

Герасимова Елена Леонидовна

**ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ
АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

02.00.02 — Аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань — 2010

Работа выполнена на кафедре физики и химии
Уральского государственного экономического университета

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: доктор химических наук,
профессор Брайнина Х.З.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор химических наук,
профессор Будников Г.К.
доктор химических наук,
профессор Короткова Е.И.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Уральский государственный
университет им. А.М. Горького

Защита состоится 1 июля 2010 года в 10:00 на заседании Диссертационного совета Д 212.081.03 по химическим наукам при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, КГУ, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета. С авторефератом можно ознакомиться на сайте КГУ (www.ksu.ru).

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская 18, Казанский государственный университет, Научная часть, или по электронной почте kazymova@ksu.ru

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2010 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

М.А. Казымова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Активные формы кислорода (АФК) играют двойственную биологическую роль в организме человека. АФК являются необходимым элементом фагоцитоза, при котором происходит разрушение поврежденных, старых, иммунологически несовместимых или злокачественных клеток и клеток, пораженных вирусами. Кроме того, благодаря высокой химической активности АФК выполняют функцию сигнальных внутриклеточных трансдьюсеров и межклеточных медиаторов. Однако, при воздействии ряда неблагоприятных факторов, наблюдается избыточное образование АФК. Его патологические последствия проявляются при чрезмерном накоплении АФК и продуктов окисления биомолекул – состоянии, называемом окислительным стрессом. Факторы, вызывающие окислительный стресс, различны, но все они приводят к окислительной модификации макромолекул, т.е. повреждению ДНК, белков, липидов и т.д.

В здоровом организме сохраняется равновесие в системе окислители-антиоксиданты. Поддержание окислительно-восстановительных реакций на стационарном уровне обеспечивается действием согласованной антиоксидантной системы. Для коррекции состояния антиоксидантной системы необходима информация о наличии и интенсивности окислительного стресса, что может быть сделано путем оценки антиоксидантной активности (АОА) различных биологических сред.

Существует ряд методов оценки состояния антиоксидантной системы. Основными из них являются: определение радикальной активности, продуктов перекисного окисления макромолекул, индивидуальных антиоксидантов (АО) (ферментативных и неферментативных) и оценка интегральной антиоксидантной активности. Сложность методик и аппаратуры, возможность использования только для анализа неокрашенных жидкостей, отсутствие единого терминологического подхода, неоднозначность данных препятствуют их применению в медицинской экспресс-диагностике.

Наиболее доступными и экспрессными методами оценки АОА являются электрохимические методы. Кроме преимуществ, связанных с доступностью, низкой стоимостью аппаратуры и реактивов, они позволяют напрямую оценить электронно-донорно-акцепторные свойства исследуемой системы, т.е. свойства определяющие, антиоксидант/окислительный баланс организма.

В представленной работе в качестве метода исследования антиоксидантной активности биологических объектов используется потенциометрический метод. Его использование позволяет существенно упростить и ускорить процесс получения информации об АОА в медицинской практике.

Цель работы: Развитие потенциометрического метода определения антиоксидантной активности и разработка новых алгоритмов определения АОА биологических объектов с использованием медиаторной системы и потенциометрической детекции.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Исследовать взаимодействие медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ с отдельными антиоксидантами и биологическими объектами, разработать

алгоритмы определения антиоксидантной активности крови и ее фракций, семенной и фолликулярной жидкостей.

2. Исследовать реакции взаимодействия радикального инициатора ААРН с медиаторной системой, оценить возможность использования потенциометрического метода для оценки скорости и константы генерирования пероксидных радикалов.

3. Разработать новый потенциометрический метод определения антиоксидантной активности с использованием реакции радикальной инициации и потенциометрической детекции.

4. Провести корреляционные исследования результатов определения антиоксидантной активности плазмы крови потенциометрическим методом и спектрофотометрическим методом TAS Randox.

5. Провести корреляционные исследования результатов определения антиоксидантной активности индивидуальных антиоксидантов и образцов эритроцитарной массы, полученных потенциометрическим методом с использованием радикальных взаимодействий и без использования радикального инициатора.

6. Провести клинические исследования АОА плазмы крови и семенной жидкости, выявить взаимосвязи величины АОА с наличием патологических состояний организма.

Научная новизна. Впервые показана возможность исследования радикальных реакций потенциометрическим методом с использованием медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. Разработан новый потенциометрический метод исследования антиоксидантной активности с использованием радикального инициатора 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (ААРН). Разработанным методом исследованы растворы индивидуальных антиоксидантов и эритроцитарной массы. Показана высокая степень корреляции результатов определения антиоксидантной активности потенциометрическим методом с реакцией радикальной инициации и без ее использования.

Разработаны новые алгоритмы анализа антиоксидантной активности крови и ее фракций, семенной и фолликулярной жидкостей. Получены новые знания в области исследования антиоксидантной активности биологических жидкостей. Проведены корреляционные исследования плазмы крови независимым спектрофотометрическим методом TAS Randox. Выявлены корреляционные зависимости между антиоксидантной активностью фолликулярной жидкости и сыворотки крови. Выделен вклад гемоглобина и клеточной составляющей антиоксидантной активности в суммарную восстановительную способность крови и эритроцитарной массы.

Предложенный метод использован в клинических исследованиях плазмы крови и семенной жидкости. Выявлена корреляционная зависимость АОА плазмы крови пациентов с болезнями системы кровообращения и сахарным диабетом II типа. Установлены различия в величине АОА семенной жидкости при различных видах патологии репродуктивной функции.

Практическая значимость. Разработаны алгоритмы определения антиоксидантной активности биологических жидкостей. Предложена экспрессная и простая методика определения АОА крови и ее фракций, семенной и фолликулярной

жидкостей. Методика определения антиоксидантной активности цельной крови, эритроцитарной массы, плазмы, сыворотки аттестована в ФГУП УНИИМ.

С использованием потенциометрического метода с медиаторной системой определены скорость генерирования пероксидных радикалов, константа генерирования.

Метод использован в клинических исследованиях. Высокая степень корреляции результатов антиоксидантной активности с наличием патологического состояния позволяет использовать данный параметр в медицинской практике.

Доступность и простота приборного оформления позволяет использовать потенциометрический метод для масштабных медицинских исследований.

На защиту выносятся:

1. Результаты исследования взаимодействия медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ с индивидуальными антиоксидантами, цельной кровью и ее фракциями, семенной и фолликулярной жидкостями и алгоритмы определения АОА этих жидкостей потенциометрическим методом с медиаторной системой

2. Методики определения антиоксидантной активности крови и ее фракций, семенной и фолликулярной жидкостей.

3. Новый потенциометрический метод с медиаторной системой для исследования радикальных реакций

4. Новый метод потенциометрической оценки антиоксидантной активности с использованием взаимодействия пероксидных радикалов с исследуемым объектом

5. Результаты корреляционных исследований плазмы крови предложенным и спектрофотометрическим методом TAS Randox

6. Результаты корреляционных исследований индивидуальных антиоксидантов и образцов эритроцитарной массы потенциометрическим методом с использованием радикальных реакций и без ее использования

7. Результаты исследования антиоксидантной активности плазмы крови пациентов с болезнями системы кровообращения и сахарным диабетом II типа

8. Результаты исследования антиоксидантной активности семенной жидкости при различных видах патологии репродуктивной функции.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007), Международном семинаре «Загрязнение ртутью окружающей среды: эмиссия в атмосферу, восстановление территорий, влияние на здоровье» (Астана, 2007), Научно-практической конференции «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве» (Томск, 2007), 11-й Международной семинар-ярмарке «Российские технологии для индустрии» «Нанотехнологии в электронике, энергетике, экологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2007), 3rd International Symposium on Recent advances in food analysis (Prague, Czech Republic, 2007), VII Всероссийской конференции по электрохимическим метода анализа с международным участием (Уфа-Абзаково, 2008), ISTC Science Workshop at the International Conference on Contamination Soil (Center-Fiera Milano, Italy, 2008), 12th International Conference on Electroanalysis (Prague, Czech Republic, 2008), Международном конгрессе "Репродуктивное здоровье населения Урала и Сибири" (Екатеринбург, 2008), II Международном форуме "Аналитика и аналитики" (Воронеж, 2008), Всероссийской конференции молодых

ученых и III школы им. академика Н.М. Эммануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» (Москва, 2008), Ninth workshop on (Bio)sensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis (Montreal, Canada, 2009), XV Symposium «Euroanalysis 2009» (Innsbruck, Austria, 2009), III Всероссийской конференции с международным участием «Аналитика России-2009» (Туапсе, 2009), Съезд аналитиков России (Москва (пансионат «Клязьма»), 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 1 статья в издании, рекомендованном ВАК, 1 глава в книге и тезисы 18 докладов.

Диссертация выполнена при поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 07-03-96071-р_урал_a «Исследование антиоксидантной активности биологических объектов, природных и вновь синтезированных соединений с использованием потенциометрического метода анализа» (2007-2009 гг.).

Автор выражает благодарность доценту Уральского федерального университета им. первого Президента Б.Н. Ельцина, к.х.н. А.В. Ивановой за обсуждение результатов; к.х.н. Л.В. Алешиной за помощь в экспериментальной работе; профессору Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, д.х.н. О.Т. Касаикиной за ценные советы и полезные обсуждения; директору ЗАО «Центр семейной медицины», к.м.н. И.Г. Портнову и руководителю лаборатории клинической эмбриологии, врачу-эмбриологу, к.м.н. С.Л. Балезину, а также к.м.н. Я.Е. Казакову за предоставленные образцы биологических объектов и данные о клиническом заключении.

Личный вклад автора состоял в постановке и решении основных задач, проведении экспериментальных исследований в области потенциометрического определения антиоксидантной активности биологических жидкостей, интерпретации и анализе полученных результатов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, обсуждения результатов, выводов, списка литературы из 121 наименования и приложений. Содержит 151 страницы, 30 таблиц, 26 рисунков, 2 приложения.

Во **Введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи, определены научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту. В **Литературном обзоре** (глава 1) рассмотрены механизмы возникновения окислительного стресса, его роль в патогенезе различных заболеваний и основные методы оценки окислительного стресса, такие как методы определения радикальной активности, продуктов окисления биомолекул и определение антиоксидантной активности как ферментативных, так и неферментативных антиоксидантов. В **Экспериментальной части** (глава 2) описаны аппаратура, реактивы, объекты исследования и используемые методы. **Глава 3** посвящена исследованию взаимодействия медиаторной системы с цельной кровью и ее фракциями, семенной и фолликулярной жидкостями, разработке алгоритмов определения АОА этих жидкостей. **Глава 4** посвящена исследованию взаимодействия медиаторной системы с пероксидными радикалами разработке потенциометрического метода определения АОА с использованием радикального инициатора. В **главе 5** приведены сравнительные исследования антиоксидантных

свойств биологических жидкостей методами, включающими и не включающими стадию генерирования радикалов. Обосновано использование последнего в анализе биологических объектов. Глава 6 посвящена применению потенциометрического метода в клинических исследованиях и выявлению взаимосвязи величины антиоксидантной активности с наличием патологического состояния.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура

Потенциометрические измерения проводили с использованием многофункционального потенциометрического анализатора «МПА-1» (НПВП «ИВА», г. Екатеринбург) и пилотного образца потенциометрического анализатора АОТ-1 с интерфейсом RS232 (НПВП «ИВА», г. Екатеринбург). Применяли двухэлектродную электрохимическую ячейку: хлоридсеребряный электрод сравнения (Ag/AgCl / нас. KCl) и платиновый screen-printed электрод (НПВП «ИВА», г. Екатеринбург), в качестве рабочего электрода.

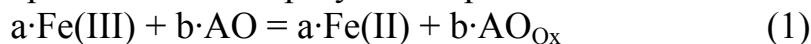
Объекты исследования

- Растворы АО: аскорбиновая кислота, мочева кислота, цистеин гидрохлорид, глутатион, билирубин, пирогаллол, адреналин гидрохлорид, дофамин гидрохлорид, норадреналин, 3,4-дигидроксифенилаланин;
- Цельная кровь и ее фракции: плазма, сыворотка, эритроцитарная масса;
- Семенная жидкость;
- Фолликулярная жидкость.

Методы исследования

Потенциометрический метод оценки антиоксидантной активности с использованием медиаторной системы

Источником информации об АОА служил сдвиг потенциала Pt-электрода в медиаторной системе $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, наблюдающийся при введении образца в раствор. Этот сдвиг является следствием химического взаимодействия АО с $K_3[Fe(CN)_6]$, т.е. изменения соотношения окисленной и восстановленной форм компонентов медиаторной системы в результате реакции:



где АО – антиоксидант, AO_{Ox} – продукт окисления антиоксиданта; a, b – стехиометрические коэффициенты реакции.

АОА (М-экв) рассчитывали по формулам (2-3).

$$AOA = \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha} \quad (2)$$

$$\alpha = C_{Red} / C_{Ox} \cdot 10^{(E_1 - E)nF/2.3RT}, \quad (3)$$

где E – начальный потенциалы системы, мВ; E_1 – потенциал системы, установившийся после введения пробы, мВ; C_{Ox} – концентрация $K_3[Fe(CN)_6]$, М; C_{Red} – концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$, М.

Спектрофотометрический метод оценки антиоксидантной активности TAS Randox

Принцип метода заключается в совместном инкубировании АВТС (2,2'-азино-бис-(этилбензтиазолино-6-сульфонат)) с метмиоглобином и H_2O_2 с образованием катион-радикала $ABTS^{\bullet+}$. Полученный раствор имеет относительно стабильный зелено-голубой цвет за счет $ABTS^{\bullet+}$, обладающий максимумом поглощения при длине волны 600 нм. АО, содержащиеся в тестируемой пробе, уменьшают оптическую плотность пропорционально их концентрации в образце.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка алгоритмов определения АОА цельной крови и ее фракций, семенной и фолликулярной жидкостей

1.1. Выбор сенсора

Ранее при разработке потенциометрического метода анализа АОА в качестве рабочего был использован дорогостоящий и хрупкий ORP-electrode (Phoenix, США). Нами для потенциометрических измерений предложен платиновый screen-printed электрод, изготовленный методом трафаретной печати путем нанесения платиновой пасты на керамическую подложку с последующим отжигом. Предлагаемый электрод можно изготовить полупромышленным способом в лабораторных условиях, он прост конструктивно и имеет доступную стоимость. Общий вид Pt-электрода представлен на рис. 1.

Рис. 1. Screen-printed Pt-электрод: 1 – подложка из керамического материала, 2 - Pt-содержащий слой (контактная зона электрода), 3 – слой изолятора, 4 - Pt-содержащий слой (рабочая зона электрода).

В таблице 1 представлены результаты измерения потенциалов различных медиаторных систем, полученные с использованием ORP-electrode (Phoenix), платинового электрода («Metrohm», Швейцария) и двух произвольно выбранных screen-printed электродов (НПВП «ИВА», г. Екатеринбург).

Таблица 1. Потенциалы платиновых электродов и предлогарифмический коэффициент уравнения Нернста, наблюдающиеся при изменении концентрации компонентов медиаторной системы (n=5, P=0,95).

C_{Ox}/C_{Red} , М/М	lg (C_{Ox}/C_{Red})	ΔE , мВ			
		Pt-электрод (Metrohm)	Платиновый ORP-electrode (Phoenix)	Screen- printed Pt- электрод 1	Screen- printed Pt- электрод 2
0,001/0,0001	1	261±1	260±2	262±1	263±2
0,001/0,00005	1,3	278±1	277±2	276±2	275±2
0,0025/0,00005	1,7	298±2	300±1	296±2	298±1
0,01/0,0001	2	320±2	318±2	319±2	321±2
$d(\Delta E)/d(\lg(C_{Ox}/C_{Red}))$		59±1	58±1	58±1	59±1

Потенциалы screen-printed Pt-электродов хорошо воспроизводимы, зависимость потенциала от соотношения концентраций компонентов медиаторной системы имеет практически линейный вид ($R^2=0,98$) и предлогарифмический коэффициент зависимости $E=f(\lg(C_{Ox}/C_{Red}))$ близок к расчетному. Отсюда следует,

что платиновые screen-printed электроды не уступают дорогостоящим электродам промышленного изготовления и могут быть использованы в качестве измерительных.

1.2. Исследование и анализ крови и ее фракций

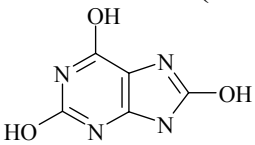
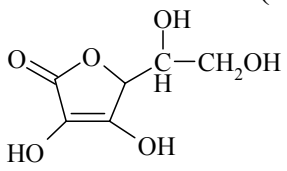
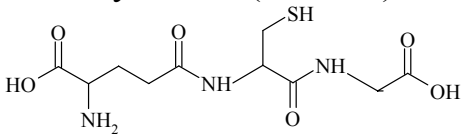
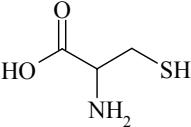
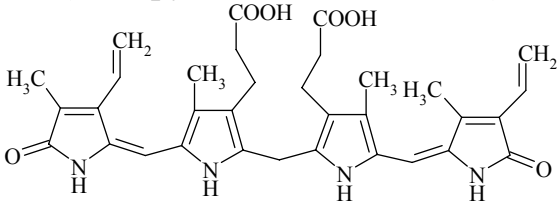
Исследование растворов индивидуальных антиоксидантов и раствора, моделирующего состав плазмы крови

Исследованы растворы некоторых АО, входящих в состав биологических объектов:

- соединения, обладающие антиоксидантными свойствам за счет наличия в молекуле групп –ОН (мочевая кислота, аскорбиновая кислота);
- тиольные соединения (глутатион, цистеин);
- азотсодержащие гетероциклические соединения (билирубин).

Стехиометрические коэффициенты реакций, определённые экспериментально, приведены в таблице 2,

Таблица 2. Стехиометрические коэффициенты реакции взаимодействия некоторых АО с медиаторной системой (n=5, P=0,95).

Концентрация АО, мМ	АОА раствора, мМ-экв	S _r	Стехиометрические коэффициенты (a:b в реакции (1))
Мочевая кислота (C=1мМ) 	1,40±0,04	0,02	1,4:1
Аскорбиновая кислота (C=1мМ) 	2,02±0,05	0,02	2:1
Глутатион (C=1мМ) 	0,99±0,03	0,02	1:1
Цистеин (C=1мМ) 	1,01±0,02	0,01	1:1
(Билирубин C=8,55·10 ⁻² мМ) 	1,69·10 ⁻¹ ±0,04·10 ⁻¹	0,03	2:1

Найденные стехиометрические коэффициенты соответствуют теоретически ожидаемым, т.е. количеству функциональных групп в молекуле АО, отвечающих за его восстановительные свойства (-ОН в составе бензольного ядра; -SH; -ОН, -NH в составе герероциклического соединения).

Из приведенных антиоксидантов смоделирован антиоксидантный состав плазмы крови, в модель вводили альбумин как основной белок плазмы. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты определения АОА раствора, моделирующего антиоксидантный состав плазмы крови (n=5, P=0,95).

Соединение	Концентрация	АОА ожидаемая, мМ-экв	АОА измеренная, мМ-экв	S _r
Мочевая кислота	$0,37 \cdot 10^{-3}$ М	0,70	0,75±0,03	0,02
Аскорбиновая кислота	$0,06 \cdot 10^{-3}$ М			
Глутатион	$0,02 \cdot 10^{-3}$ М			
Цистеин	$0,015 \cdot 10^{-3}$ М			
Билирубин	$0,01 \cdot 10^{-3}$ М			
Альбумин	45 г/л			

Полученные результаты определения АОА модельного раствора соответствуют его составу с учетом определенных стехиометрических коэффициентов. Антиоксидантный состав раствора подобран так, чтобы он был близок к составу реальных образцов плазмы крови.

Выбор состава медиаторной системы и условий разбавления пробы

Критериями выбора концентраций компонентов медиаторной системы служили: достаточная величина сдвига потенциала системы при введении в её раствор исследуемого образца; достаточная скорость протекания химической реакции между АО образца и окисленным компонентом медиаторной системы, стабильность установившегося потенциала медиаторной системы во времени. Согласно математическим расчетам и экспериментальным данным, оптимальным является содержание компонентов медиаторной системы Fe(III)/Fe(II) в электрохимической ячейке в соотношении 100/1.

Из экспериментальных данных для анализа цельной крови и эритроцитарной массы выбрана медиаторная система: 0,01 М K₃[Fe(CN)₆]/0,0001 М K₄[Fe(CN)₆].

Для анализа сыворотки и плазмы, которые содержат на порядок меньше антиоксидантов, чем кровь и эритроцитарная масса, следует использовать систему содержащую 0,001 М K₃[Fe(CN)₆]/0,00005 М K₄[Fe(CN)₆] вместо оптимальной для этих условий (0,001 М K₃[Fe(CN)₆]/0,00001 М K₄[Fe(CN)₆]), поскольку при концентрации K₄[Fe(CN)₆] менее 0,00005 М равновесный потенциал системы практически не устанавливается.

При выборе разбавления пробы (объема аликвоты) учитывали содержание антиоксидантов и доступность исследуемого образца. При большом разбавлении (малая аликвота) найденная величина АОА оказывается заниженной, что, по-видимому, обусловлено неполным протеканием реакции взаимодействия

антиоксидантов с $K_3[Fe(CN)_6]$ в этих условиях. При увеличении аликвоты результаты определения АОА перестают зависеть от её величины. Рабочие условия определения антиоксидантной активности образцов приведены в таблице 4.

Таблица 4. Рабочие условия определения АОА крови и её фракций.

Объект	Медиаторная система C_{Ox}/C_{Red} , М/М	Объем буферного раствора, содержащего медиаторную систему, мл	Объем аликвоты, мл	Разбавление образца
Эритроцитарная масса	$10^{-2}/10^{-4}$	10	0,1	100
Цельная кровь	$10^{-2}/10^{-4}$	10	0,2	50
Плазма, сыворотка	$10^{-3}/5 \cdot 10^{-5}$	1	0,2	6

Исследование влияния способа подготовки крови и ее фракций на результаты анализа

Результаты исследования влияния используемых антикоагулянтов (гепарин, цитрат натрия, ЭДТА) на найденные значения АОА как индивидуальных АО (аскорбиновая кислота (АК), цистеин), так и их смеси приведены в табл. 5.

Таблица 5. Результаты определения АОА модельных растворов в присутствии антикоагулянтов. (n=3, P=0,95).

АО	Введено, мМ-экв	Найдено, мМ-экв					
		Гепарин	R, %	Цитрат натрия	R, %	ЭДТА	R, %
АК	1,00	1,04±0,05	104	1,03±0,05	103	1,09±0,06	109
Цистеин	1,00	9,78±0,07	98	1,02±0,07	102	0,99±0,06	99
АК+Цистеин	2,00	2,03±0,08	101	2,11±0,07	105	1,94±0,11	97

В таблице 6 приведены данные определения АОА одного и того же образца цельной крови, отобранной с перечисленными антикоагулянтами.

Таблица 6. Антиоксидантная активность цельной крови, отобранной с различными антикоагулянтами (n=3, P=0,95).

Антикоагулянт	Концентрация антикоагулянта	Соотношение кровь : антикоагулянт	АОА крови, мМ-экв	S_r
Гепарин	5000ЕД/мл	19:1	9,43±0,58	0,03
Цитрат натрия	3,8%	19:1	9,61±0,61	0,03
ЭДТА	6,0%	9:1	9,34±0,31	0,02

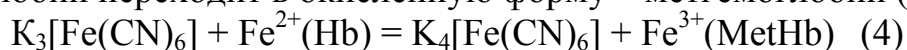
Перечисленные антикоагулянты могут быть использованы при определении АОА биологических образцов предлагаемым методом, что подтверждается полученными результатами анализа реальных проб и индивидуальных АО.

Получение достоверной информации относительно АОА цельной крови и эритроцитарной массы возможно только после гемолиза и выхода внутриклеточных антиоксидантов в межклеточную среду. Экспериментально получено, что наиболее

эффективным является термический гемолиз, т.е. гемолиз путем замораживания образца.

Выделение клеточной составляющей антиоксидантной активности крови и эритроцитарной массы

При анализе цельной крови и эритроцитарной массы необходимо учитывать наличие гемоглобина (Hb), который играет роль внутриклеточного антиоксиданта. Железо (II) в гемоглобине взаимодействует с $K_3[Fe(CN)_6]$ медиаторной системы. При окислении гемоглобин переходит в окисленную форму – метгемоглобин (MetHb) (4).



Общее содержание железа (II) и клеточных антиоксидантов в образцах крови и эритроцитарной массы обозначим TRA (Суммарная восстановительная способность *от англ.* Total Reducing Activity). Антиоксидантная активность (АОА) тогда определяется как разность TRA и восстановительной способности железа в гемоглобине ($RA_{Fe(2+)}$).

$$AOA = TRA - RA_{Fe(2+)} \quad (5)$$

Восстановительную способность железа в гемоглобине рассчитывали по формуле (6).

$$RA_{Fe(2+)} = \frac{C_{Hb}}{M(Hb)} \times v_{Fe(2+)}, \quad (6)$$

где C_{Hb} - содержание гемоглобина, г/л; $v_{Fe(2+)}$ - число ионов Fe^{2+} в 1 моле гемоглобина, $v=4$; $M(Hb)$ – молярная масса молекулы гемоглобина (68000 г/моль).

Коэффициент концентрирования при анализе эритроцитарной массы учитывали, пользуясь из данными определения гематокрита:

$$f = \frac{1}{Ht}, \quad (7)$$

где f – коэффициент концентрирования; Ht – показатель гематокрита, характеризующий отношение объема форменных элементов к плазме крови, л/л.

Результаты анализа стандартных растворов гемоглобина приведены в табл. 7.

Таблица 7. Результаты анализа стандартных растворов гемоглобина (n=5, P=0,95).

Содержание гемоглобина в стандартном растворе, г/л	Содержание гемоглобина в стандартном растворе, моль/л	Рассчитанное $RA_{Fe(2+)}$ в стандартном растворе, мМ-экв	Найденное $RA_{Fe(2+)}$ в стандартном растворе, мМ-экв	S_r
70	1,02	4,1	4,0±0,2	0,02
120	1,17	7,1	6,9±0,2	0,01
159	2,34	9,3	9,2±0,3	0,01

Из данных таблицы 7 следует, что гемоглобин вступает в реакцию с окисленным компонентом медиаторной системы, при этом полностью переходя в метгемоглобин в результате окисления всех четырех ионов железа (II) в молекуле гемоглобина.

На рисунке 2 представлена корреляция между результатами найденной TRA и рассчитанной величиной АОА образцов эритроцитарной массы.

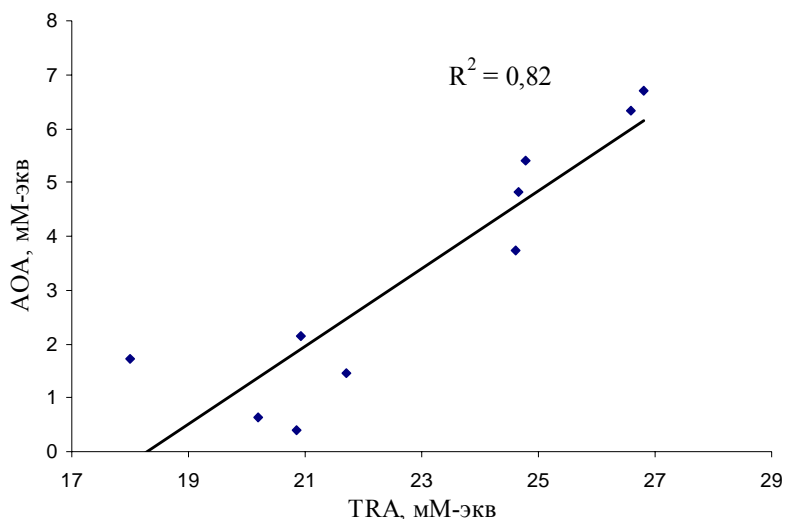


Рис. 2. Корреляция между TRA эритроцитарной массы (измеренная величина) и АОА (рассчитанная величина).

Корреляция результатов определения TRA и АОА образцов эритроцитарной массы составляет 82%. Величина клеточной АОА в эритроцитарной массе складывается преимущественно из АОА клеток крови и остаточной плазмы.

1.3. Исследование и анализ семенной и фолликулярной жидкостей

Выбор состава медиаторной системы и условий разбавления пробы

АОА семенной жидкости лежит в пределах от 0,88 до 3,35 мМ-экв, поэтому оптимальной для анализа таких растворов является медиаторная система, содержащая $K_3[Fe(CN)_6]/C(K_4[Fe(CN)_6])$ в соотношении 0,01 М/0,0001 М. Именно система такого состава удовлетворяет описанным ранее критериям. Учитывая целесообразность экономии биологического образца и полноту протекания реакции $K_3[Fe(CN)_6]$ с антиоксидантами, входящих в состав семенной жидкости, оптимальной является аликвота 0,2 мл, добавленная в 1 мл буферного раствора, содержащего медиаторную систему в указанных концентрациях.

Антиоксидантный состав и величина АОА фолликулярной жидкости сходна с АОА плазмы и сыворотки крови, поэтому для определения АОА фолликулярной жидкости также использовали медиаторную систему состава 0,001 М $K_3[Fe(CN)_6]/0,00005$ М $K_4[Fe(CN)_6]$ с разбавлением анализируемого образца в 6 раз. Таблица 8. Рабочие условия определения АОА семенной и фолликулярной жидкостей.

Объект	Медиаторная система C_{Ox}/C_{Red} , М/М	Объем буферного раствора, содержащего медиаторную систему, мл	Объем аликвоты образца, мл	Разбавление образца
Семенная жидкость	$10^{-2}/10^{-4}$	1	0,2	6
Фолликулярная жидкость	$10^{-3}/5 \cdot 10^{-5}$	1	0,2	6

Выбор фракции и способа подготовки семенной жидкости к анализу

В качестве объектов анализа использовали нативный эякулят и семенную плазму. Нативный эякулят на 95% состоит из семенной плазмы. АОА нативного эякулята практически идентична или незначительно превышает АОА семенной плазмы. В связи с этим, в дальнейшем в качестве объекта анализа использовали нативный эякулят, т.к. это позволяет исключить стадию центрифугирования, что упрощает и ускоряет подготовку образца к анализу. Кроме того, спермиологический анализ, результаты которого используются для оценки связи АОА и патологических состояний (концентрация, подвижность, морфология, количество «круглых» клеток), также проводится с использованием нативного эякулята.

Исследовали нативный эякулят

- после его разжижения (30 мин),
- после разжижения и дальнейшего замораживания (-18⁰С).

Таблица 9. Результаты определения АОА эякулята до и после замораживания (n=3, P=0,95).

№	АОА, мМ-экв			
	Без замораживания	S _r	После замораживания	S _r
1	1,35±0,11	0,03	1,37±0,04	0,01
2	1,18±0,07	0,02	1,20±0,08	0,03
3	2,74±0,15	0,02	2,68±0,10	0,02

Полученные результаты значимо не различаются. Отсюда следует, что для анализа могут быть использованы как свежие, так и предварительно замороженные образцы.

Выбор способа подготовки фолликулярной жидкости к анализу.

Фолликулярную жидкость получают пункцией. В образце возможно наличие эритроцитов и клеток эпителия, поэтому перед оценкой АОА фолликулярной жидкости образцы центрифугировали (2000 об/мин, 20 мин).

АОА фолликулярной жидкости различных фолликулов не является абсолютно одинаковой, однако значения достаточно близки по величине (табл. 10).

Таблица 10. Результаты определения АОА фолликулярной жидкости первого и второго фолликулов, измеренная потенциометрическим методом с медиаторной системой (n=3, P=0,95).

№	АОА, мМ-экв			
	Первый фолликул	S _r	Второй фолликул	S _r
1	0,99±0,04	0,02	1,03±0,07	0,03
2	1,10±0,06	0,03	0,98±0,06	0,03
3	0,97±0,07	0,03	0,95±0,05	0,02
5	1,11±0,09	0,04	0,96±0,06	0,03
5	0,77±0,05	0,03	0,73±0,03	0,02

Поэтому исследование взаимосвязи АОА с процессами оплодотворения и развития эмбрионов можно проводить, используя фолликулярную жидкость только одного фолликула, что упростит процедуру отбора пробы.

Корреляция результатов определения АОА фолликулярной жидкости и сыворотки крови

На рисунке 3 приведена корреляция результатов определения АОА фолликулярной жидкости и сыворотки крови.

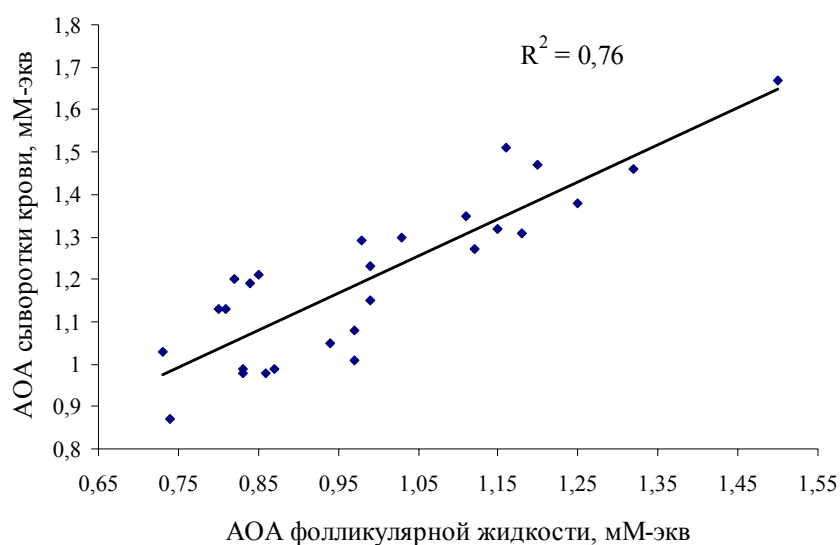


Рис. 3.
Корреляция результатов определения АОА фолликулярной жидкости и сыворотки крови.

Степень корреляции составляет 76%. Это даёт возможность использовать анализ сыворотки крови вместо фолликулярной жидкости для диагностики оплодотворения, что позволит избежать оперативного вмешательства для получения образцов.

2. Исследование взаимодействия медиаторной системы с пероксидными радикалами и разработка потенциометрического метода определения антиоксидантной активности с использованием радикального инициатора ААРН

2.1. Исследование реакции взаимодействия пероксидных радикалов с восстановленным компонентом медиаторной системы

В качестве источника пероксидных радикалов использовали водорастворимый азоинициатор 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (ААРН), который при термическом воздействии разлагается по следующей схеме:

На рисунке 4 показано, что при совместном инкубировании ААРН с медиаторной системой (37⁰С) наблюдается рост потенциала во времени (Рис. 4).

Рис. 4. Зависимость потенциала медиаторной системы $(C(K_4[Fe(CN)_6])/C(K_3[Fe(CN)_6]) = 0,001 M/0,0001 M)$ от времени при совместном инкубировании с 0,1 М ААРН при 37⁰С.

Этот рост может быть обусловлен окислением восстановленного компонента медиаторной системы генерируемыми радикалами.

На рисунке 5 приведены спектры поглощения света образцами, содержащими 0,0025M $K_4[Fe(CN)_6]$; 0,0025M $K_3[Fe(CN)_6]$ и смесь 0,1M ААРН + 0,01M $K_4[Fe(CN)_6]$ после инкубирования в течение 90 мин при 37⁰С.

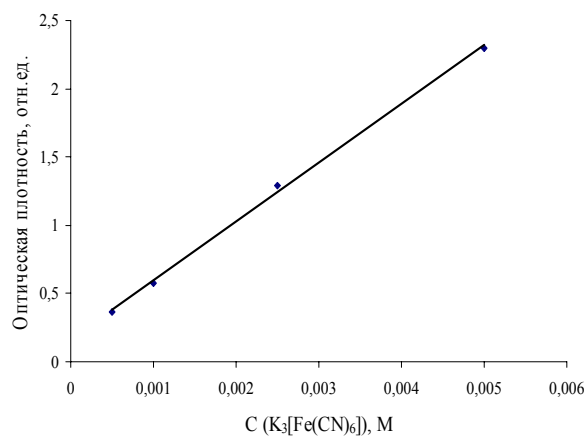
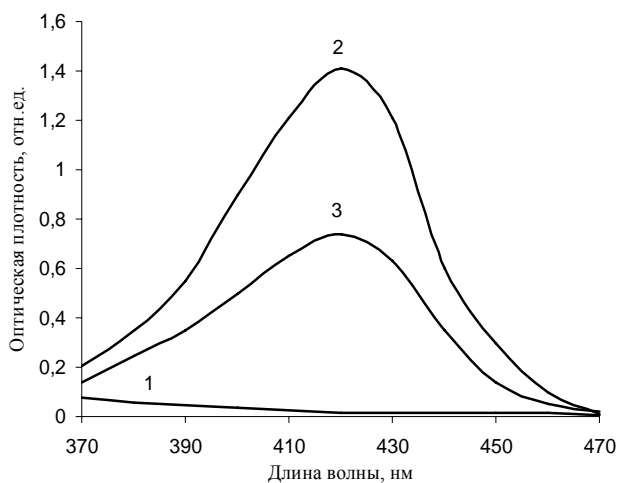


Рис. 5. Спектры поглощения света образцами, содержащими (1) - 0,0025M $K_4[Fe(CN)_6]$; (2) - 0,0025M $K_3[Fe(CN)_6]$, (3) 0,1M ААРН + 0,01M $K_4[Fe(CN)_6]$ после инкубирования в течение 90 мин при 37⁰С.

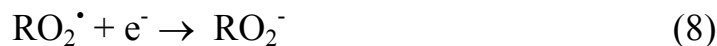
Рис. 6. Зависимость оптической плотности от концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$ ($\lambda=420$ нм).

При инкубировании $K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии ААРН наблюдается увеличение оптической плотности в результате увеличения концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$, максимум поглощения света которым фиксируется при длине волны 420 нм. Таким образом, увеличение потенциала медиаторной системы во времени обусловлено взаимодействием генерируемых пероксидных радикалов с восстановленным компонентом медиаторной системы, т.е. скорость генерирования пероксидных радикалов может быть оценена по скорости возрастания концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$. Это дает возможность исследования радикальных реакций потенциометрическим методом с медиаторной системой.

По данным, приведенным на рисунках 5-6, рассчитывали скорость генерирования пероксидных радикалов из 0,1M раствора ААРН. Она равна $W_i \cdot 10^7 = 1,96 \pm 0,09$ ($S_r=0,02$) ($n=3$, $P=0,95$).

2.2. Разработка метода исследования кинетики генерирования пероксидных радикалов, определение скорости и константы генерирования

Скорость генерирования пероксидных радикалов оценивали по изменению потенциала медиаторной системы при совместном инкубировании (37⁰С) ААРН с медиаторной системой. Пероксидные радикалы взаимодействуют с $K_4[Fe(CN)_6]$, что сопровождается увеличением концентрации окисленного компонента по реакциям (8-9).



Концентрацию $K_3[Fe(CN)_6]$ в каждый момент времени оценивали по формулам (10-11):

$$C_{Fe^{3+}} = \frac{\alpha C_{Red} - C_{Ox}}{1 + \alpha} \quad (10)$$

$$\alpha = C_{Ox} / C_{Red} \cdot 10^{(E_1 - E)nF / 2.3RT} \quad (11)$$

где E, E_1 - потенциалы медиаторной системы до и после взаимодействия с пероксидными радикалами, мВ; C_{Ox} - концентрация окисленной формы медиаторной системы, М; C_{Red} - концентрация восстановленной формы медиаторной системы, М; $C_{Fe^{3+}}$ - концентрация $K_3[Fe(CN)_6]$, М.

Скорость генерирования принимали равной скорости окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, т.е. скорости увеличения концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$. Константу скорости генерирования (k_i) рассчитывали по формуле (12):

$$W_i = 2k_i \cdot [AAPH] = d\{K_3[Fe(CN)_6]\} / dt, \quad (12)$$

где W_i - скорость генерирования пероксидных радикалов, $M \cdot c^{-1}$; $[AAPH]$ - концентрация инициатора ААРН, М; k_i - константа скорости генерирования, c^{-1} .

Для установления порядка реакции генерирования по восстановленному компоненту медиаторной системы в условиях, когда концентрация образующихся радикалов в единицу времени значительно меньше концентрации восстановителя, использовали $K_4[Fe(CN)_6]$ в различных концентрациях. Состав выбранных медиаторных систем приведен ниже.

Система 1: $C(K_4[Fe(CN)_6]) / C(K_3[Fe(CN)_6]) = 0,01 \text{ М} / 0,0001 \text{ М}$

Система 2: $C(K_4[Fe(CN)_6]) / C(K_3[Fe(CN)_6]) = 0,005 \text{ М} / 0,0001 \text{ М}$

Система 3: $C(K_4[Fe(CN)_6]) / C(K_3[Fe(CN)_6]) = 0,001 \text{ М} / 0,0001 \text{ М}$

В таблице 11 приведены результаты определения скорости и константы генерирования, оцененные с использованием медиаторных систем 1-3.

Таблица 11 – Скорость генерирования пероксидных радикалов (W_i), определенная по реакции увеличения концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$ с различными медиаторными системами ($C(AAPH) = 0,1 \text{ М}$, $T = 37^{\circ}C$) ($n = 5$, $P = 0,95$).

№ системы	W_i^* , $10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$	S_r	k_i^{**} , 10^{-6} с^{-1}
1	$1,87 \pm 0,08$	0,04	$0,94 \pm 0,08$
2	$1,87 \pm 0,08$	0,04	$0,94 \pm 0,08$
3	$1,84 \pm 0,06$	0,03	$0,92 \pm 0,06$
	$W_{i \text{ ср}} \cdot 10^7 = 1,87 \pm 0,03 \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ ($S_r = 0,04$)		$k_{i \text{ ср}} \cdot 10^6 = 0,93 \pm 0,01 \text{ с}^{-1}$ ($S_r = 0,03$)

- W_i рассчитана по изменению концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$
- $k_i = W_i / 2[AAPH]$

Скорость генерирования пероксидных радикалов в изученных условиях не зависит от концентрации медиаторной системы, откуда следует, что порядок реакции по гексацианоферрату (II) можно принять равным нулю. Полученные данные о величине скорости и константы скорости генерирования коррелируют с литературными и, полученными спектрофотометрическим методом данными. Это подтверждает возможность оценки скорости генерирования радикалов по реакции с медиаторной системой.

На рисунке 7 приведены зависимости изменения концентрации окисленного компонента медиаторной системы при взаимодействии с ААРН различных концентраций. В таблице 12 приведены рассчитанные величины скорости и константы генерирования ($n=5$, $P=0,95$).

Рис. 7. Зависимость изменения концентрации окисленного компонента медиаторной системы от времени при взаимодействии с ААРН различных концентраций.

Таблица 12. Скорость генерирования пероксидных радикалов (W_i), определённая по реакции с медиаторной системой, при различных концентрациях инициатора ААРН ($pH=7,4$, $T=37^{\circ}C$, медиаторная система $C(K_4[Fe(CN)_6])/C(K_3[Fe(CN)_6])=0,005M/0,0001M$) ($n=5$, $P=0,95$).

$C(AAPH), M$	$W_i^*, 10^{-7} M \cdot c^{-1}$	S_r	$k_i^{**}, 10^{-6} c^{-1}$	S_r
0,01	$0,19 \pm 0,01$	0,05	$0,97 \pm 0,04$	0,05
0,05	$0,94 \pm 0,05$	0,05	$0,94 \pm 0,07$	0,06
0,1	$1,87 \pm 0,08$	0,04	$0,94 \pm 0,04$	0,04
0,2	$3,77 \pm 0,18$	0,04	$0,94 \pm 0,04$	0,04
0,3	$5,56 \pm 0,26$	0,04	$0,93 \pm 0,04$	0,04
			$k_{icp} \cdot 10^6 = 0,94 \pm 0,04 c^{-1} (S_r=0,02)$	

- W_i скорость генерирования, рассчитанная по изменению концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$
- $k_i = W_i/2[AAPH]$

Линейная зависимость ($R^2=0,99$) скорости генерирования пероксидных радикалов от концентрации инициатора указывает на первый порядок реакции по ААРН.

2.3. Разработка потенциометрического метода определения антиоксидантной активности с использованием реакции генерирования радикалов инициатором ААРН

Антиоксидантную активность оценивали по величине периода индукции (τ , сек). В раствор инициатора в фосфатном буфере ($pH=7,4$) вносили исследуемый образец. Антиоксиданты, содержащиеся в образце, взаимодействуют с пероксидными радикалами, генерируемыми ААРН. Во время инкубирования ($37^{\circ}C$) перемешиваемого раствора через определенные промежутки времени отбирали аликвоту и анализировали с использованием медиаторной системы.

Пока концентрация антиоксиданта превышает концентрацию радикалов, генерируемых в единицу времени ($W_{icp} \cdot 10^7 = 1,87 \pm 0,03 M \cdot c^{-1}$), на кривой зависимости потенциала медиаторной системы от времени наблюдается падение потенциала за счет взаимодействия АО с окисленным компонентом медиаторной системы. После того, как АО израсходуются, спад на кривой зависимости потенциала медиаторной системы от времени исчезает. Время от начала взаимодействия до появления кривой без минимума считали «периодом индукции»

Антиоксидантную активность рассчитывали как произведение скорости генерирования на период индукции.

$$AOA = n[AO] = W_i \cdot \tau \quad (13)$$

где W_i – скорость генерирования пероксидных радикалов, $M \cdot c^{-1}$; τ – период индукции, сек.

Типичные зависимости потенциала медиаторной системы от времени, наблюдающиеся после инкубирования ААРН с антиоксидантом (аскорбиновая кислота) в течение различного времени приведены на рисунке 8.

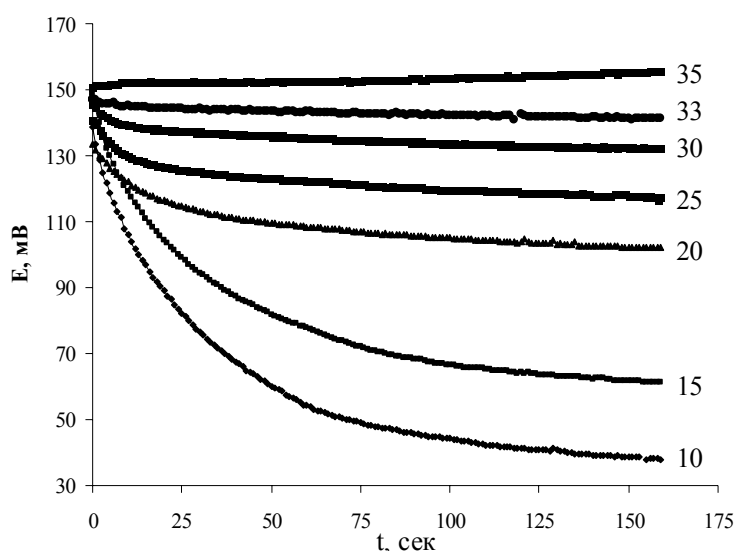


Рис. 8. Зависимости потенциала медиаторной системы от времени, наблюдающиеся после инкубирования 0,0002 М раствора аскорбиновой кислоты с пероксидными радикалами, генерируемыми 0,1 М раствором ААРН в фосфатном буфере (рН=7,4) при 37⁰С в течение различного времени

После 35 минут инкубирования на кривой зависимости потенциала медиаторной системы от времени наблюдается только рост потенциала в результате взаимодействия генерируемых радикалов с медиаторной системой. Период индукции для 0,0002 М раствора аскорбиновой кислоты равен 34 минутам.

4.4. Определение АОА растворов индивидуальных антиоксидантов потенциометрическим методом с использованием взаимодействия с пероксидными радикалами, генерируемыми ААРН

Изучали взаимодействие аскорбиновой кислоты (АК), пирогаллола (Pyr) и катехоламинов: адреналина (Ad), норадrenalина (Nor), 3,4-дигидроксибензилаланина (DOPA), дофамина (Dop) с радикалами, генерируемыми ААРН.

Результаты сравнительных исследований приведены в таблице 13, где C^* - концентрация АО, найденная потенциометрическим методом с использованием реакции термического распада ААРН при 37⁰С (n=3, P=0,95) (уравнение 13); C^{**} - концентрация АО, найденная потенциометрическим методом с медиаторной системой без использования радикальной реакции при 25⁰С (n=5, P=0,95) (уравнения 2-3).

Таблица 13. Концентрация антиоксидантов в модельных растворах, найденная методом потенциометрии с медиаторной системой с использованием реакции генерирования радикалов ААРН (C^*) и без ее использования (C^{**}).

Потенциометрический метод с использованием ААРН						Потенциометрический метод		
Объект (АО)	$C(AO), 10^{-4}M$	$C (AAPH), M$	$\tau, \text{мин}$	S_r	$C^*, 10^{-4} M$	S_r	$C^{**}, 10^{-4} M\text{-экв}$	S_r

AK	1,0	0,1	16±2	0,07	1,84±0,30	0,07	2,00±0,04	0,02
AK	2,0	0,1	34±2	0,04	3,87±0,32	0,04	4,06±0,14	0,01
Pyr	1,0	0,1	25±1	0,02	2,89±0,16	0,02	3,00±0,05	0,01
Adr	1,0	0,05	55±4	0,04	3,10±0,28	0,04	3,02±0,09	0,02
Nor	1,0	0,05	45±1	0,02	2,56±0,07	0,02	2,74±0,08	0,03
DOPA	1,0	0,05	58±4	0,04	3,25±0,21	0,03	3,05±0,09	0,03
Dop	1,0	0,05	64±4	0,03	3,65±0,22	0,03	4,12±0,11	0,02

Расчитанное соотношение (C^*/C^{**}) составляет $1,04 \pm 0,06$ ($S_r=0,06$). На рисунке 9 приведена корреляция результатов, полученных двумя использованными методами.

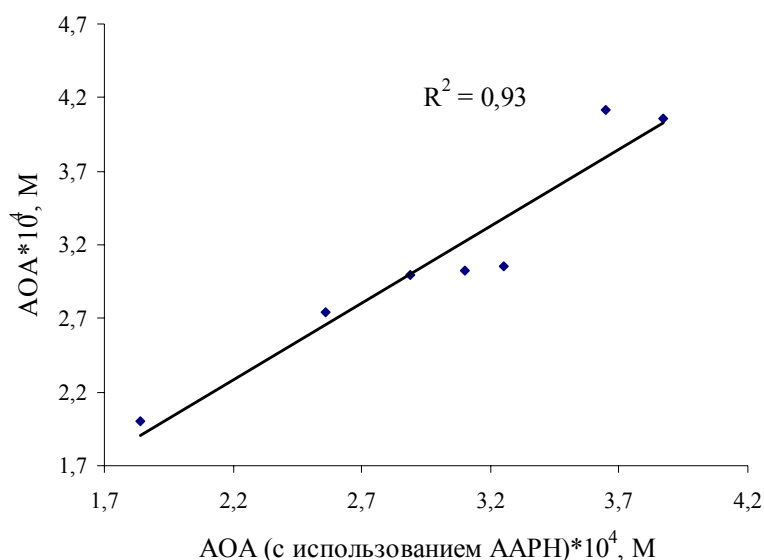


Рис. 9. Корреляция результатов АОА модельных растворов антиоксидантов, полученных методом потенциометрии с реакцией генерирования радикалов и без ее использования.

Наблюдается высокая степень корреляции ($R^2=0,93$). Результаты, полученные двумя методами, близки к теоретически ожидаемым и практически идентичны, несмотря на то, что температура проведения эксперимента различна при использовании различных методов.

3. Сравнительные исследования антиоксидантных свойств биологических жидкостей методами, включающим стадию генерирования свободных радикалов и не включающим указанную реакцию. Обоснование использования последнего метода в анализе.

3.1. Сравнительные исследования плазмы крови спектрофотометрическим методом TAS Randox и потенциометрическим методом с медиаторной системой

Приведены корреляции результатов определения АОА плазмы крови, полученных методом TAS Randox и потенциометрическим при 25⁰С (Рис. 10) и 37⁰С (Рис. 11), откуда видно, что результаты, полученные потенциометрическим методом с медиаторной системой при комнатной температуре (25⁰С) стабильно ниже результатов, получаемых при 37⁰С методами потенциометрии и TAS Randox. Отношение результатов определения АОА методом Randox к результатам потенциометрических измерений при комнатной температуре $АОА_R/АОА_{П25^{\circ}C}$, составляет 1,40. Такая тенденция может быть обусловлена большей доступностью антиоксидантных групп при более высокой температуре. Результаты определения

АОА плазмы крови, полученные методом Randox и потенциметрическим методом при 37⁰С достаточно близки: $AOA_R/AOA_{П37^{\circ}C} = 1,01 \pm 0,04$ ($S_r = 0,07$) (Рис. 11).

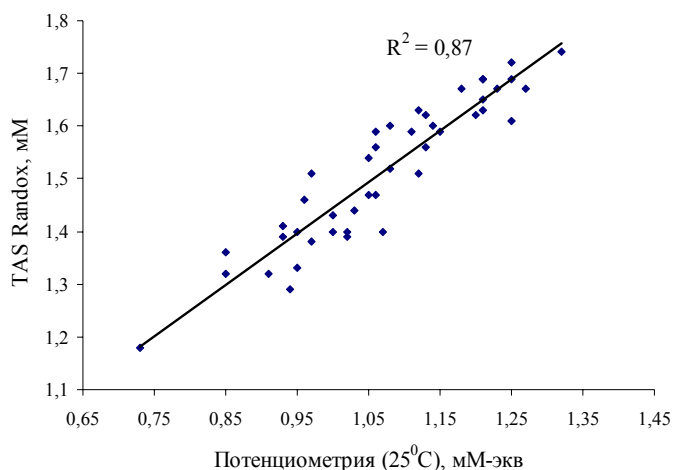


Рис 10. Корреляция результатов определения АОА плазмы крови, полученных методом TAS Randox и потенциметрическим при 25⁰С.

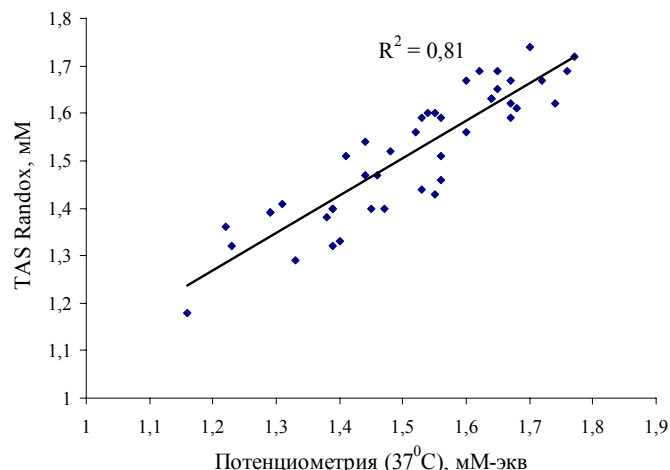


Рис. 11. Корреляция результатов определения АОА плазмы крови, полученных методом TAS Randox и потенциметрическим при 37⁰С.

Наличие такой устойчивой корреляции делает корректной оценку антиоксидантной активности, проводя измерения потенциметрическим методом при комнатной температуре, что значительно упрощает процедуру анализа.

3.2. Определение TRA образцов эритроцитарной массы потенциметрическим методом с медиаторной системой и с использованием взаимодействия с радикалами ААРН и без использования радикальных взаимодействий

Результаты сравнительных исследований антиоксидантных свойств образцов эритроцитарной массы потенциметрическим методом с медиаторной системой и потенциметрическим методом с медиаторной системой и с использованием радикальных взаимодействий приведены в таблице 14.

Таблица 14. Суммарная восстановительная способность образцов эритроцитарной массы, определенная методом потенциометрии с медиаторной системой с использованием реакции генерирования радикалов ААРН (С*) и без ее использования (С**).

Потенциометрический метод с использованием ААРН							Потенциометрический метод	
№	С (ААРН), М	τ , мин	S_r	С* (в ячейке), 10^{-4} М	С* (в образце), 10^{-3} М	S_r	С**, 10^{-3} М-экв	S_r
1	0,1	25±2	0,04	2,82±0,28	28,2±2,8	0,04	21,1±0,5	0,01
2	0,1	36±2	0,02	4,10±0,16	41,0±1,6	0,02	29,1±0,4	0,01
3	0,1	25±2	0,04	2,82±0,28	28,2±2,8	0,04	20,8±0,9	0,02
4	0,1	27±2	0,04	3,12±0,32	31,2±3,2	0,04	22,8±0,6	0,01
5	0,1	30±2	0,04	3,68±0,43	34,6±3,2	0,04	25,5±1,2	0,02
6	0,1	25±2	0,04	2,82±0,28	28,2±2,8	0,04	20,6±0,9	0,02
7	0,1	25±1	0,02	2,82±0,16	28,2±1,6	0,02	19,9±0,6	0,02
8	0,1	17±1	0,03	2,82±0,28	19,8±1,1	0,02	14,8±0,4	0,01
9	0,1	30±3	0,04	3,38±0,28	33,8±2,8	0,03	23,4±0,8	0,02
10	0,1	33±3	0,05	3,68±0,43	36,8±4,3	0,05	26,3±1,5	0,02

Коэффициент корреляции составляет 0,98 (Рис. 12).

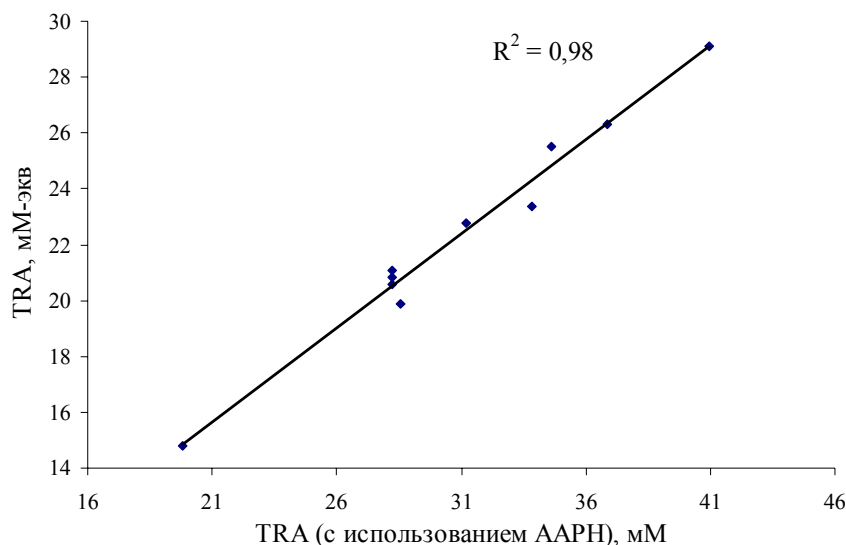


Рис 12. Корреляция результатов определения TRA эритроцитарной массы, полученных методом потенциометрии с реакцией генерирования радикалов и без ее использования.

Расчитанное соотношение (С*/С**) составило $1,38 \pm 0,03$ ($S_r=0,03$). Отличие в абсолютных значениях АОА также может быть вызвано различными температурными условиями эксперимента и различной биодоступностью антиоксидантных групп при различных температурах. Этот коэффициент составил ту же величину, что и при исследовании плазмы крови методами потенциометрии при 25⁰С и TAS Randox при 37⁰С.

Высокая степень корреляции позволяет сделать вывод о том, что использование обоих предложенных методов (потенциометрического с использованием радикальных взаимодействий и потенциометрического с использованием взаимодействия антиоксидантов с медиаторной системой) является корректным. Однако применение потенциометрического метода, в котором не используется

стадия генерирования свободных радикалов, является более простым и экспрессным и позволяет проводить измерения при 25⁰С.

4. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности в клинических исследованиях

4.1. Исследование АОА плазмы крови пациентов с болезнями системы кровообращения и сахарным диабетом II типа и выявление взаимосвязи АОА плазмы с наличием патологических состояний организма

Обследовали 80 пациентов различного возраста с различными болезнями органов кровообращения, сахарным диабетом II типа, а также метаболическим синдромом и ожирением. Группу контроля составили 30 здоровых лиц в возрасте 19-25 лет. Среднее значение АОА плазмы крови в контрольной группе составило $1,28 \pm 0,65$ мМ-экв. Контрольным материалом для оценки выраженности окислительного стресса служил также показатель АОА стандартного образца контрольной сыворотки человеческой, нормальной, АОА которой составляет $1,12 \pm 0,07$ ($S_r=0,03$).

Обнаружены следующие тенденции взаимосвязи показателя АОА плазмы крови с клиническим диагнозом (рис. 13).

Рис. 13. Взаимосвязь величины АОА плазмы крови с групповой принадлежностью пациента.

I группа – тяжелые больные (тяжелая недостаточность кровообращения, тяжелая артериальная гипертензия, сахарный диабет II типа, который существенно повышает риск развития сердечно-сосудистых (СС) патологий).

II группа – здоровые лица, лица со стабильным компенсированным лечением и лица с рядом патологий, которые повышают риск развития СС заболеваний или сахарного диабета 2 типа (нейроциркуляторная дистония, метаболический синдром, ожирение).

III группа – к третьей группе относится две подгруппы лиц. Первая представляет собой здоровых людей, с достаточно высоким содержанием АО в плазме крови. Вторая группа – лица с тяжелыми формами болезней органов кровообращения, обострением патологического процесса, а достаточно высокие показатели АОА могут быть обусловлены напряжением компенсаторных систем организма в ответ на развитие окислительного стресса. В пользу этого предположения выступает то, что при анализе контрольной сыворотки людей с высокой патологией значение АОА составило $1,72 \pm 0,08$ ($S_r=0,02$).

Таким образом, для выявления уровня АОА в указанных группах патологических состояний может быть использован потенциометрический метод с целью дополнительной диагностики и рекомендации соответствующей терапии.

4.2. Исследование АОА семенной жидкости при различных видах патологии репродуктивной функции, установление диагностических критериев

В исследования включены 56 образцов эякулята мужчин с нормозооспермией, патологией эякулята (олиго-, астено-, терато-, смешанные формы), лейкоцитоспермией. На данных образцах проведен спермиологический анализ с оценкой концентрации, подвижности, морфологии сперматозоидов, классификацию которых осуществляли на основании руководства ВОЗ (Всемирной организации здравоохранения).

Выявлено снижение АОА эякулята в группах с патологиями эякулята (олиго-, астено-, терато-, смешанные формы) по сравнению с эякулятом пациентов группы с нормоспермией. Таким образом, оценка АОА семенной жидкости может иметь важное прогностическое и диагностическое значение при изучении патогенеза мужской инфертильности, а также ее терапии. На рисунке 14 приведены значения антиоксидантной активности семенной жидкости групп с нормоспермией и различными патологиями.

Рис. 14. Различия между АОА семенной жидкости групп с нормоспермией и различными патологиями.

Отдельный интерес представляет группа пациентов, в эякуляте которых концентрация «круглых» клеток превышает $4 \cdot 10^6$ /мл и пациенты с агглютинацией сперматозоидов. Для данных групп патоспермии характерно наличие оксидантной активности. Такое явление было нами отмечено впервые при исследовании биологических объектов (кровь и ее фракции, фолликулярная жидкость). Это может быть обусловлено тем, что при повышенном содержании лейкоцитов, они становятся доминантным источником активных форм кислорода. Предположительно, оксидантная активность обусловлена наличием в образце кислородных радикалов и пероксидов, как органической, так и неорганической природы, которые взаимодействуют с восстановленным компонентом медиаторной системы, окисляя

его. Это предположение подтверждается тем, что $K_4[Fe(CN)_6]$ окисляется пероксидными радикалами (пероксидными радикалами, генерируемыми ААРН), пероксидом водорода и органическими пероксидами (третбутил-гидропероксидом (ТВНР)).

ВЫВОДЫ

1. Установлены стехиометрические коэффициенты реакции взаимодействия медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ с отдельными антиоксидантами, входящими в состав биологических жидкостей.

2. Разработаны алгоритмы определения антиоксидантной активности крови и ее фракций, семенной и фолликулярной жидкостей.

3. Разработан метод определения скорости и константы скорости генерирования радикалов с использованием медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ и потенциометрической детекции. Константа скорости генерирования радикалов, определенная потенциометрическим методом с медиаторной системой, составляет $k_{icp} \cdot 10^6 = 0,94 \pm 0,04 \text{ с}^{-1}$.

4. Разработан новый потенциометрический метод оценки антиоксидантной активности с использованием реакции радикальной инициации, заключающийся во взаимодействии изучаемого образца с генерируемыми пероксидными радикалами и определении периода индукции, за который принято время от введения антиоксиданта в раствор инициатора до его практически полного расходования.

5. Достоверность результатов, получаемых потенциометрическим методом с медиаторной системой, подтверждена:

а) высокой степенью корреляции результатов определения АОА плазмы крови, полученных спектрофотометрическим методом TAS Randox и потенциометрическим методом при 25°C ($R^2=0,87$) и 37°C ($R^2=0,81$);

б) высокой степенью корреляции результатов определения АОА потенциометрических измерений с использованием радикальных взаимодействий и без их использования для индивидуальных антиоксидантов ($R^2=0,93$) и образцов эритроцитарной массы ($R^2=0,98$).

6. Проведены клинические исследования АОА плазмы крови и семенной жидкости, выявлена взаимосвязь АОА с наличием патологий сердечно-сосудистой и репродуктивной систем.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях

1. Brainina Kh.Z. New electrochemical method of determining blood and blood fractions antioxidant activity [Text] / Kh.Z. Brainina, L.V. Alyoshina, E.L. Gerasimova, Ya.E. Kazakov, A.V. Ivanova, Ya.B. Beykin, S.V. Belyaeva, T.I. Usatova, M.Ya. Khodos // *Electroanalysis*. – 2009. - V.21, № 3-5. – P. 618-624.

2. Брайнина Х.З. Окислительный стресс: природа, вклад в патогенез, защита и диагностика [Текст] / Х.З. Брайнина, Е.Л. Герасимова, Я.Е. Казаков, М.Я. Ходос // *Химический анализ в медицинской диагностике*. - Под ред. Г.К. Будникова. - М.: Наука. - 2010. – Т. 11. - С. 132-163.

3. Герасимова Е.Л. Оценка антиоксидантной активности с использованием реакции генерирования свободных радикалов и потенциометрической индикации [Текст] / Е.Л. Герасимова, Л.В. Алешина, С.В. Булатова, Т.И. Усатова, А.В. Иванова, Я.Б.

Бейкин, Х.З. Брайнина // Тезисы докладов XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Москва. - 2007. – С. 116.

4. Брайнина Х.З. Мониторинг ртути в объектах окружающей среды. Оценка антиоксидантной системы защиты организма в условиях загрязненности среды [Текст] / Х.З. Брайнина, Н.Ю. Стожко, А.В. Иванова, Ж.В. Шалыгина, Е.Л. Герасимова // Сб. тез. докл. Международного семинара «Загрязнение ртутью окружающей среды: эмиссия в атмосферу, восстановление территорий, влияние на здоровье». Астана. - 2007. – С. 38-39.

5. Герасимова Е.Л. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности [Текст] / Е.Л. Герасимова, Е.Н. Шарафутдинова, А.В. Иванова, Х.З. Брайнина // Материалы научно-практической конференции «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве». - 2007. – С. 49.

6. Козицина А.Н. Наноструктурированные материалы как сенсоры в оценке окислительного стресса [Текст] / А.Н. Козицина, Х.З. Брайнина, Е.Л. Герасимова // Сб. тез. докл. 11-й Международной семинара-ярмарки «Российские технологии для индустрии» «Нанотехнологии в электронике, энергетике, экологии и медицине». Санкт-Петербург. - 2007. – С. 44.

7. Gerasimova E. Potentiometry in research antioxidant activity of agricultural raw material, food stuffs and herbs [Text] / E. Gerasimova, Kh. Brainina, E. Sharafutdinova, A. Ivanova, M. Vidrevich // Book of abstracts 3rd International Symposium on Recent advances in food analysis. Prague, Czech Republic. - 2007. – P. 378.

8. Брайнина Х.З. Новый электрохимический метод определения антиоксидантной активности крови и ее фракций [Текст] / Х.З. Брайнина, Л.В. Алешина, Е.Л. Герасимова, Я.Е. Казаков, Я.Б. Бейкин, С.В. Беляева, Т.И. Усатова, О.В. Инжеватова, А.В. Иванова, В.М. Камышов // Материалы VII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием. Уфа-Абзаково . - 2008. – С. 13.

9. Brainina Kh.Z. Electrochemical methods of environmental contamination and human organism intoxication evaluation [Text] / Kh.Z. Brainina, N.Yu. Stozhko, N.A. Malakhova, L.V. Aleshina, E.L. Gerasimova, I.V. Bizov // Book of Papers ISTC Science Workshop at the International Conference on Contamination Soil. Center-Fiera Milano, Italy. - 2008. – P. 95-103.

10. Brainina Kh.Z. Electrochemical methods for evaluation of oxidant/antioxidant activity of biological fluids [Text] / Kh.Z. Brainina, E.L. Gerasimova, O.V. Morozova // Book of Abstracts of the 12th International Conference on Electroanalysis. Prague, Czech Republic. - 2008. – P. 73.

11. Брайнина Х.З. Антиоксидант/оксидантная активность семенной жидкости при нарушении репродуктивной функции у мужчин [Текст] / Х.З. Брайнина, Е.Л. Герасимова, О.Б. Морозова, С.Л. Балезин // Материалы Международного конгресса "Репродуктивное здоровье населения Урала и Сибири". Екатеринбург. - 2008. – С. 8.

12. Брайнина Х.З. Потенциометрический метод исследования антиоксидант/оксидантной активности биологических сред [Текст] / Х.З. Брайнина, Л.В. Алешина, Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова // Рефераты докладов II Международного форума "Аналитика и аналитики". Воронеж . - 2008. – С. 581.

13. Герасимова Е.Л. Потенциометрический метод оценки антиоксидантной активности [Текст] / Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова, Х.З. Брайнина // Доклады и тезисы Всероссийской конференции молодых ученых и III школы им. академика Н.М. Эммануэля. Москва. - 2008. – С. 166-168.
14. Brainina Kh.Z. Evaluation of sperm antioxidant/oxidant activity and its correlation with pathological states [Text] / Kh.Z. Brainina, E.L. Gerasimova, S.L. Balezin, O.V. Morozova, I.G. Portnov, V.A. Makutina // Book of Abstracts of the Ninth workshop on (Bio)sensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis. Montreal, Canada. - 2009. – P. 70.
15. Gerasimova E.L. Antioxidant/oxidant status evaluation and its response on some clinical conditions [Text] / E.L. Gerasimova, Y.E. Kazakov, L.V. Alyoshina, Kh.Z. Brainina // Book of Abstracts of the Ninth workshop on (Bio)sensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis. Montreal, Canada. - 2009. – P. 71.
16. Брайнина Х.З. Новый метод оценки соотношения антиоксидантной и оксидантной активности в семенной жидкости мужчин [Текст] / Х.З. Брайнина, Е.Л. Герасимова, С.Л. Балезин, В.А. Макутина, Е.В. Турчанинова, И.Г. Портнов, Д.Ф. Салимов // Материалы XIX ежегодной международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». Иркутск. - 2009. – С. 109.
17. Gerasimova E.L. Evaluation of antioxidant activity of blood / E.L. Gerasimova, Kh.Z. Brainina, Ya.E. Kazakov, L.V. Alyoshina, A.V. Ivanova // Abstracts of Euroanalysis. Innsbruck, Austria. - 2009. – P. 137.
18. Брайнина Х.З. Оценка антиоксидантной активности крови [Текст] / Х.З. Брайнина, Е.Л. Герасимова, Л.В. Алешина, Я.Е. Казаков, А.В. Иванова // Материалы III Всероссийской конференции с международным участием "Аналитика России". Краснодар. - 2009. – С. 380.
19. Герасимова Е.Л. Создание метода и сенсора на основе наночастиц платины для диагностики окислительного стресса при заболеваниях системы органов кровообращения и патологиях репродуктивной функции [Текст] / Е.Л. Герасимова, Е.В. Викулова, Х.З. Брайнина // Материалы Международной научной школы для молодежи «Инновационные технологии в здравоохранении: молекулярная медицина, клеточная терапия, трансплантология, реаниматология, нанотехнологии». Екатеринбург. - 2009. – С. 62-65.
20. Герасимова Е.Л. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности биологических объектов [Текст] / Е.Л. Герасимова // Тезисы докладов Съезда аналитиков России. Москва (пансионат «Клязьма»). – 2010. – С. 79.