АБАП–люминол». При этом АОС представляют в виде эквивалентной концентрации тролокса (тролоксый эквивалент) или параметра TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter) [18]. АОС биологических жидкостей в виде тролоксоевого эквивалента рассчитывается следующим образом:

$$АОС (мкмоль/л) = T/T_{трол} \cdot C_{трол} \cdot k,$$

где T и $T_{трол}$ – латентные периоды в присутствии биологической жидкости и тролокса соответственно, $C_{трол}$ – концентрация тролокса в мкмоль/л, k – коэффициент, учитывающий разведение биологической жидкости в модельной системе. В нашем исследовании значения АОС сыворотки крови и слезной жидкости добровольцев в тролоксоевом эквиваленте, полученные в системе «АБАП–люминол» с добавлением ЭДТА, составили $439,6 \pm 9,4$ мкмоль/л и $73,1 \pm 2,5$ мкмоль/л соответственно. Если эти значения умножить на 2 (т.е. $n_{трол}$), то получим АОС в виде концентрации RO_2^{\bullet} , перехваченных 1 л сыворотки крови или слезной жидкости, которую обозначают как TRAP.

Вопрос о том, что лучше брать для определения АОС – сыворотку или плазму крови – весьма важен с точки зрения получения корректных результатов анализа. В выполненном исследовании сравнение АОС сыворотки и плазмы крови не проводилось, поскольку была поставлена задача сравнения АОС сыворотки крови (без антикоагулянта) в системе с ЭДТА и без ЭДТА. В то же время имеются данные, свидетельствующие о том, что для определения АОС более предпочтительным является применение плазмы крови [5].

Предлагаемый модифицированный метод может быть использован для определения АОС тканей. Так, введение в систему с ЭДТА супернатанта гомогената печени крыс сопровождается появлением латентного периода хемилюминесценции и снижением интенсивности свечения (рис. 7). Для определения АОС гомогенаты готовили таким образом (см. раздел «Материалы и методы»), чтобы зависимость латентного периода хемилюминесценции от объема вводимого в систему супернатанта имела линейный характер (рис. 7, врезка). При расчете АОС необходимо учитывать не только разведение гомогената в модельной системе, но и процентное содержание ткани в гомогенате. Значение АОС печени интактных крыс

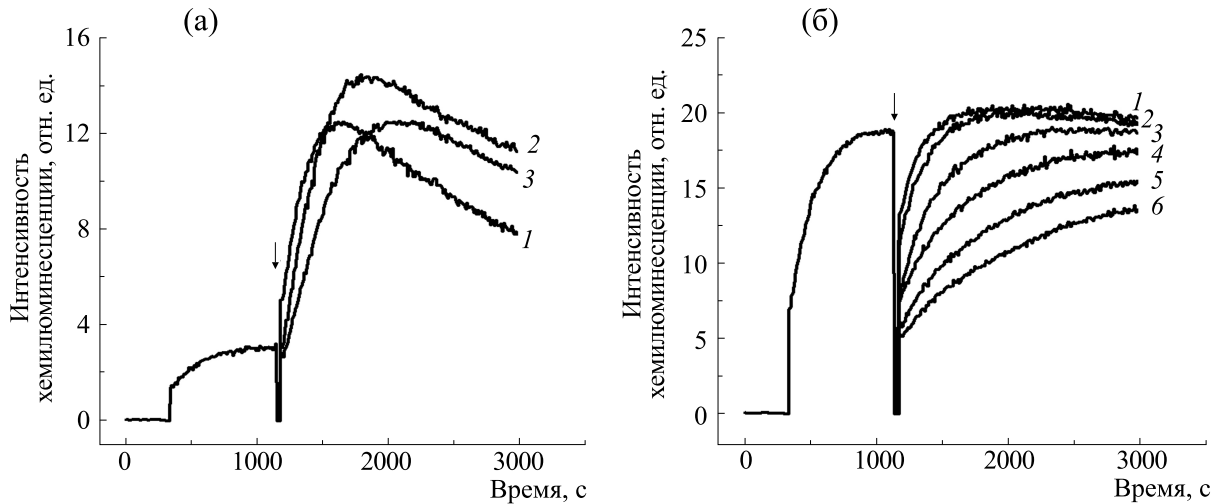


Рис. 4. Влияние САЧ на хемилюминесценцию системы «АБАП–люминол». (а) – Система без ЭДТА. Концентрации САЧ (мкг/мл): 1 – 26,7; 2 – 106,7; 3 – 213,3. (б) – Система с ЭДТА. Концентрации САЧ (мкг/мл): 1 – 26,7; 2 – 53,3; 3 – 106,7; 4 – 160,0; 5 – 213,3; 6 – 266,7. Стрелками отмечен момент введения САЧ. Конечные концентрации САЧ соответствуют тем, которые создаются при введении в модельную систему от 1 до 10 мкл сыворотки крови. В качестве среднего значения концентрации САЧ в сыворотке крови была принята величина 40 мг/мл.

составило $4,64 \pm 0,12$ мкмоль/г сырой ткани, что согласуется с результатами работы [25]. В отдельном исследовании нами было установлено снижение АОС печени крыс с экспериментальным острым гепатитом и нормализация этого показателя у крыс с гепатитом, получавших раствор лиофилизата водного извлечения из побегов караганы гривастой (*Caragana jubata* (Pall.) Poir.) [26].

Следует подчеркнуть, что при определении АОС биологического материала нет необходимости в получении зависимости латентного периода хемилюминесценции от объема для каждого анализируемого образца. Достаточно выбрать один объем, который заведомо соответствует линейной зависимости. В данном исследовании значения АОС сыворотки крови и слезной жидкости добровольцев, а также АОС печени были получены исходя из величин латентных периодов хемилюминесценции, регистрируемых при введении в систему соответственно 4 мкл сыворотки крови, 20 мкл слезной жидкости, 15 мкл супернатанта гомогенатов печени (рис. 3в; рис. 7, врезка).

В настоящее время не ясно, чем обусловлено изменение свойств системы «АБАП–люминол» в присутствии ЭДТА. Вместе с тем полученные результаты позволяют предположить, что ЭДТА не оказывает существенного влияния на реакции окисления люминола. Действительно, величины латентных периодов, регистрируемых при введении в систему низкомолекулярных антиоксидантов (тролокса и мочевой кислоты), а также биологических жидкостей человека (сыворотки крови, слезной жидкости) практически не отличались от

полученных в системе без ЭДТА. Поскольку латентные периоды хемилюминесценции в присутствии тролокса в системах без ЭДТА и с добавлением ЭДТА не различаются, близкие значения должны иметь и скорости продукции RO_2^{\bullet} на стадии стационарного свечения. Численно эти скорости равны скоростям убыли тролокса ($1/a_{\text{трол}}$), умноженным на стехиометрический фактор 2:

$$\omega = 2/a_{\text{трол}}$$

где $a_{\text{трол}}$ – значения коэффициентов a в уравнениях линейной регрессии, описывающих зависимости латентного периода от концентрации тролокса (рис. 2б).

Зная ω и скорости расходования различных антиоксидантов, можно рассчитать коэффициенты стехиометрии их взаимодействия с RO_2^{\bullet} . Значения этих коэффициентов для мочевой кислоты составили 2,04 (в системе с ЭДТА) и 2,02 (в системе без ЭДТА), для аскорбиновой кислоты – соответственно 0,76 и 0,62. Следует отметить, что в работах других авторов, использовавших систему «АБАП–люминол» без ЭДТА, значения этих коэффициентов для мочевой и аскорбиновой кислоты были соответственно равны 2,0 и 0,7 [20] и 2,05 и 0,75 [22]. Близкие значения коэффициентов стехиометрии говорят в пользу того, что присутствие ЭДТА не нарушает взаимодействия указанных антиоксидантов с RO_2^{\bullet} .

Антиоксидантная способность сыворотки/плазмы крови, определяемая с помощью системы «АБАП–люминол», зависит от содержания в ней отдельных антиоксидантов. Показано, что в норме средние вклады отдельных антиоксидантов

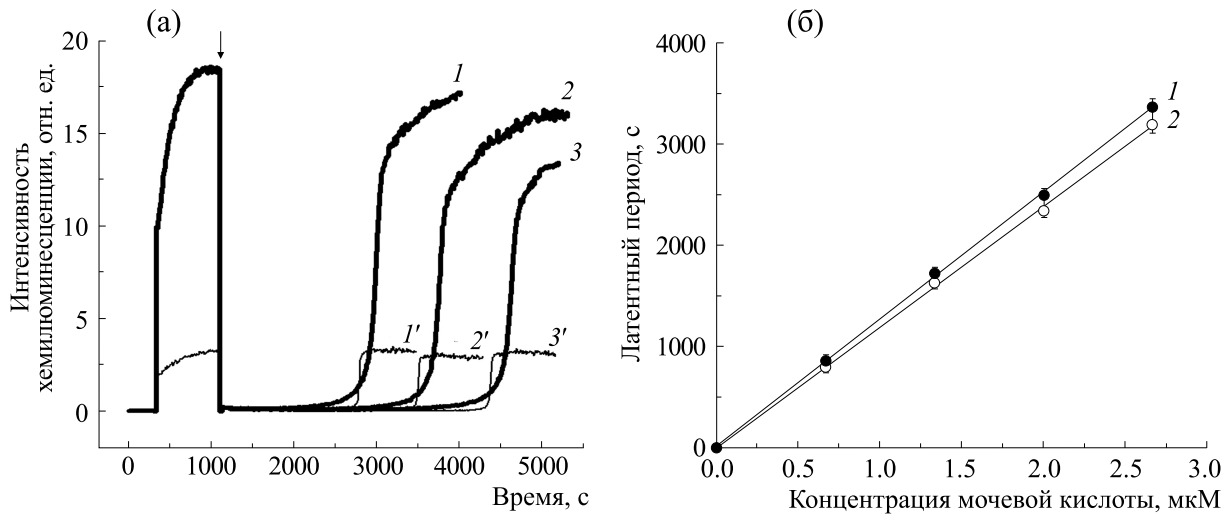


Рис. 5. Влияние мочевой кислоты на хемилюминесценцию системы «АБАП–люминол». (а) – Кинетики хемилюминесценции системы с ЭДТА (кривые 1–3) и без ЭДТА (кривые 1'–3'). Концентрации мочевой кислоты: 1, 1' – 1,33 мкМ; 2, 2' – 2 мкМ; 3, 3' – 2,67 мкМ. Стрелкой отмечен момент введения мочевой кислоты. (б) – Зависимости латентного периода хемилюминесценции системы с ЭДТА (1) и без ЭДТА (2) от концентрации мочевой кислоты. Уравнения прямых: (1) – $y = 1254,12x + 24,26$, $r^2 = 0,999$; (2) – $y = 1188,11x + 8,24$, $r^2 = 0,999$.

в АОС сыворотки/плазмы крови составляют: мочевая кислота – 43–53%, аскорбиновая кислота – 1–3%, витамин Е – 3%, SH-группы белков – 6–19%, неидентифицированные антиоксиданты – 34% [11, 22]. Несколько иные вклады представлены в работе [15]: мочевая кислота – 63,1%, аскорбиновая кислота – 26,3%, белки – 5,4%, неидентифицированные антиоксиданты – 5,2%. Видно, что наибольший вклад в АОС сыворотки/плазмы крови вносит мочевая кислота. По мнению некоторых

авторов, этот вклад является еще более значительным и может составлять основную часть ее антиоксидантного потенциала [19,23]. Что касается вклада в АОС неучтенных (или неидентифицированных) антиоксидантов, то его вычисляют по разности между измеренным и расчетным значением TRAP. Расчетное значение TRAP ($TRAP_{расчет}$) получают из уравнения [20, 22]:

$$TRAP_{расчет} = \sum n_i C_i,$$

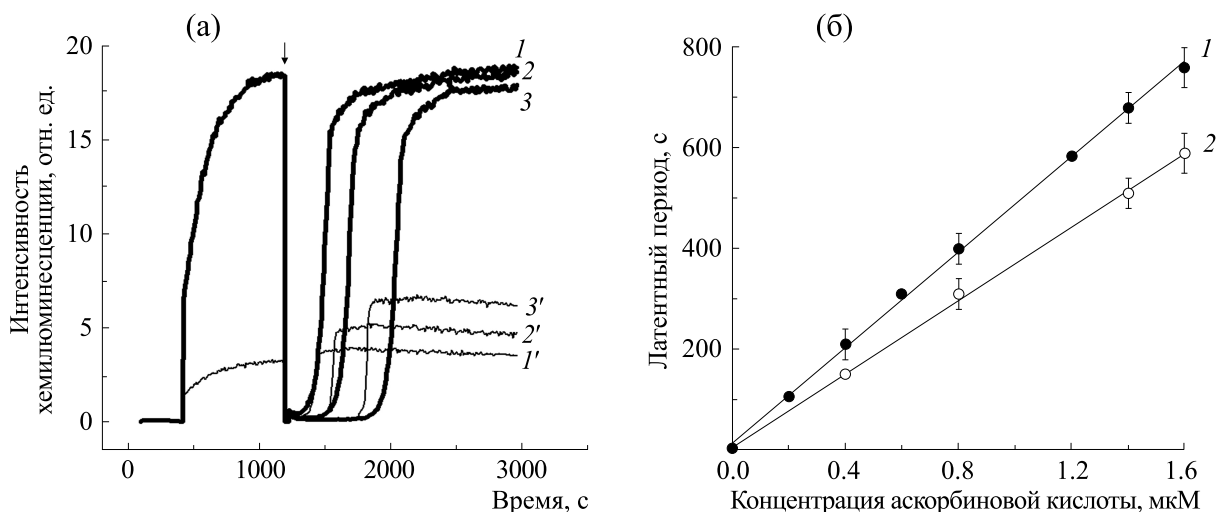


Рис. 6. Влияние аскорбиновой кислоты на хемилюминесценцию системы «АБАП–люминол». (а) – Кинетики хемилюминесценции системы с ЭДТА (кривые 1–3) и без ЭДТА (кривые 1'–3'). Концентрации аскорбиновой кислоты: 1, 1' – 0,4 мкМ; 2, 2' – 0,8 мкМ; 3, 3' – 1,6 мкМ. Стрелкой отмечен момент введения аскорбиновой кислоты. (б) – Зависимости латентного периода хемилюминесценции системы с ЭДТА (1) и без ЭДТА (2) от концентрации аскорбиновой кислоты. Уравнения прямых: (1) – $y = 474,42x + 13,58$, $r^2 = 0,999$; (2) – $y = 365,85x + 4,69$, $r^2 = 0,999$.

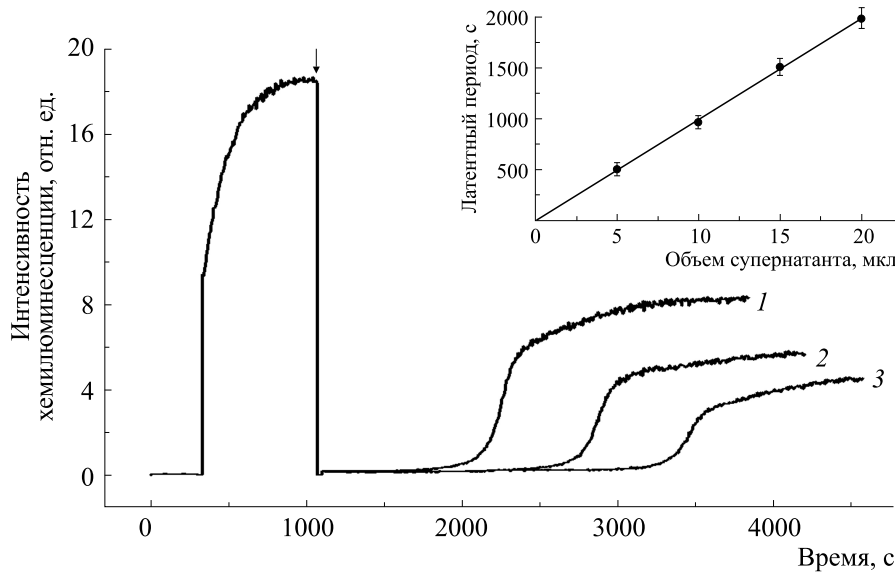


Рис. 7. Влияние разных объемов супернатанта гомогената печени крысы на хемилюминесценцию системы «АБАП–люминол» с ЭДТА: 1, 2, 3 – 10, 15 и 20 мкл соответственно. Стрелкой отмечен момент введения супернатанта. На врезке – зависимость латентного периода хемилюминесценции системы от объема супернатанта.

где n_i – коэффициент стехиометрии взаимодействия индивидуального антиоксиданта с RO_2^\bullet , C_i – концентрация антиоксиданта. Нельзя исключить, что величина этого вклада зависит не только от концентрации неучтенных антиоксидантов в сыворотке/плазме крови, но и от синергизма между отдельными радикальными ингибиторами. Развитие ряда заболеваний человека (свободнорадикальные патологии) сопровождается нарушениями в функционировании антиоксидантной системы организма, что приводит к изменениям в АОС сыворотки/плазмы крови [2]. С использованием системы «АБАП – люминол» было установлено снижение АОС сыворотки/плазмы крови при сепсисе [27], синдроме системного воспалительного ответа [11], хроническом гепатите С [28], увеличение этого показателя зарегистрировано при преэклампсии [22] и ВИЧ-инфекции [29]. На уровень АОС могут оказывать влияние как внешние, так и внутренние факторы [7]. Выявлено влияние возраста и пола на АОС плазмы крови. У женщин с возрастом наблюдалось существенное увеличение данного показателя, тогда как у мужчин после 74 лет имело место его значительное снижение. При этом наблюдаемые изменения АОС происходили за счет неучтенных антиоксидантов [20].

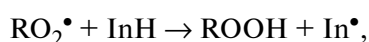
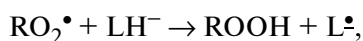
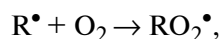
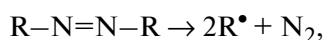
В отличие от сыворотки/плазмы крови, АОС слезной жидкости с применением системы «АБАП–люминол» не изучена. Наши данные показывают, что АОС слезной жидкости обследованных добровольцев в шесть раз меньше, чем АОС сыворотки ($p < 0,05$). В ряде публикаций

оценка АОС слезы была выполнена с использованием других методов. Выявлено уменьшение АОС слезной жидкости и плазмы крови у больных с III стадией глаукомы в 2,2 и 1,4 раза соответственно ($p < 0,01$) по сравнению со здоровыми лицами [30]. Полагают, что существенный вклад в АОС слезной жидкости вносят мочевиная и аскорбиновая кислоты [31,32]. Установлено, что на долю этих антиоксидантов приходилось около половины измеренной АОС слезы, при этом значительная корреляция наблюдалась между АОС слезной жидкости и содержанием в ней мочевиной кислоты [31].

Исследование АОС тканей крыс с использованием системы «АБАП – люминол» проводилось в работе [25]. Измеренная АОС увеличивалась в ряду: сердце – головной мозг – почки – печень. Для большинства тканей показано, что суммарный вклад глутатиона, мочевиной кислоты, аскорбиновой кислоты и α -токоферола составляет около 50% от измеренного значения TRAP. Остальные 50% приходятся на неучтенные антиоксиданты. Авторы полагают, что эта доля обусловлена главным образом белками.

Возникновение латентных периодов хемилюминесценции в системе «АБАП–люминол» при введении в нее биологических объектов (биологических жидкостей, супернатантов гомогенатов тканей, биологически активных веществ) определяется взаимодействием неферментативных антиоксидантов с радикалами-инициаторами окисления люминола. В этом случае механизм антиоксидантного действия заключается в переносе атома водорода (другой известный механизм –

перенос электрона) от антиоксиданта на RO_2^\bullet . Основные реакции, связанные с инициированием окисления люминола и ингибированием этого окисления, могут быть представлены следующим образом [8,18]:



где $R-N=N-R$ – молекула АБАП, R^\bullet – углерод-центрированный радикал, LH^- – молекула люминола, InH – молекула антиоксиданта, L^\bullet – радикал люминола, In^\bullet – радикал антиоксиданта. Если константа скорости взаимодействия антиоксиданта с RO_2^\bullet значительно выше константы скорости взаимодействия люминола (молекула-мишень) с этим радикалом, то при добавлении антиоксиданта в систему «АБАП–люминол» будет развиваться латентный период. Если упомянутые константы сравнимы по величине, то латентный период регистрироваться не будет [8], однако может наблюдаться снижение интенсивности хемилюминесценции. Такая ситуация, по-видимому, возникает при введении САЧ в систему «АБАП–люминол», содержащую ЭДТА. В наших условиях при добавлении САЧ латентный период не регистрировался. Вместе с тем имело место снижение интенсивности хемилюминесценции с повышением концентрации белка (рис. 4б), что, вероятно, обусловлено собственными антиоксидантными свойствами САЧ, связанными с наличием SH-группы. Следует также отметить, что *in vivo* САЧ осуществляет транспорт многих эндогенных и экзогенных субстратов – неорганических ионов, жирных кислот, билирубина, гормонов, лекарственных веществ и др. [33], некоторые из которых обладают антиоксидантной активностью. За счет этих веществ САЧ может вносить определенный вклад в величину измеряемого латентного периода при оценке АОС сыворотки крови. К таким веществам, по-видимому, относятся билирубин. Установлено, что билирубин, связанный с САЧ, обладает антиоксидантными свойствами и оказывает влияние на ее общую АОС [11,34].

Кинетическая кривая, регистрируемая после введения в систему «АБАП–люминол–ЭДТА» биологического материала, является результатом совместного действия всех антиоксидантов, содержащихся в образце. Поскольку латентный период обусловлен действием только части антиоксидантов (главным образом низкомолекулярных), дальнейшие исследования в плане повышения информативности метода могут быть

направлены на оценку площади над кинетической кривой хемилюминесценции, отражающей суммарную радикалперехватывающую активность как низкомолекулярных антиоксидантов, так и белков, входящих в состав биологического образца.

Предложенный в настоящем исследовании модифицированный метод определения АОС биологических жидкостей и тканей на основе системы «АБАП–люминол–ЭДТА» имеет ряд преимуществ по сравнению с применением аналогичной системы без ЭДТА. К ним относятся: высокая интенсивность хемилюминесценции на стадии стационарного свечения, длительная фаза стационарного свечения, отсутствие значительного усиления свечения после завершения латентного периода, вызванного добавлением биологических жидкостей или отдельных антиоксидантов, возможность исследования биологических материалов, стабилизированных ЭДТА. Для анализа требуются микроколичества биологических материалов. Метод является универсальным и может использоваться в клинических и экспериментальных исследованиях.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От всех участников предварительно было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Cízová, A. Lojek, L. Kubala, and M. Cíz, *Physiol. Res.* **53** (5), 523 (2004).
2. G. Bartosz, *Free Radic. Res.* **44** (7), 711 (2010).
3. T. Kőszegi, N. Sali, M. Raknić, et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **88** (Pt 2), 153 (2017).
4. D. L. Hughes, R. S. Richards, and L. A. Lexis, *Luminescence* **33** (4), 764 (2018).
5. A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella, and C. Scaccini, *Free Radic. Biol. Med.* **29** (11), 1106 (2000).
6. И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин, А. В. Асейчев и Б. Х. Ягмуров, *Вопр. питания* **68** (3), 9 (1999).
7. I. N. Popov and G. Lewin, *Biophysics* **58** (5), 669 (2013).
8. R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, *J. Agric. Food Chem.* **64** (5), 997 (2016).
9. R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, *J. Agric. Food Chem.* **64** (5), 1028 (2016).
10. Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова, О. Б. Любицкий и др., *Вопр. мед. химии* **44** (1), 70 (1998).

11. K. Tsai, T. Hsu, C. Kong, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **28** (6), 926 (2000).
12. L. Saleh and C. Plieth, *Nat. Protoc.* **5** (10), 1627 (2010).
13. L. Saleh and C. Plieth, *Nat. Protoc.* **5** (10), 1635 (2010).
14. E. Plotnikov, E. Korotkova, O. Voronova, et al., *Arch. Med. Sci.* **12** (5), 1071 (2016).
15. I. Popov and G. Lewin, *Luminescence* **20**, 321 (2005).
16. S. R. Maxwell, T. Dietrich, and I. L. Chapple, *Clin. Chim. Acta* **372** (1-2), 188 (2006).
17. M. T. Dresch, S. B. Rossato, V. D. Kappel, et al., *Anal. Biochem.* **385** (1), 107 (2009).
18. L. M. Magalhaes, M. A. Segundo, S. Reis, and J. L. Lima, *Anal. Chim. Acta* **613** (1), 1 (2008).
19. E. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, and M. D. del Castillo, *Free Radic. Biol. Med.* **18** (2), 153 (1995).
20. R. T. Aejmelaeus, P. Holm, U. Kaukinen, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **23** (1), 69 (1997).
21. V. N. Titov and N. N. Sazhina, *Bull. Exp. Biol. Med.* **158** (2), 287 (2014).
22. J. T. Uotila, A. L. Kirkkola, M. Rorarius, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **16** (5), 581 (1994).
23. M. M. Sozarukova, A. M. Polimova, E. V. Proskurnina, and Yu. A. Vladimirov, *Biophysics* **61** (2), 284 (2016).
24. D. D. M. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **924**, 408 (1987).
25. P. Evelson, M. Travacio, M. Repetto, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **388** (2), 261 (2001).
26. П. А. Какорин, И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин и др., *Биомед. химия* **64** (3), 241 (2018).
27. C. Pascual and K. Reinhart, *Luminescence* **14** (2), 83 (1999).
28. D. Venturini, A. N. Simão, D. S. Barbosa, et al., *Dig. Dis. Sci.* **55** (4), 1120 (2010).
29. M. Repetto, C. Reides, M. L. Gomez Carretero, et al., *Clin. Chim. Acta* **255** (2), 107 (1996).
30. Н. В. Макашова, И. В. Бабенкова и Ю. О. Теселкин, *Вестн. офтальмологии* **115** (5), 3 (1999).
31. C. K. Choy, I. F. Benzie, and P. Cho, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41** (11), 3293 (2000).
32. J. Horwath-Winter, S. Kirchengast, A. Meinitzer, et al., *Acta Ophthalmol.* **87** (2), 188 (2009).
33. S. Arques, *Eur. J. Intern. Med.* **52**, 8 (2018).
34. P. D. MacLean, E. C. Drake, L. Ross, and C. Barclay, *Free Radic. Biol. Med.* **43** (4), 600 (2007).

Modified Chemiluminescent Method for Determination of Antioxidant Capacity of Biological Fluids and Tissues

Yu. O. Teselkin, I. V. Babenkova, and A. N. Osipov

Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

In this study, we presented the modified method for determination of antioxidant capacity of biological fluids and tissues based on the use of a chemiluminescent model system in which oxidation of luminol was induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride. It is shown that the addition of EDTA as an extra component gives the system a number of advantages. The intensity of chemiluminescence at the stationary stage is increased substantially (by 6–7 times), stationarity remains unchanged for a long time (more than one hour). Besides, it should be noted that no significant increase in the intensity of chemiluminescence occurred in the presence of biological fluids or individual antioxidants (human serum albumin, ascorbic acid) after the end of the latent period but it was observed in the absence of EDTA. Taking into account that the values of latent periods, which were determined while introducing some low molecular weight antioxidants (trolox, uric acid), as well as human biological fluids (blood serum, tear fluid) into our system, were not significantly different from those obtained in the system without EDTA, we suppose that EDTA has no impact on luminol oxidation reactions. The proposed system can also be used to evaluate antioxidant capacity of various tissues. The obtained data are discussed in terms of prospects for the use of the proposed modified method for determination of antioxidant capacity of biological material in clinical practice.

Keywords: oxidative stress, antioxidants, antioxidant capacity, blood serum, tear fluid, chemiluminescence