

БИОФИЗИКА

УДК 577.3

А. Е. Закарян, З. А. Закарян, член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян

Различные методы хемилюминесцентного анализа в оценке уровня свободнорадикального перекисного окисления липопротеинов сыворотки крови человека при развитии патологических процессов в организме

(Представлено 5/IX 2011)

Ключевые слова: *хемилюминесценция, фото-хемилюминесценция, электро-хемилюминесценция, перекисное окисление липопротеинов, свободные радикалы, антиоксиданты, сыворотка крови, патологические процессы, панкреатит, опухоли*

В настоящее время имеется значительное количество данных, указывающих на то, что одним из важнейших звеньев многих патологических процессов является развитие свободнорадикальных реакций, приводящих к повышению уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и липидсодержащих, в том числе мембранных, структур [1-3]. Применение новых биофизических подходов к оценке ПОЛ позволяет достаточно четко выяснить этиологию, природу патологии и динамику болезни [4, 5].

В организме ПОЛ регулируется биоантиоксидантной системой (БАО), и поэтому в нормальных физиологических условиях эти процессы находятся в равновесном состоянии в виде: $ПОЛ \rightleftharpoons БАО$. Такая регуляция позволяет поддерживать уровень свободнорадикальных окислительных процессов в стационарном режиме [3]. Однако при многих патологических процессах наблюдается активация воспалительных реакций, при которых изменяется уровень ПОЛ, что сопровождается хемилюминесценцией (ХЛ) [5].

Для изучения ПОЛ наряду с определением малонового диальдегида (МДА) – основного конечного продукта ПОЛ широко применяются методы анализа ХЛ, в частности

индуцированной химическими факторами [4]. Развитие методов анализа ХЛ привело к сочетанию спонтанной (СХЛ), фото- (ФХЛ) и электро- (ЭХЛ) ХЛ в оценке уровня ПОЛ.

В настоящей работе показана возможность сочетания различных методов ХЛ в оценке уровня ПОЛ сыворотки крови человека при различных патологиях, в частности при панкреатите и доброкачественных и злокачественных опухолях.

Материал и метод исследования. Материалом исследования служила сыворотка крови 57 человек разного возраста, в том числе: 14 практически здоровых, 12 больных с хроническим панкреатитом, 11 с острой формой панкреатита, 9 со злокачественными и 12 с доброкачественными опухолями. Для получения сыворотки кровь центрифугировали в течение 10 мин при $4.5 \cdot 10^3$ об/мин.

Регистрацию ХЛ проводили на квантометрической установке с применением новых электронных узлов и усилительных схем [6, 7]. В качестве детектора слабых световых потоков применяли фотоэлектронный умножитель ФЭУ-140, работающий в режиме постоянного охлаждения для снижения уровня тепловых шумов фотокатода. Поддержание заданной температуры исследуемых образцов в измерительной ячейке с точностью ± 5 °С осуществляли с помощью системы с автоматическим электронным управлением.

СХЛ регистрировали в образцах сыворотки крови (2.5 мл), помещенных в измерительную ячейку (оптическую кювету) перед фотокатодом. ФХЛ изучали в образцах сыворотки с открытой поверхностью, облученных с помощью ультрафиолетовой лампы ПРК-4 в течение 1 мин на расстоянии 5 см от центра источника излучения. Облученные образцы перемещали в измерительную ячейку полуавтоматическим способом в течение 1-2 с. ЭХЛ определяли по методике, описанной ранее [8, 9]. Для этого к 0.3 мл испытуемой сыворотки в измерительной ячейке добавляли 3 мл 0.1 М КСl и затем в ячейку помещали точечные платиновые электроды типа ЭПВ-01, расстояние между которыми составляло 10 мм. На электроды подавалось постоянное напряжение в 10 мВ при токе силой в 100 мА. Кинетику ХЛ регистрировали с помощью самопишущего потенциометра.

Интенсивность ПОЛ определяли спектрофотометрическим методом с помощью 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК) [10]. К образцу добавляли 2 мл 20 % водного раствора трихлоруксусной кислоты, 0.1 мл этанолового раствора ионола (0.1 мМ) и 1.0 мл 0.5 % водного раствора ТБК. Пробы инкубировали в течение 15 мин при 95-100 °С на водяной бане. Затем их охлаждали в токе холодной воды и измеряли оптическую плотность на

спектрофотометре СФ-46 при длине волны 532 нм; измерение проводили при длине оптического пути в 1 см. Контрольным образцом являлась проба, содержащая все перечисленные выше компоненты, кроме сыворотки. Количество ТБК-реактивных продуктов выражали через эквивалентное количество МДА, принимая коэффициент молярной экстинкции равным $1.56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1}$.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по ингибированию супероксидных анион-радикалов в модельной системе феназинметасульфат-НАДН-нитротетразолий синий [9]. Определение α -токоферола (α -ТФ) проводили по методике [11]. Количество α -ТФ рассчитывали по стандартной калибровочной кривой и выражали в мг.

Содержание диеновых конъюгантов (ДК) определяли в гексановой фазе спектрофотометрически при длине волны 233 нм, количество ДК рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции в $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и выражали в нМ на мг белка [12]. Белок в образцах определяли по методике Лоури [13], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Использовались реактивы аналитической чистоты. Приводятся средние данные, стандартная ошибка которых не превышает 12 %. Для оценки разницы между контролем и образцами определяли критерий достоверности Стьюдента (p).

Результаты и обсуждение. При изучении СХЛ и ФХЛ сыворотки крови при комнатной температуре удалось показать, что интенсивность как СХЛ, так и ФХЛ сыворотки крови практически здоровых людей ниже по сравнению с таковыми при наличии патологических процессов ($p < 0.001$) (рис. 1,А). На рисунке можно заметить и разницу между СХЛ и ФХЛ для сыворотки крови при наличии разных форм патологии. Идентичная закономерность, наблюдаемая между СХЛ и ФХЛ сыворотки крови, возможно, обусловлена липопротеиновым составом исследуемых образцов. В этом случае эмитерами излучения света для СХЛ являются липидные компоненты липопротеинов сыворотки в целом, а при ФХЛ – белковые компоненты сыворотки [14]. Можно предположить, что при развитии патологических процессов в организме усиливаются воспалительные процессы и в связи с этим наблюдается и интенсификация ПОЛ. Не исключено также, что в кровь могут выделяться различные токсические вещества, которые являются прооксидантами и усиливают окислительные процессы, приводящие к интенсификации ХЛ сыворотки крови.

Подобные результаты были получены и при изучении ЭХЛ испытуемых образцов сыворотки крови (рис. 1, Б). Из рисунка видно, что интенсивность ЭХЛ во много раз выше по сравнению с СХЛ. В этом случае также заметно выше интенсивность суммарной ХЛ патологических образцов сыворотки крови по сравнению с контролем ($p < 0.001$), причем она неодинакова для разных форм патологии.

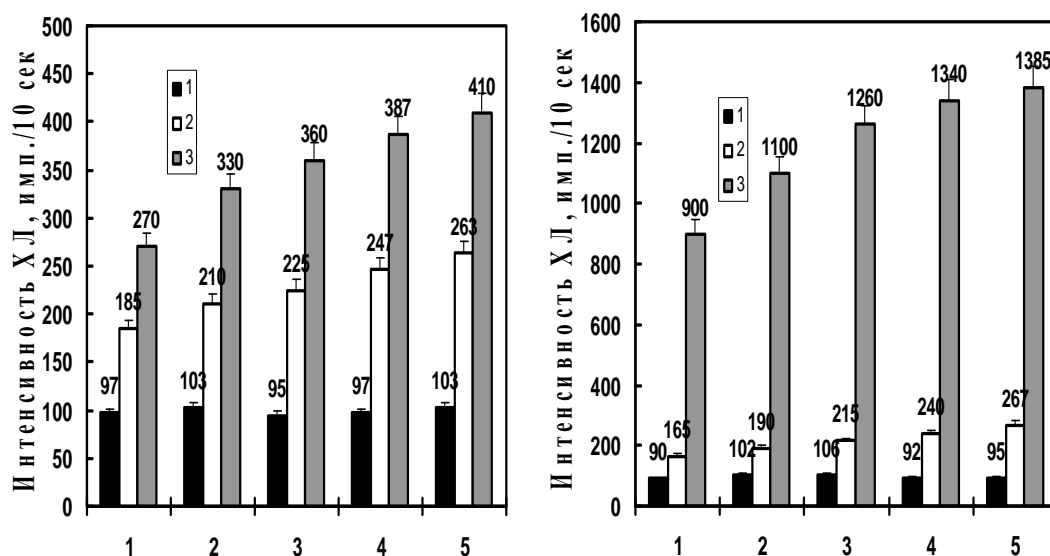


Рис. 1. Показатели СХЛ и ФХЛ (А) и ЭХЛ (Б) образцов сыворотки крови человека в норме и при патологии. Колонки: I – фон установки, II – СХЛ, III – ФХЛ (А) или ЭХЛ (Б). По группам: 1 – сыворотка донорской крови, 2 – сыворотка крови больных хроническим панкреатитом, 3 – сыворотка крови больных острой формой панкреатита, 4 – сыворотка крови больных с доброкачественными опухолями, 5 – сыворотка крови больных со злокачественными опухолями.

Из приведенного экспериментального материала по изучению СХЛ, ФХЛ и ЭХЛ сыворотки крови в норме и при патологии в организме человека можно заключить, что уровень интенсивности излучения квантов света изучаемых образцов заметно различен при патологических состояниях, что обусловлено неодинаково протекающими свободнорадикальными окислительными процессами в липидсодержащих структурах сыворотки.

С целью частичной проверки сделанного вывода и приведенных доводов были определены различные показатели ПОЛ в образцах сыворотки крови в норме и при вышеуказанных патологиях (табл. 1). Из таблицы видно, что продукты ПОЛ – МДА и ДК при наличии патологических процессов в организме человека увеличиваются в сравнении с

контролем, наблюдается также снижение уровня α -ТФ и падение активности СОД. При этом при наличии патологии содержание белка в образцах сыворотки крови заметно увеличивается.

Таким образом, полученные результаты можно интерпретировать с точки зрения усиления процессов ПОЛ при развитии патологических процессов в организме человека, во время которых происходит активация свободнорадикальных окислительных процессов с образованием перекисных радикалов, ответственных за излучение квантов света (ХЛ) [1-4, 7, 14].

Таблица 1

Показатели ПОЛ сыворотки крови человека в норме и при некоторых патологиях

Образцы Показатели ПОЛ	Сыворотка донорской крови, N = 15	Сыворотка крови больных хроническим панкреатитом, N = 14	Сыворотка крови больных острой формой панкреатита, N = 12	Сыворотка крови больных злокачест- венными опухолями, N = 13
МДА, мкМ/мл	6.4 ± 0.7	6.9 ± 0.8	7.6 ± 0.4	7.9 ± 0.4
МДА, мкМ/мг белка	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.08	0.13 ± 0.07	0.14 ± 0.04
ДК, мкМ/мл	8.9 ± 0.9	9.6 ± 0.9	11.0 ± 1.1	11.4 ± 2.4
α -ТК, мг	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.08	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Активность СОД, усл.ед./ мл	9.9 ± 1.2	9.1 ± 1.5	8.7 ± 2.4	8.4 ± 1.8
Активность СОД, усл.ед./ мг белка	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.17 ± 0.06	0.6 ± 0.08
Белок, мг/мл	65.0 ± 5.6	87.0 ± 11.3	91.0 ± 4.2	94.0 ± 7,4

Эти результаты указывают на однозначность различных видов ХЛ – СХЛ, ФХЛ или ЭХЛ в оценке уровня ПОЛ в норме и при развитии различных патологических процессов. При

этом большая интенсивность и четкая разница между нормой и развитием патологических процессов получена при использовании ЭХЛ, что может быть использовано в клиническом анализе.

Ереванский государственный университет

А. Е. Закарян, З. А. Закарян, член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян

Различные методы хемилюменесцентного анализа в оценке уровня свободнорадикального перекисного окисления липопротеинов сыворотки крови человека при развитии патологических процессов в организме

Определена интенсивность различных видов спонтанной, фото- и электрохемилюменесценции сыворотки крови человека. Выявлена заметная разница интенсивности в норме и при развитии различных патологических процессов в организме. Предполагается, что такая разница обусловлена активацией свободнорадикальных окислительных процессов с образованием радикалов при перекисном окислении липопротеинов, ответственных за излучение квантов света. Изменение уровня перекисного окисления липопротеинов подтверждено определением малонового диальдегида, диеновых конъюгантов, а также α -токоферола и активности супероксиддисмутазы.

Ա. Ե. Չաքարյան, Յ. Ա. Չաքարյան, ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Ա. Ա. Թոշունյան

Քեմիլյումենեսցենցիայի վերլուծության տարբեր մեթոդները մարդու արյան շիճուկի լիպոպրոտեինների ազատառիկալային գերօքսիդային օքսիդացման մակարդակի գնահատման մեջ օրգանիզմում ախտաբանական գործընթացների զարգացման ժամանակ

Որոշվել է մարդու արյան շիճուկի տարբեր ձևերի՝ ինքնաբուխ, ֆոտո- և էլեկտրաքեմիլյումենեսցենցիայի ուժգնությունը: Բացահայտված է օրգանիզմում բնականոն պայմաններում և տարբեր ախտաբանական գործընթացների զարգացման ժամանակ ուժգնության

Էական տարբերությունը: Ենթադրվում է, որ այդ տարբերությունը պայմանավորված է ազատռադիկալային օքսիդային գործընթացների ակտիվացմամբ՝ Լիպոպրոտեինների գերօքսիդային օքսիդացման ընթացքում ռադիկալների առաջացմամբ, որոնք պատասխանատու են լույսի քվանտների արձակման համար: Լիպոպրոտեինների գերօքսիդային օքսիդացման մակարդակի փոփոխությունը հաստատված է մալոնային երկալդեհիդի, դիենային կոնյուգատների, ինչպես նաև α -տոկոֆերոլի քանակների և սուպերօքսիդիսմատազի ակտիվության որոշմամբ:

A. E. Zagaryan, Z. A. Zagaryan, corresponding member of NAS RA A. A. Trchounian

Chemiluminescent Analysis Different Methods in Evaluation of Lipoproteins Free Radical Superoxide Oxidation of Human Blood Serum during Different Pathological Processes Development in Organism

Different forms of spontaneous, photo- and electro-chemiluminescence intensity was determined for human blood serum. The marked difference in intensity was revealed between normal and pathological processes development states in organism. It is suggested that the difference could be caused by lipoproteins free radical oxidation processes development with formation of radicals which are responsible for emission of light quants. Lipoproteins superoxide oxidation level change was confirmed by determination of malone dialdehyde, dien conjugates as well as tokopherol and activity of superoxide dismutase.

Литература

1. *Голиков П.П., Давыдов Б.Б., Матвеев С.Б.* - *Вопр. мед. химии.* 1987. Т. 33. С. 47-50.
2. *Киреев Г.В., Бекназаров З., Колоярова Н.Е., Ходжаев А.В., Шарипов Ф.К.* - *Клинич. лабораторн. диагностика.* 2003. N 5. С. 13-15.
3. *Закарян А.Е., Неркарарян А.В., Погосян Г.А., Айвазян Н. М.* *Биофизика свободнорадикальных процессов и мембранных структур.* Ереван. 2003. 215 с. (на арм. яз).

4. *Halliwell B., Gutteridge J. M.* Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford: University Press. 1999. 783 p.
5. *Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K.* - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. V. 46. P. 849-853.
6. *Закарян А.Е., Элбакян В.Л., Айвазян Н.М., Погосян Г.А., Закарян Н.А., Сеферян Т.Е., Трчунян А.А.* В: Материалы Междунар. научно-практ. конф. «Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LABVIEW и технологии National Instruments». М. 2006. С. 429-432.
7. *Zakharyan A.E., Seferyan T.Ye.* In: The Intern. Conf. on Systems Biology, Long Beach, CA USA. 2007.
8. *Владимиров Ю.А.* - Патол. физиол. и эксперимент. терапия. 1989. Т. 4. С. 7-19.
9. *Федорова Т.Н., Болдырев А.А., Ганнушкина И.В.* – Биохимия. 1999. Т. 64. N 1. С. 94-98.
10. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В.Н.). М. Медицина. 1977. С. 66-68.
11. *Duggan D.D.* - Arch. Biochem. Biophys. 1954. V. 84. N 1. P. 116-126.
12. *Барабой В.А., Сутковой Д.А.* Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. Киев. Наукова думка 1997. 420 с.
13. *Lowry O.H., Rosenbrough H.J., Farr A.L.* - J. Biol. Chem. 1951. V. 193 P. 265-275.
14. *Журавлев А.И.* - Тр. МОИП. 1997. Т. 58. С. 3-30.