

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ  
ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСА**

Учебно-методическое пособие для вузов

Издательско-полиграфический центр  
Воронежского государственного университета  
2009

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Методы оценки интенсивности протекания процессов свободнорадикального окисления	6
Определение параметров биохемилюминесценции	6
Определение уровня первичных продуктов пероксидного окисления липидов	7
Определение уровня вторичных продуктов пероксидного окисления липидов	9
Оценка окислительной модификации белков	10
Оценка степени фрагментации ДНК	13
Определение активности аконитатгидратазы	16
Методы оценки активности антиоксидантной системы организма	18
Определение активности супероксиддисмутазы и каталазы	19
Определение функциональной активности глутатионовой антиоксидантной системы	22
Определение активности ферментов – основных поставщиков НАДФН для работы глутатионовой антиоксидантной системы	28
Определение уровня цитрата и активности цитратсинтазы	30
Оценка уровня токоферола	34
Некоторые подходы для оценки степени развития патологических процессов	37
Определение активностей ферментов – показателей цитоллиза гепатоцитов и кардиомиоцитов	37
Оценка состояния энергетического обмена в ткани головного мозга: определение уровня лактата и пирувата	46
Список литературы	51
Приложение. Некоторые экспериментальные модели патологических состояний	60

# МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОТЕКАНИЯ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

## Определение параметров биохемилюминесценции

Метод биохемилюминесценции (БХЛ) может применяться в клинической биохимии для выявления нарушений липидного обмена (гипо- и гиперлипопротеинемий), воспалительных заболеваний, инфекционных и онкологических заболеваний [Азизова О.А., 2001]. В клинических условиях определение БХЛ может быть применено в нескольких направлениях:

- определение формы заболевания. При острой форме заболевания уровень БХЛ в 5 и более раз превышает значения нормы, при хронической только в 2–3 раза;
- оценка интенсивности СРО для системной антиоксидантной терапии;
- определение степени тяжести болезни по динамике значений БХЛ;
- оценка степени завершенности патологического процесса по нормализации показателей БХЛ;
- выявление возможности летального исхода послеоперационных больных (происходит резкое снижение интенсивности БХЛ);
- оценка безопасности проведения лазеро-, фото- и озонотерапии.

Для определения интенсивности свободнорадикальных процессов применяют метод индуцированной БХЛ. БХЛ индуцируют пероксидом водорода с сульфатом железа.

Принцип метода основан на том, что в представленной системе происходит каталитическое разложение перекиси ионами металла с переходной валентностью –  $\text{Fe}^{2+}$ , по реакции Фентона. Образующиеся при этом свободные радикалы ( $\text{R}^*$ ,  $\text{OH}^*$ ,  $\text{RO}^*$ ,  $\text{RO}_2^*$ ,  $\text{O}_2^*$ ) вступают в процесс инициации свободнорадикального окисления в исследуемом биологическом субстрате. Рекомбинация радикалов  $\text{RO}_2^*$  приводит к образованию неустойчивого тетроксидов, распадающегося с выделением кванта света. Интенсивность свободнорадикальных процессов определяют на биохемилюминометре с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрируют в течение 30 с и определяют следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки ( $I_{\max}$ ), характеризующие интенсивность свободнорадикальных процессов, а также величину тангенса угла наклона кривой ( $\text{tg } \alpha_2$ ), характеризующую общую антиоксидантную активность [Кузьменко Д.Н., 1999]. Антиоксидантный потенциал обследуемой пробы также коррелирует с коэффициентом K, определенным по от-

ношению  $I_{\max}/S$ . На интенсивность исследуемого процесса оказывает влияние полный комплекс соединений, обладающих как антиоксидантными, так и прооксидантными действиями, то есть метод дает возможность оценить уровень компенсаторных механизмов свободно-радикального процесса в организме.

Среда для определения интенсивности БХЛ имеет следующий состав: 0,4 мл 0,02 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ  $\text{FeSO}_4$ , 0,2 мл 2%-го раствора пероксида водорода (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый материал вносят в количестве 0,1 мл непосредственно перед измерением до внесения пероксида водорода.

### Определение уровня первичных продуктов пероксидного окисления липидов

Принято считать, что важнейшую роль в организме млекопитающих играет свободнорадикальное (пероксидное) окисление липидов. По-видимому, это связано с тем, что АФК имеют наиболее высокую константу взаимодействия с полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), являющимися основным структурным компонентом фосфолипидов мембран (Владимиров Ю.А., 1972).

Пероксидное окисление липидов (ПОЛ) представляет собой процесс непосредственного переноса кислорода на субстрат с образованием перекисей, кетонов, альдегидов и других соединений. Отличительной чертой этой реакции является ее цепной, самоиндуцирующийся характер. Реакция протекает в несколько стадий, которые получили название «инициирование», «продолжение», «разветвление» и «обрыв» цепи (табл. 1).

Таблица 1

*Основные этапы пероксидного окисления липидов*

Стадия процесса	Химические реакции
Инициация	$\text{HO}^\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{L}^\bullet$
Продолжение	$\text{L}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^\bullet$ $\text{LOO}^\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}^\bullet$
Разветвление	$\text{Fe}^{2+} + \text{LOOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{LO}^\bullet$ $\text{LO}^\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{LOH} + \text{L}^\bullet$ ; $\text{L}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^\bullet$ и т.д.
Обрыв	$\text{LOO}^\bullet + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \text{LOOH}$ $\text{LOO}^\bullet + \text{AnH} \rightarrow \text{An}^\bullet$ $\text{LOO}^\bullet + \text{LOO}^\bullet \rightarrow \text{молекулярные продукты}$

Биологические последствия ПОЛ связаны с повреждением белковых структур (мембранных белков) и липидного бислоя мембран в целом. Для оценки интенсивности процессов ПОЛ в биосубстратах используют методы определения ряда его продуктов. Так, к первичным продуктам ПОЛ относят диеновые конъюгаты. Поскольку наиболее легко отрывается атом водорода от углерода, находящегося в альфа-положении по отношению к двойной связи в молекуле ненасыщенной жирной кислоты, то при делокализации неспаренного электрона в молекулах жирнокислотных остатков появляется система сопряженных двойных связей, т. е. возникают конъюгированные диены. Данные соединения легко взаимодействуют с кислородом с образованием перекисных радикалов, а в дальнейшем и гидроперекисей. Содержание диеновых конъюгатов определяют спектрофотометрическим методом.

Принцип метода состоит в том, что образование в молекуле полиненасыщенных жирных кислот сопряженных двойных связей (конъюгированных диенов) сопровождается появлением в спектре их поглощения максимума в области 232–234 нм с плечом в области 260–280 нм, соответствующим сопряженным кетодиенам (Стальная И.Д., 1977).

Ход работы. 0,25 мл исследуемого материала растирают в течение 15 мин в гомогенизаторе Поттера–Эльвегейма с 9 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в соотношении 1 : 1. Полученную суспензию помещают в плотно закрывающиеся полиэтиленовые пробирки. Пробы центрифугируют при 4000g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносят в градуированные пробирки и добавляют 1/10 объема дистиллированной воды. После двукратного встряхивания и расслаивания фаз отбирают гептановую фазу. К равным объемам по 0,5 мл приливают этиловый спирт в объемном отношении 1 : 5 – 1 : 10. Измеряют экстинкцию при 233 нм. В качестве контроля используют пробы, содержащие только экстрагирующую фазу или вместо 1 мл супернатанта 1 мл 0,1 моль/л фосфатного буфера (рН 7,6). Содержание диеновых конъюгатов рассчитывают по следующей формуле:

$$[ДК] = \frac{V_{\text{общ}} \times D}{L \times E \times V_{\text{внес}}},$$

где [ДК] – концентрация диеновых конъюгатов, мкМ/г;  $V_{\text{общ}}$  – объем полученного образца, мл;  $D$  – величина оптической плотности, ед.;  $L$  – длина оптического пути, см;  $E$  – коэффициент молярной экстинкции, равный  $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ;  $V_{\text{внес}}$  – объем вносимой пробы, мл.