

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ
ГНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ
ИНСТИТУТ ПАТОЛОГИИ, ФАРМАКОЛОГИИ И ТЕРАПИИ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ
по изучению процессов свободнорадикального окисления
и системы антиоксидантной защиты организма**

Воронеж-2010

Методические положения разработаны ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии (М.И. Рецкий, С.В. Шабунин, Г.Н. Близнецова, Т.Е. Рогачева, Т.Г. Ермолова, О.Ю. Фоменко, Э.В. Братченко, В.Ю. Дубовцев), ФГОУ ВПО Воронежский государственный университет (Н.Н. Каверин), Николаевский государственный университет им. В.А. Сухомлинского (О.И. Цебржинский).

Предназначены для научных работников, аспирантов и преподавателей ВУЗов зооветеринарного и биологического профиля.

Методические положения рассмотрены, одобрены и рекомендованы к изданию секцией «Патология, фармакология и терапия Отделения ветеринарной медицины РАСХН (протокол № 3 от 26 октября 2010 года).

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета ФГОУ ВПО Воронежский государственный университет Попова Т.Н.

доктор биологических наук, зав. лабораторией экспериментальной фармакологии ГНУ ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии Г.А. Востроилова

Ответственный за выпуск: директор ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии, доктор ветеринарных наук, профессор, чл.-корр. Россельхозакадемии Шабунин С.В.

© ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии, 2010

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение.....	4
2. Свободнорадикальное (пероксидное) окисление липидов	5
2.1. Первичные продукты пероксидного окисления липидов	10
2.2. Промежуточные продукты пероксидного окисления липидов.....	11
2.3. Конечные продукты пероксидного окисления липидов	11
3. Свободнорадикальное (пероксидное) окисления белков	12
4. Активные формы азота (оксид азота - NO [•]).....	16
5. Система антиоксидантной защиты организма.....	22
5.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы	22
5.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы	31
6. Методы изучения процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма.....	34
6.2. Методы определения продуктов пероксидного окисления липидов	36
6.3. Методы определения пероксидного окисления белков	40
6.4. Методы изучения состояния системы антиоксидантной защиты	43
6.5. Методы изучения системы оксида азота	62
Приложения.....	66

1. ВВЕДЕНИЕ

Процессы свободнорадикального окисления (СРО), лежащие в основе метаболизма всех клеток и определяющие адаптивную состоятельность организма к действию повреждающих факторов, являются не только необходимым звеном жизнедеятельности клетки, но и выступают как универсальное неспецифическое звено механизмов развития многих патологических состояний. Одним из вариантов СРО является пероксидное окисление (модификация) липидов (ПОЛ) и белков. Пероксидное окисление идет со значительной скоростью, но стационарная концентрация пероксидов довольно мала вследствие наличия мощной многокомпонентной антиоксидантной системы. Срыв физиологической антиоксидантной защиты (АОЗ) организма ведет к чрезмерному увеличению продукции активных форм кислорода (АФК), инициирующих лавинообразное разветвление процессов СРО в тканях.

Образование свободных радикалов и реактивных метаболитов является одним из основных механизмов, ведущих к повреждению или гибели клеток. В развитии повреждения клеток принимают участие такие высокоактивные молекулы, как супероксидный радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, ионы гипохлорита, синглетный кислород, пероксирадикалы.

Начало 90-х годов ознаменовано пристальным вниманием к проблеме биологической роли оксида азота (NO^\bullet) и становлением новой области биологии - биологии NO^\bullet . Эти исследования способствуют как решению многих фундаментальных проблем биологии, так и могут иметь в дальнейшем большое практическое значение для ветеринарной медицины.

Имеющиеся к настоящему времени данные позволяют считать, что, как в реакциях окислительного стресса, так и в механизмах антиоксидантной защиты принимает участие оксид азота, образование которого доказано практически для всех типов клеток.

Физиологический эффект взаимодействия АФК и NO^\bullet остается предметом активных дебатов. NO^\bullet может фактически замедлять пероксидное окисление липидов, действуя как скавенджер кислородных радикалов. Этот своеобразный "антиоксидантный" эффект NO^\bullet позволил предположить, что взаимодействие между супероксиданионом и NO^\bullet может быть биологически важным путем детоксикации потенциально опасных активных форм кислорода. Несмотря на достигнутые успехи в изучении патогенетических механизмов многих заболеваний, остаются актуальными проведение дальнейших исследований, для более точного и полного представления роли процессов пероксидного окисления, антиоксидантного статуса организма, функционирования системы L-аргинин- NO^\bullet и их взаимосвязи в норме и при патологии.

Нарушение нормального течения окислительных процессов в результате несоответствия прооксидантных и антиоксидантных ресурсов клетки, при-

водящее к формированию оксидативного стресса является основным метаболическим синдромом, который способствует развитию многочисленных морфофункциональных нарушений в организме. Исследование состояния и возможных механизмов нарушения регуляции кислородзависимых процессов предоставляет возможность выяснения общих закономерностей и уточнения патогенеза многих заболеваний. Решение этих вопросов тесно связано с фундаментальными общебиологическими проблемами, такими как образование свободнорадикальных форм кислорода и азота, пероксидной модификацией липидов и белков, функционированием биомембран, компартиментализацией биохимических реакций и может быть весьма полезным для выяснения сложных многоуровневых взаимоотношений различных метаболических звеньев как в норме, так и при патологии.

Механизмы и эффекты взаимодействия систем антиоксидантной защиты и оксида азота, имеющие важное значение для понимания роли этих систем в патогенезе болезней остаются мало изученными. Решение этих вопросов может стать основой для разработки и использования методов, направленных на регуляцию этих взаимодействий в организме, что может оказаться весьма эффективным способом предупреждения и лечения многих заболеваний, связанных с изменением продукции NO^\bullet и нарушением антиоксидантного статуса организма.

2. СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ (ПЕРОКСИДНОЕ) ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Необходимым звеном жизнедеятельности любой клетки является пероксидное окисление липидов (ПОЛ). Данный механизм лежит в основе обновления и перестройки биологических мембран, регуляции их состава, проницаемости и активности мембраносвязанных ферментов. ПОЛ – это физиологический процесс, обеспечивающий в организме фаго- и пиноцитоз, синтез простагландинов, лейкотриенов, холестерина, прогестерона.

По своей химической природе ПОЛ – это вариант свободнорадикального окисления (СРО), реакциям которого подвержены все без исключения соединения, однако наиболее чувствительны к СРО липиды: в первую очередь, ненасыщенные жирные кислоты (НЖК), как свободные, так и в составе фосфолипидов (ФЛ).

Для высших форм жизни необычайно важен молекулярный кислород (O_2), реакция 4-электронного восстановления которого до воды составляет основу биоэнергетики организма человека и животных. Попадая в организм, кислород сразу же вовлекается в реакции оксидантного и оксигеназного типа, протекающие на биологических мембранах и катализируемые ферментами электрон-транспортной системы митохондрий и эндоплазматического ретикулума. В нормальных условиях около 95% молекулярного кислорода потребляется митохондриальной цитохромоксидазой и вовлекается в реакции окислительного фосфорилирования с восстановлением до двух молекул воды. Вместе с тем во

всех живых организмах постоянно протекают реакции с образованием активированных кислородных метаболитов (АКМ) или активных форм кислорода (АФК): $^1\text{O}_2$, O_2^\bullet , H_2O_2 , OH^\bullet , OCl^\bullet , RO_2^\bullet и др. Несмотря на то, что менее 5% молекулярного кислорода, активируемого в ферментативных реакциях, используется по пути неполного восстановления с образованием его реактивных форм, данное явление в настоящее время рассматривается как обязательный компонент процесса жизнедеятельности, а не просто “утечка” с его главного пути использования. Окислительные процессы с участием АКМ являются неотъемлемым звеном существования высших организмов, негэнтропийное состояние которых поддерживается посредством снижения электронной упорядоченности молекулярного кислорода в результате его восстановления.

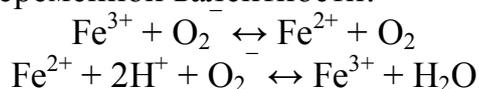
Наличие двух неспаренных электронов существенно ограничивает реакционную способность молекулярного кислорода. Однако в живых организмах в процессе эволюции выработались специализированные ферментативные системы восстановления кислорода посредством переноса на него одного, двух или четырех электронов, донором которых служит активный центр металлопротеинов.

Присоединение одного электрона к молекуле кислорода в основном состоянии приводит к образованию супероксидного анион-радикала (O_2^\bullet). Так как анион O_2^\bullet имеет заряд, он плохо мигрирует через мембраны. Данный радикал является более реакционноспособным соединением, чем кислород; время его жизни в биологических субстратах около 10^{-6} сек.

В клетках супероксидный анион является промежуточным продуктом многих биохимических реакций – таких, как окисление тиолов, флавинов, хинонов, катехоламинов, а также метаболизма ксенобиотиков. Однако основные источники его образования – ферментативные системы: НАДФН-оксидаза фагоцитирующих клеток, ксантиноксидаза, митохондриальная цитохром-с-оксидаза и микросомальные монооксигеназы.

O_2^\bullet - малоактивный радикал и не влияет на функционирование большинства ферментов, хотя и может инактивировать некоторые из них: Ca^{2+} -АТФазу, каталазу, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу, папаин и другие. Будучи нуклеофильным соединением O_2^\bullet окисляет липопротеины сыворотки и фосфолипиды мембран, что приводит к разрушению эритроцитов, выходу лизосомальных ферментов и образованию цитотоксинов.

Супероксидный радикал может, как окислять, так и восстанавливать ионы железа и других металлов переменной валентности:



В физиологических условиях O_2^\bullet индуцирует выход железа из ферретина

и восстанавливает Fe^{3+} до Fe^{2+} , участвуя тем самым в реакциях разложения гидроперекисей, катализируемой металлами переменной валентности. При разложении гидроперекисей образуются радикалы OH^\bullet и RO^\bullet , которые инициируют цепные реакции свободнорадикального окисления, в частности ПОЛ.

Присоединение двух электронов к молекуле кислорода или одного электрона к аниону O_2^\bullet сопровождается образованием двухзарядного аниона O_2^{2-} . В свободном состоянии такой анион не существует, так как энергия связывания атомов кислорода становится отрицательной. Присоединяя протоны, он переходит в гидроперекисный радикал HO_2^- или H_2O_2 , при этом в физиологических условиях преобладает H_2O_2 . Перекись водорода относят к окислителям средней силы, при этом, не будучи радикалом, она взаимодействует с веществами как радикальным, так и нерадикальным путем.

В живых организмах источником пероксида водорода служат ферментативные реакции с оксидазами, переносящими два электрона на молекулу кислорода: ксантиноксидаза, оксидазы L-аминокислот и ряд других, а так же в реакциях дисмутации, катализируемых супероксиддисмутазой (СОД).

Механизмы цитотоксического действия H_2O_2 довольно разнообразны так *in vitro* в концентрациях 0,1-2,5 мМ пероксид водорода вызывает однонитевые разрывы ДНК. При действии H_2O_2 в клетках наблюдается снижение интенсивности гликолиза в результате активации альдегиддегидрогеназы и уменьшения содержания лактата; индукция процессов ПОЛ приводит к изменению физических свойств цитоплазматических мембран, в результате чего ингибируется трансмембранный перенос анионов, но увеличивается проницаемость для макромолекул; возрастает внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , что приводит к активации фосфолипаз и фосфоинозитидного обмена; наблюдается истощение пула АТФ, что сопровождается гибелью клеток.

Цитотоксическое действие H_2O_2 *in vivo* может реализовываться через инактивацию ингибитора протеиназ. При действии перекиси водорода наблюдается инактивация ферментативных антиоксидантов каталазы и глутатионпероксидазы (ГПО). Помимо этого H_2O_2 вызывает дегградацию гемовых белков, что, в частности приводит высвобождению ионов железа из гемоглобина и миогемоглобина. Это в свою очередь усиливает цитотоксическое действие самой перекиси, которое возрастает в 10÷1000 раз. Пероксид водорода является источником возникновения гидроксильного радикала.

Гидроксильный радикал OH^\bullet является наиболее реакционным из АФК, с его образованием связывается цитотоксическое и мутагенное действие АКМ в условиях окислительного стресса. OH^\bullet -радикал может разрывать любую С-Н или С-С- связь. Образование OH^\bullet -радикала показано в реакциях окисления арахидоновой кислоты, при микросомальном окислении, в реакциях с флавиновыми ферментами, убихиноном и пероксинитритом. Однако основным источни-

ком OH^\bullet -радикалов в большинстве биологических систем служит реакция Фентона с участием металлов переменной валентности (Fe^{2+} , Cu^+ , Co^{2+} , Mn^{2+} , V^{2+} , Cr^{4+}) главным образом Fe^{2+} и Cu^+ .



Кроме того, супероксиданион способен вступить во взаимодействие с перекисью водорода (реакция Габера-Вайса), что также приводит к образованию самого активного из инициаторов СРО гидроксильного радикала – продукта 3-электронного восстановления кислорода.



Гидроксильные радикалы вызывают повреждение ДНК, фибронектина, альбумина, других молекул и клеточных структур, инициирует образование органических радикалов и таким образом запускает ПОЛ. Считается, что цитотоксическое действие кислородных радикалов более чем на 50 % обусловлено OH^\bullet -радикалами, при этом в клетках выделяют два критических объекта повреждения: нуклеиновые кислоты и мембранные белки.

Кроме того, в фагоцитах под действием миелопероксидазы из перекиси водорода могут образовываться синглетный кислород и гипохлорная кислота (HOCl), которая также является чрезвычайно токсическим соединением, превращающимся в дальнейшем в различные хлорамины (R-NH-Cl) за счет взаимодействия с таурином и β -аминокислотами.

Физиологический смысл образования всех вышеперечисленных соединений состоит в том, что АФК являются составной частью неспецифической защитной системы организма против различных патогенов, микроорганизмов, опухолевых клеток. Однако при определенных условиях и нормальные клетки организма также могут стать мишенью АФК, например, в участках острого воспаления, в частности, при токсическом повреждении печени.

Система реакций ПОЛ, протекающих на мембранных структурах в присутствии ионов железа, включает в себя не менее 9 частных реакций, 4 из которых могут лимитировать скорость процесса. На первой стадии процесса гидроксильный радикал выбивает протон из – CH_2 -группы, располагающейся между – $\text{CH}=\text{CH}$ - радикалами жирных кислот. Этот процесс является лимитирующим звеном всей цепной реакции и от его скорости зависит скорость процесса в целом. Обладая высокой реакционной способностью, первичные продукты перексидного окисления липидов оказывают повреждающее действие на различные биомолекулы, в первую очередь, на белки. Повреждающее влияние липидных перекисей и свободных радикалов на белковую молекулу реализуется за счет взаимодействия с SH -, NH_2 - и CH_3 - группами белков, что часто приводит к инактивации действия многих ферментов. Липидные пероксиды легко вызывают полимеризацию ферментов, они увеличивают скорость потребления кислорода и оказывают разобщающее действие на окислительное фосфорилирование

в митохондриях. Первичные продукты ПОЛ оказывают свое разрушительное действие не только на узловые ферменты гликолиза, цикла трикарбоновых кислот в дыхательной цепи, но также и на основное макроэргическое соединение организма – АТФ.

Пероксиды липидов являются сравнительно неустойчивыми веществами и легко подвергаются гомолитическому распаду, особенно в присутствии катализаторов – ионов металлов переменной валентности, с образованием более устойчивых вторичных (промежуточных) продуктов ПОЛ. К ним относятся такие кислородсодержащие соединения, как спирты, альдегиды и диальдегиды, лактоны, эпоксиды и т.д. В биологических системах эти продукты находятся обычно в достаточно высоких стационарных концентрациях и принимают участие в различных биохимических процессах. Поэтому их общее содержание не всегда отражает реальную интенсивность течения процессов ПОЛ. Низшие альдегида и кетоны (малоновый диальдегид, ацетон, гексаналь и др.), строго говоря, являются конечными продуктами свободнорадикального окисления липидов. Однако, имея высокую реакционную способность, они достаточно быстро подвергаются дальнейшим превращениям и чаще всего определяются в совокупности с промежуточными карбонильными продуктами ПОЛ, качественный состав которых необычайно широк. Такие вторичные продукты ПОЛ, как кетоны и альдегиды в клетках и тканях, с одной стороны, являются субстратами многих цитозольных и микросомальных ферментов, а с другой стороны, могут образовываться не только в результате расщепления гидроперекисей, но и при распаде некоторых других веществ. Эти и другие факторы свидетельствуют о том, что анализ карбонильных продуктов ПОЛ не всегда может служить надежным критерием оценки интенсивности ПОЛ, как в простых модельных системах, так и применительно к биологическим объектам.

Диальдегиды и ряд других вторичных продуктов ПОЛ, взаимодействуя с NH_2 -концевыми остатками аминокислот, белков и аминокетонами фосфолипидов, образуют конъюгированные флуоресцирующие соединения типа оснований Шиффа. Эти соединения являются более стабильными или «конечными» продуктами ПОЛ, так как утилизация их в организме происходит с очень низкой скоростью, и в результате этого они накапливаются в тканях животных.

Высокая биологическая активность различных продуктов пероксидного окисления липидов, а также других различных интермедиатов кислорода обусловила необходимость постоянного функционирования в организме специальных механизмов противоокислительной (антиоксидантной) биологической защиты. Она выполняет защитную функцию, надежно ограничивая ПОЛ на всех его этапах, начиная от стадии образования активных форм кислорода. К компонентам АОС относятся: акцепторы электронов – витамины Е и К₃; акцепторы O_2^\bullet – метионин, цистеин; ловушки OH^\bullet – алифатические спирты, а также факто-

ры обезвреживания токсических продуктов ПОЛ – токоферол (ТФ), СОД, глутатионпероксидаза (ГПО), хелаторы металлов переменной валентности. К факторам антиоксидантной защиты следует также отнести нормальный (достаточный) уровень липидных компонентов мембран, строго определенный спектр мембранных составляющих, а также их упорядоченную организацию, что препятствует хаотропному эффекту. Ослабление любого звена АОС, будучи ни чем не компенсировано, активирует ПОЛ.

2.1. Первичные продукты пероксидного окисления липидов

Арсенал методов, позволяющих проводить количественное определение органических пероксидов, весьма широк и включает комплекс химических и инструментальных методов. Однако, в биологических исследованиях их применение крайне ограничено. В настоящее время наиболее точным и специфичным является йодометрический метод, имеющий огромное число модификаций. Однако он применим в тех случаях, когда в образцах липидов содержится не менее 5-50 мэкв легко восстанавливаемых пероксидами. Несмотря на достаточную чувствительность, йодометрический метод требует использования довольно значительных количеств липидов (50-70 мг). Другая группа методов, используемых для определения первичных продуктов ПОЛ в биологическом материале, основана на методе полярографии. Он обладает рядом преимуществ (высокая чувствительность, возможность исследования малых объемов исходного материала, хорошая воспроизводимость результатов, возможность измерения абсолютных концентраций перекисей в тканях, клетках, мембранных структурах и др.). Однако, существенным недостатком этой группы методов является проведение достаточно трудоемких и длительных процедур, связанных с предварительной подготовкой образцов, главным образом в среде азота или инертного газа.

Более простой и удобной для обнаружения первичных молекулярных продуктов ПОЛ является группа методов УФ-спектрофотометрии, основанная на 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. Однако, при использовании этого метода количественное толкование результатов с использованием абсолютных величин коэффициентов молярных экстинкций в силу ряда причин весьма ограничено и может вести к сильному завышению оценок содержания первичных продуктов ПОЛ.

Кроме этих основных групп методов при анализе первичных продуктов пероксидного окисления липидов используются такие методы, как ИК-спектрофотометрия, ПМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография, изотопные методы.

2.2. Промежуточные продукты пероксидного окисления липидов

Пероксиды липидов являются сравнительно неустойчивыми веществами и легко подвергаются гомолитическому распаду, особенно в присутствии катализаторов-ионов металлов переменной валентности, с образованием более устойчивых вторичных (промежуточных) продуктов ПОЛ. К ним относятся такие кислородосодержащие соединения, как спирты, альдегиды и диальдегиды, лактоны, эпоксиды и т.д. В биологических системах эти продукты находятся обычно в достаточно высоких стационарных концентрациях и принимают участие в различных биохимических процессах. Поэтому их общее содержание не всегда отражает реальную интенсивность течения процессов ПОЛ. Низшие альдегиды и кетоны (малоновый диальдегид, ацетон, гексаналь и др.), строго говоря, являются конечными продуктами свободнорадикального окисления липидов. Однако, имея высокую реакционную способность, они достаточно быстро подвергаются дальнейшим превращениям и чаще всего определяются в совокупности с промежуточными карбонильными продуктами ПОЛ, качественный состав которых необычайно широк. Такие вторичные продукты ПОЛ, как кетоны и альдегиды в клетках и тканях, с одной стороны, являются субстратами многих цитозольных и микросомальных ферментов, а, с другой стороны, могут образовываться не только в результате расщепления гидропероксидов, но и при распаде некоторых других веществ. Эти и другие факты свидетельствуют о том, что анализ карбонильных продуктов ПОЛ не всегда может служить надежным критерием оценки интенсивности ПОЛ как в простых модельных системах, так и применительно к биологическим объектам. Несмотря на это, в биохимических исследованиях получил широкое распространение метод определения карбонильных продуктов ПОЛ, в частности, малонового диальдегида по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК).

2.3. Конечные продукты пероксидного окисления липидов

Диальдегиды и ряд других вторичных продуктов ПОЛ, взаимодействуя с N-концевыми остатками аминокислот, белков и аминок группами фосфолипидов, образуют конъюгированные флуоресцирующие соединения типа оснований Шиффа. Эти соединения являются более стабильными или "конечными" продуктами ПОЛ, так как утилизация их в организме происходит с очень низкой скоростью и в результате этого они накапливаются в тканях животных. Флуоресцирующие продукты ПОЛ являются комплексами липопротеидов, входящих в состав известного внутриклеточного образования – липофусцина ("пигмента старения"). Сравнение содержания малонового диальдегида (ТБК-активного продукта) и уровня флуоресценции в липидных системах, как критериев оценки интенсивности ПОЛ показал, что определение флуоресцирующих оснований

Шиффа в 10-100 раз является более чувствительным и не зависит от степени окисленности системы. Соединения типа оснований Шиффа обладают высокой реакционной способностью. Они могут производить межмолекулярные "сшивки", а также вступать в реакции полимеризации и поликонденсации. В результате этого теряются присущие биополимерам, биомембранам и другим молекулам функциональные свойства.

3. СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ (ПЕРОКСИДНОЕ) ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ

В настоящее время накоплены многочисленные данные, касающиеся изучения механизмов пероксидного окисления липидов, его роли в нормальном функционировании клеток, в патогенезе различных заболеваний. Однако активные формы кислорода могут вызывать окислительную деструкцию не только липидов, но и белков. Белки являются не только мишенью окислительного воздействия в клетках, но могут выступать и как катализаторы окислительного повреждения, следовательно, повреждение влияет больше чем на одну молекулу. Считается, что окислительная модификация белков играет ключевую роль в молекулярных механизмах окислительного стресса и может являться пусковым механизмом окислительной деструкции других молекул (липиды, ДНК) клетки.

Окислительная модификация белков (ОМБ) инициируется главным образом реакцией с OH^\bullet -радикалом. Однако течение процесса окисления определяется доступностью O_2 и $\text{O}_2^{\bullet -}$, или его протонизированной формой (OH_2^\bullet). В совокупности эти АФК могут приводить к окислению белковых остовов, следствием чего является фрагментация белков, образование белок-белковых сшивок

Помимо белковых остовов окислению подвергаются так же и аминокислоты боковых цепей. Особенно чувствительны к окислению практически всеми формами АФК цистеиновые и метиониновые остатки. Цистеиновые остатки превращаются в дисульфиды, а метиониновые остатки в метионинсульфоксиды (MeSOX). Большинство биологических систем содержат дисульфидные редуктазы и MeSOX -редуктазы, которые могут превращать окисленные формы цистеиновых и метиониновых остатков обратно до их немодифицированной форм. Циклическое окисление-восстановление метиониновых остатков служит в качестве встроенной АФК-улавливающей системы для защиты таких белков от более обширных необратимых окислительных модификаций.

При окислении белков в боковых цепях (особенно Pro, Arg, Lys, и Thr) образуются карбонильные группы ($-\text{C}=\text{O}$) (альдегиды и кетоны). При прямом окислении аминокислотных остатков боковых цепей образуются следующие производные: 2-пирролидон из пролилового остатка, глутамикосемиальдегид из аргининового и пролилового остатков, α -аминоадепиновый семиальдегид из лизинового остатка. Эти производные химически стабильны.

Поэтому уровень степень окислительной модификации белков оценивают по содержанию карбонильных групп (реакция с 2,4-динитрофенилгидразином), которые образуются в белковой молекуле в основном в результате прямого окисления некоторых аминокислотных остатков свободными радикалами, а также при взаимодействии с продуктами ПОЛ или редуцирующими сахарами.

Белковые карбонильные производные могут также генерироваться через окислительный разрыв белков. Кроме того, СО-группы могут быть введены в белки вторичной реакцией нуклеофильных боковых цепей (Cys, His) и остатков Lys с альдегидами (4-гидрокси-2-ноненалом, МДА), образованных при пероксидном окислении липидов или с активными карбонильными производными (кетоамины, кетоальдегиды). Карбонильные производные образуются в последовательности реакций редуцирующих сахаров или их окисленных продуктов с лизиновыми остатками белков.

Поскольку аминокислотные остатки содержат очень незначительные количества СО-групп, любое определяемое возрастание на единицу белка может рассматриваться как результат окислительного стресса, возникающего при дисбалансе АФК-генерирующих и улавливающих механизмов.

Внутриклеточный уровень окисленного белка отражает баланс между скоростью окисления белка и скоростью его деградации. Этот баланс, с одной стороны, является комплексной функцией множества факторов, которые ведут к генерации АФК, поскольку любая форма АФК способна вызывать модификации белков. С другой стороны, функцией многочисленных условий, которые определяют концентрации и/или активности протеаз, расщепляющих окислительно поврежденный белок. Например, окисленные формы некоторых белков, в частности, белки со сшивками и белки, измененные гликацией или продуктами ПОЛ, не только устойчивы к протеолизу, но, фактически, могут ингибировать способность протеаз к деградации окисленных форм других белков. Способность белков к модификации зависит от концентрации бесчисленных ферментативных и неферментативных антиоксидантов, которые могут или ингибировать образование АФК или способствовать их превращению в неактивные производные.

Окислительная модификация белков может сильно изменить их свойства, что выражается в изменении конформации (денатурация) и гидрофобности белковой молекулы при окислении, в нарушении связывания с лигандами (избыточное гликатирование гемоглобина проявляется в нарушении транспорта им кислорода). Повреждение белков свободными радикалами приводит к снижению изоэлектрической точки, предположительно, вследствие утраты основных аминокислотных остатков (лизин, аргинин, гистидин) или образования большего числа ацетатных остатков, что связано с превращением гистидина, пролина и

цистеина в аспартат, глутамат и цистенную кислоту, соответственно, а также к изменению вязкости и спектра кругового дихроизма.

Показана инактивация ряда ключевых ферментов метаболизма при инкубации в системе металл-катализируемого окисления *in vitro*. Модификация препарата СОД гидропероксидом трет-бутила (t-BuOOH) или аутоокисленным метиллиноленатом в присутствии Fe^{3+} вызывала падение ее активности и фрагментацию белковой молекулы. В частности, окислительная инактивация бактериальных ферментов за счет АФК нейтрофилов, очевидно, важна для защиты организма от инфекций. Для полной инактивации ферментов часто достаточно изменения всего одного (или нескольких) аминокислотных остатков. Модификация остатков тирозина (например, нитрозирование при реакции с пероксинитритом) может препятствовать фосфорилированию белков киназами при передаче сигналов, что способствует дисфункции клеток при изменении окислительного состояния. Окислительная модификация белков повышает их иммуногенность.

Среди разнообразных типов повреждений, которые встречаются в макромолекулах, окислительная модификация внутриклеточных белков часто ведет к потере их каталитической функции и такие белки подвергаются избирательному разрушению. Окислительное повреждение специфического белка, особенно в активном центре, может таким образом приводить к постепенной потере отдельных биохимических функций.

Повышение стационарного уровня окисленных белков с измененными свойствами (особенно, ферментов) при окислительном стрессе может нарушить клеточный метаболизм и вызвать дисфункцию целых органов и систем органов.

Умеренная окислительная модификация делает белки, за редким исключением, более доступными для многих обычных протеаз. Предполагают, что окислительная модификация клеточных белков играет важную роль в их нормальном кругообороте в клетке, маркируя отжившие молекулы для их деградации протеазами.

Возрастание доступности белка для протеолиза может быть связано с его частичной денатурацией и повышением гидрофобности. Белки с очень высокой степенью окислительной модификации могут быть денатурированы и агрегированы до такой степени, что их протеолитическая доступность снижается. Однако, как правило, при умеренном окислении белков происходят очень незначительные конформационные изменения и изменение размера белковой молекулы. Вероятно, что даже образующиеся белковые фрагменты остаются, по крайней мере, вначале, в конформации, близкой к нативной. Следовательно, можно предполагать существование в клетке ферментов, ответственных за предпочтительное расщепление окисленных белков, которые специфически узнают модифицированные аминокислоты.

Деградация окисленных белков, которая сводит к минимуму агрегацию и

образование сшивок, а также удаляет потенциально токсичные белковые фрагменты, позволяет считать протеазы, расщепляющие окислительно модифицированные белки одними из ферментов антиоксидантной защиты организма.

В настоящее время нет четкой определенности, является ли накопление окисленных белков и, в частности, карбонильных групп в белках при окислительном стрессе простым проявлением ("маркером") процесса или ответственно за изменения физиологических функций. Однако, исходя из накопленных данных о тонкой регуляции свойств наиболее важных клеточных ферментов, трудно представить, что клетка способна эффективно функционировать, когда 40% ее белка находится в неактивной или менее активной форме. По-видимому, в любом случае, белки являются наиболее критической мишенью свободных радикалов в клетке, т.к. их повреждение вызывает быстрые эффекты.

Множество механизмов могут индуцировать пероксидное окисление белковое, следовательно, существуют многочисленные типы белковой окислительной модификации, и нет единственного универсального маркера белкового окисления. Некоторые окислительные модификации являются специфическими, и по окисляемым остаткам, и по образующимся продуктам; другие могут изменять многочисленные остатки и вызывать образование несколько продуктов. В последнем случае, высоко специфический характер белкового окисления составляет одно из преимуществ использования окислительной модификации белка, как маркера окислительного стресса, поскольку это дает значимую информацию о типе свободных радикалов, вовлеченных в процесс окисления. Поскольку формируются различные белковые продукты окисления необходимо использовать соответствующий метод для анализа окислительного стресса. Выбор специфического или общего анализа может также зависеть и от цели исследования. Тем не менее, следует принимать во внимание, что зарегистрированные до настоящего времени специфические модификации влияют только на очень небольшую долю остатков или белков "группы риска", тогда как глобальные модификации часто влияют на существенную долю белков или остатков специфического белка в образце.

Использование определения уровня карбонильных групп в белках как маркеров окислительного стресса может иметь некоторые преимущества по сравнению с определением продуктов пероксидного окисления липидов, поскольку образование белоксвязанных СО-групп является общим феноменом белкового окисления и из-за сравнительно раннего образования и относительной устойчивости окисленных белков. Как известно, клетки разлагают окисленные белки в пределах часов и дней, в то время как продукты пероксидного окисления липидов метаболизируются в пределах нескольких минут. Карбонильные группы в белках образуются рано и являются циркулирующими в течение более длинных периодов в крови, по сравнению с другими параметрами

окислительного стресса, как, например, окисленным глутатионом или МДА. Повышение содержания окисленных белков в сыворотке стабильно в течение, по крайней мере, 4 часов. Химическая устойчивость белковых карбониллов делает их пригодными объектами для лабораторного измерения. Их устойчивость при хранении 3 месяцев при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Поэтому количественное определение карбонильных групп обеспечивает интегральную оценку степени окислительной модификации белков и отражает соотношение между про- и антиоксидантными процессами при действии на организм животных экстремальных факторов физической, химической и биологической природы, при развитии заболеваний различной этиологии, в том числе, и на их субклинической стадии.

Содержание СО-групп в белке резко возрастает при различных патологических состояниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса. Также отмечена высокая корреляция между уровнем СО-групп в белках и тяжестью болезни: содержание карбонильных групп в белках возрастает параллельно с развитием заболевания.

4. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ АЗОТА (оксид азота - NO^{\bullet})

Помимо активных форм (интермедиатов) кислорода (ROS или RIO) в последние годы исследователями все больше внимание уделяется и активным формам (интермедиатам) азота (RNS или RIN) и, в частности оксиду азота (NO^{\bullet}), его роли как универсального трансмиттера в развитии различных патологических состояний.

Термином "оксид азота" (или "окись азота") обозначается восстановленная форма монооксида азота (NO^{\bullet}). Оксид азота по своей химической природе относится к двухатомным нейтральным молекулам. Малые размеры и отсутствие заряда обеспечивают этой молекуле высокую проникаемость через мембраны клеток и субклеточных структур. Оксид азота – газообразное соединение, молекулы которого имеют неспаренный электрон на внешней π -орбитали. Молекулы оксида азота легко диффундируют в биологических средах и являются достаточно долгоживущими: среднее время жизни в биологических тканях 5,6 с ($T_{1/2}$ в почечной ткани крыс – 6,41 сек, в миокарде – 0,1 сек, в крови – 0,05-0,18 сек, а в воде, из которой удален кислород, NO^{\bullet} сохраняется в течение нескольких суток.

Наличие одного электрона с неспаренным спином придает NO^{\bullet} высокую реакционную способность. Взаимодействуя с другими свободными радикалами, молекула NO^{\bullet} способна образовывать ковалентные связи. NO^{\bullet} образует стабильные комплексы с гемоглобином, сывороточным альбумином, а так же с негемовыми железо-серными белками. Нитрозосоединения оксигемоглобина, миоглобина и различных тиолов могут являться своеобразным депо и сохранять

NO^\bullet в биологически активном состоянии. При определенных условиях оксид азота высвобождается из них, посредством чего диапазон и длительность его функций в организме увеличивается.

Свободнорадикальная природа NO^\bullet позволяет ему как активировать цепные свободнорадикальные реакции, так и ингибировать их. Кроме того, оксид азота способен вступать в окислительно-восстановительные превращения, образуя многочисленные азотсодержащие соединения, в которых валентность атома азота может изменяться от -3 до $+6$.

Образование оксида азота в организме животных происходит при ферментативном окислении L-аргинина (рис.1).

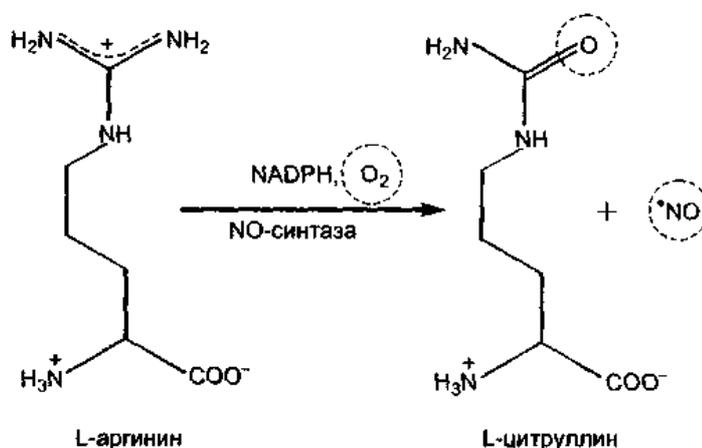


Рис.1 Образование NO^\bullet из L-аргинина

Синтез NO^\bullet осуществляется семейством цитохром-P-450-подобных гем-протеинов – NO-синтаз (КФ 1.14.13.39). Молекулы NO-синтаз содержат домены с редуктазной и оксигеназной активностью (рис.2).

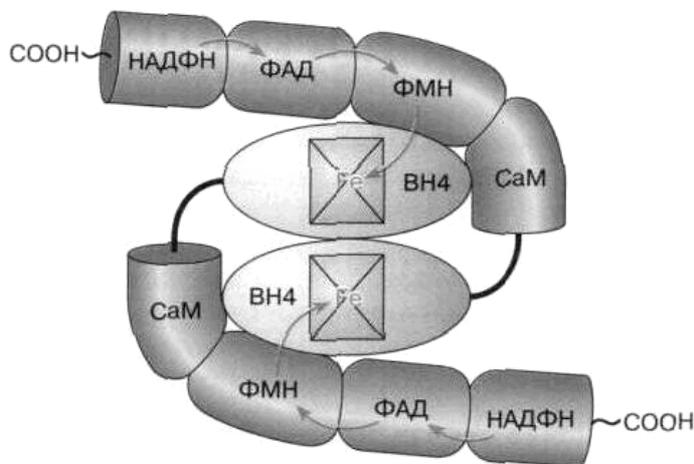


Рис.2. Схематическое представление строения NO-синтазы
(по А.А.Сосунову, 2000).

Обозначения: НАДФН-восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата, ФАД - флавинадениндинуклеотид, ФМН - флавиномононуклеотид, гемовая группа, содержащая железо (Fe), кальмодулин (CaM) и тетрагидробиоптерин (BH4). Связь между белковыми субъединицами происходит в области их М-конца, где с ними связаны гемовые группы. Стрелками показан перенос электронов

По характеру индукции и действия ферменты разделяются на два вида:

1) наиболее мощная кальций-независимая, индуцибельно экспрессируемая цитокинами NO-синтаза (II-типа). Обнаружена в макрофагах, гепатоцитах, фибробластах, миоцитах, ее активность так же выявляется в различных клеточных культурах и тканях. При активации синтеза фермента образование NO^\bullet возрастает в десятки раз, а максимальных значений достигает через часы.

2) менее мощные, постоянно присутствующие в клетках тканей кальций- и кальмодулин-зависимые ферменты – конститутивные NO-синтазы. Они подразделяются на нейрональную (I-тип) и эндотелиальную (III-тип) изоферменты, которые обнаружены в эндотелиоцитах, нейронах, тромбоцитах, нейтрофилах и других клетках. Все три типа синтаз в качестве кофакторов используют НАДФН, ФАД, ФМН и, возможно, тетрагидробиоптерин.

При проведении исследований важнейшую роль играет использование неселективных ингибиторов NO-синтазы - структурных аналогов L-аргинина, конкурентно блокирующих продукцию окиси азота всеми типами NO-синтаз: L-NG-монометил-аргинин (L-NMMA) и L-N^G-аргинина метиловый эфир (L-NAME). Аминогуанидин селективно ингибирует индуцибельную NO-синтазу, а глюкокортикоиды предотвращают ее индукцию (табл.1).

Для биологических тканей помимо генерации оксида азота в ходе ферментативных реакций с участием NO-синтаз показана возможность превращения нитрит-аниона в NO^\bullet . Этот процесс активируется в условиях ацидоза и при наличии восстановленных форм гемсодержащих белков, что характерно для такого патологического состояния как ишемия.

Факт образования NO^\bullet в биологических тканях из нитрит-аниона позволил предположить возможность существования механизма циклического превращения оксида азота в организме.



Являясь одним из основных регуляторов системного вазомоторного тонуса и, следовательно, кровяного давления NO^\bullet также ингибирует агрегацию тромбоцитов, участвует в контроле внутрисосудистого объема за счет влияния на секрецию ренина и выделения натрия с мочой. Помимо действия на сосудистую систему, NO^\bullet оказывает влияние на функционирование многих систем органов посредством своего участия в нейротрансмиссии. На периферии NO^\bullet является

неадренергическим, нехолинергическим нейротрансмиттером, ответственным за расслабление гладкой мускулатуры бронхов и желудочно-кишечного тракта, в то время как в центральной нервной системе NO[•] выступает в качестве нейромодулятора и оказывает влияние на поведение, память и болевую рецепцию. NO[•] также играет существенную роль в воспалительном процессе и инфекционной патологии.

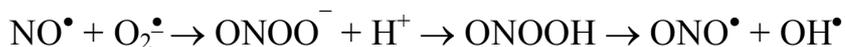
Имеются доказательства того, что NO[•] вовлечен в регуляцию активности генетического аппарата, как на уровне факторов транскрипции, так и на уровне самих механизмов транскрипции и трансляции мРНК. В некоторых случаях, гиперпродукция NO[•] может иметь и отрицательные последствия.

Таблица 1

Характеристики изоформ NO-синтаз

Показатели	Тип 1 (nNOS) конститутивный	Тип 2 (eNOS) конститутивный	Тип 3 (iNOS) индуцибельный
Локализация в клетке	Цитоплазма	Связаны с мембраной	Цитоплазма
Типы клеток	Нейроны, миоциты скелетной мускулатуры	Эндотелий, тромбоциты, эндокард, миокард	Миоциты сосудов, эндотелий, эндо/миокард, гепатоциты, астроциты, фибробласты, макрофаги
Активация	Кальций-зависимая	Кальций-зависимая	Не зависит от кальция
Ответ на стимуляцию (примеры)	Конститутивный фермент (взаимодействие глутамата с рецептором нейрона ведет к немедленному выделению NO дендритами)	Конститутивный фермент (взаимодействие ацетилхолина с рецептором сосудистого эндотелия ведет к немедленному выделению NO)	Индукция синтеза фермента (липолисахариды и цитокины приводят к отсроченному на 2-6 часов выделению большого количества NO)
Неселективные ингибиторы	Аналоги L-аргинина (L-NAME, L-NMMA)	Аналоги L-аргинина (L-NAME, L-NMMA)	Аналоги L-аргинина (L-NAME, L-NMMA)
Селективные ингибиторы. Регуляция			Аминогуанидин. Кортикостероиды и ингибиторы белкового синтеза предотвращают индукцию фермента.

Большинство цитотоксических эффектов NO^\bullet принадлежит пероксинитриту (ONOO^-), который образуется в реакции с супероксидом. Пероксинитрит значительно более активен, он интенсивно нитрозилирует белки и может являться источником очень токсичного гидроксил-радикала OH^\bullet в реакции:



В дальнейшем OH^\bullet вызывает пероксидное окисление липидов и другие явления, входящие в понятие "окислительный стресс". NO^\bullet и его производные могут вызывать пероксидное окисление фосфолипидов и окисление тиольных групп белков митохондриальной мембраны, что также приводит к высвобождению в цитозоль апоптогенных факторов.

ONOO^- обладает универсальной биоагрессивностью, может вступать в реакции с нуклеиновыми кислотами, липидами и белками, вызывая тем самым нарушение функции клетки и повреждение тканей, что может играть существенную роль в патогенезе, как на молекулярном, так и на функциональном уровне.

Представленный далеко не полный спектр биологического действия оксида азота позволяет предполагать, что избыточный или недостаточный синтез NO^\bullet в организме является одним из факторов патогенеза различных заболеваний.

В тоже время NO -ергическая система, как и антиоксидантная система, играет важную роль в стрессорных и адаптивных ответах организма, являясь универсальным регулятором физиологических функций и метаболизма клеток.

В настоящее время описано достаточно много прямых и косвенных методов определения уровней оксида азота с использованием газо- и жидкостной хроматографии, электронного парамагнитного резонанса, масс-спектрометрии и др. Однако, короткий период полураспада и низкие концентрации NO^\bullet in vivo затрудняют применение на практике этих методов для оценки биологических образцов. Кроме того, использование их весьма затруднено из-за высоких требований к измерительной аппаратуре и невозможности обработки больших количеств образцов биологического материала. Указанные трудности количественного определения NO^\bullet могут быть устранены путем измерения его устойчивых метаболитов, в частности нитрита (NO_2^-) и нитрата (NO_3^-).

Единственным устойчивым конечным продуктом самоокисления NO^\bullet в водном растворе является нитрит. Нитрат образуется при реакции NO^\bullet с супероксидом, перекисями или оксигемоглобином. Поэтому плазма и сыворотка крови, а также моча преимущественно содержат нитрат, в то время как значительные количества нитрита могут накапливаться в жидкостях, не содержащих гемоглобина, например, в цереброспинальной или внутрисуставной.

Установлено существование высокой корреляции между эндогенным образованием оксида азота и количеством нитрита и нитрата ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- = \text{NO}_x$) в

плазме, сыворотке и моче. Поэтому, измерение их уровней обеспечивает достаточно адекватную количественную оценку продукции NO^\bullet в организме в условиях *in vivo*.

В настоящее время считается, что активность оксида азота не может быть полностью объяснена только NO , а некоторые другие молекулы могут также играть свою роль, в частности S-нитрозотиолы (RSNO). Предполагается, что NO хранится и переносится как RSNO аддукт, который сохраняет его от инактивации некоторыми молекулами, например гемоглобином, молекулярным кислородом или супероксидом. Существует интенсивное взаимодействие системы генерации оксида азота и систем, которые связывают NO (RSNO), что обеспечивает поддержание необходимого в данный момент уровня оксида азота.

Хотя измерение и определение локализации RSNO трудны для определения, в настоящее время признана роль S-нитрозотиолов в хранении и транспорте оксида азота.

Высокая биологическая активность различных активных форм кислорода и азота их взаимодействие (рис.3), продуктов пероксидного окисления липидов и белков обусловила необходимость постоянного функционирования в организме специальных механизмов противоокислительной (антиоксидантной) биологической защиты.

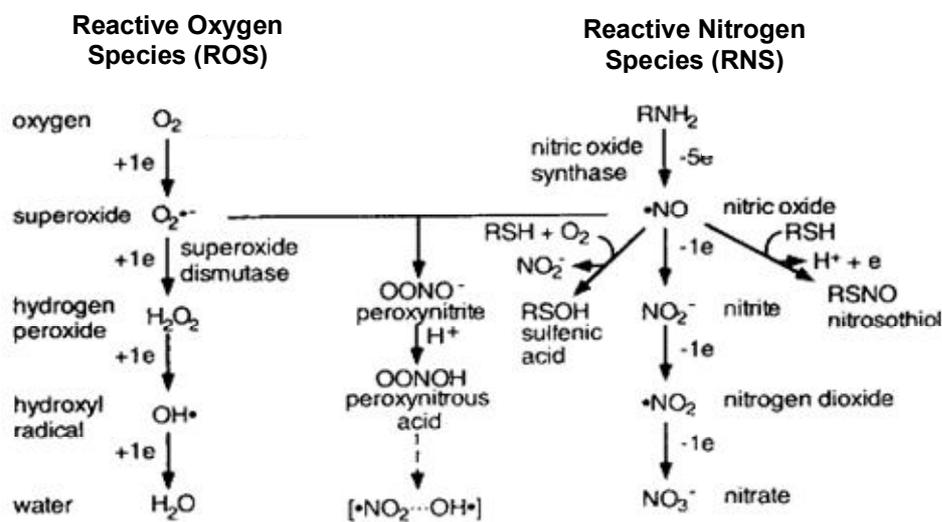


Рис.3. Взаимосвязь активных форм кислорода (ROS) и азота (RNS)

Эти механизмы направлены в первую очередь, на торможение образования активных метаболитов кислорода и процессов свободнорадикального окисления биомолекул. Антиоксидантная биологическая система возникла на самых ранних этапах эволюции живых организмов на Земле, главным образом, как

средство поддержания постоянства их внутренней среды в условиях нарастающего содержания кислорода в атмосфере. При этом осуществляющие антиоксидантную защиту вещества направлено влияют на структуру и функцию субклеточных образований. Важнейший элемент такого влияния – торможение процессов разрушения биомембран и нарушения функциональной активности белков-ферментов. Поэтому функционирующие в организме животных механизмы антиоксидантной защиты играют исключительную роль в поддержании гомеостаза при взаимодействии организма с изменяющимися факторами внешней среды и обеспечении его жизнедеятельности.

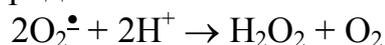
5. СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

Постоянно функционирующая система антиоксидантной защиты организма ограничивает процесс пероксидного окисления практически во всех его звеньях. Можно выделить несколько основных систем, участвующих в регуляции реакций СРО и определяющих по существу их регуляторную и патофизиологическую значимость. Строгая регламентация реакций СРО достигается за счет функционирования согласованной системы ферментативных и неферментативных механизмов контроля за содержанием активных форм кислорода, свободными радикалами и молекулярными продуктами СРО. К факторам антиоксидантной защиты следует также отнести нормальный (достаточный) уровень липидных компонентов мембран, строго определенный спектр мембранных составляющих, а также их упорядоченную организацию, что препятствует хаотропному эффекту. Ослабление любого звена АОС, будучи ни чем не компенсировано, активирует СРО.

5.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы

Регуляция процесса переоксидации на стадии инициации осуществляется ферментами: супероксиддисмутазой и церулоплазмином (ферроксидазой); на стадии разветвления цепей: каталазой, пероксидазой и глутатионпероксидазами и глутатионтрансферазами. При этом восстановление окисленного глутатиона, образующегося в процессе взаимодействия глутатионзависимых антипероксидных систем, осуществляется глутатионредуктазой.

Супероксиддисмутаза (СОД) (КФ, 1.15.1.1.) занимает центральное место в системе ферментной антиоксидантной защиты организма. Она катализирует реакцию дисмутации супероксиданионрадикала с образованием пероксида водорода и молекулярного кислорода:



Поэтому СОД защищает аэробные организмы от повреждающего действия супероксида. Фермент обнаружен в нескольких внутриклеточных компартментах.

У эукариотных организмов обнаружено несколько изоформ фермента. В ядрах, цитоплазматическом матриксе, пероксисомах и межмембранном пространстве митохондрий и плазме крови животных содержится чувствительная к цианиду Cu,Zn -содержащая форма (Cu,Zn-СОД). Молекулярная масса Cu,Zn-СОД составляет 31кДа, молекула состоит из двух идентичных субъединиц, связанных дисульфидным мостиком. Каждая субъединица содержит один атом меди (Cu^{2+}) и один атом цинка (Zn^{2+}). Предполагается, что цинк необходим для стабилизации молекулы, в то время как медь принимает непосредственное участие в дисмутации. Поверхность фермента несет отрицательный заряд, однако в строении молекулы выявлены положительно заряженные каналы, которые ведут к активным центрам и служат, как предполагается, для захвата отрицательно заряженных анион-радикалов. В результате такого избирательного захвата значительно повышается скорость реакции дисмутации.

Кроме того, в митохондриях и матриксе хлоропластов эукариот обнаруживается цианидрезистентная марганцевая форма (Mn-СОД), характерной особенностью которой является устойчивость к действию H_2O_2 и индуцибельность. В межклеточных жидкостях существует высокомолекулярная цианид-чувствительная экстрацеллюлярная форма (Э-СОД), представляющая собой Cu, Zn-содержащий гликопротеин, состоящий из 4-х нековалентно связанных между собой субъединиц, молекулярная масса каждой из которых составляет около 30 кДа. Активный центр фермента содержит 4 атома меди и возможно столько же атомов цинка.

Наиболее древним в эволюционном плане является железосодержащий изофермент (Fe-СОД), представляющий собой димер, субъединицы которого равновелики и не связаны дисульфидными связями. При этом его активность значительно ниже активности Cu,Zn-содержащей формы.

Активность СОД, как фермента играющего ключевую роль в создании антиоксидантной защиты организма, меняется в зависимости от парциального давления кислорода и индуцируется им.

В связи с тем, что субстрат СОД, которым является супероксиданион-радикал весьма нестабилен, выбор метода определения активности СОД имеет очень важное значение.

В настоящее время существует две основные группы методов определения активности СОД: прямое и косвенное. Методы прямого определения активности СОД (импульсный радиолиз воды, ЭПР и др.) основаны на измерении текущей или стационарной концентрации супероксиданионрадикала и их чувствительность ниже, чем чувствительность косвенных химических методов. В связи с этим наибольшее распространение получили косвенные методы, которые заключаются в том, что супероксиданион улавливается какой-либо индикаторной молекулой, превращающейся при этом в окисленную или восстановленную

форму, а активность СОД определяется затем по ее способности ингибировать превращение улавливающей молекулы при действии O_2^{\bullet} . В качестве систем, генерирующих супероксидный радикал используются реакции окисления ксантина ксантиоксидазой, окисления эпинефрина в адренохром, аутоокисление сульфита или пирогаллола, фотохимической генерации с использованием рибофлавина и ряд других. В качестве индикаторных "ловушек" используют цитохром С, тетранитрометан, нитросиний тетразолиевый, нитросиний тетразолиевый хлористый и другие вещества. Все косвенные химические методы определения активности СОД очень близки по чувствительности и воспроизводимости. Существующие модификации методов различаются по источникам генерации супероксидного радикала и используемым индикаторам.

Подобно супероксиддисмутазе реакцию дисмутации O_2^{\bullet} катализирует другой медьсодержащий белок – **церулоплазмин (ЦП, ферро- O_2 -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1)** с молекулярной массой около 134 кДа, связывающий 90...95% сывороточной меди или около 3% всей меди организма. Каждая молекула фермента содержит 6 (7) прочно связанных ионов Cu^{2+} , способных высвободиться только при низких значениях рН и в присутствии восстановителя. Церулоплазмин проявляет каталитическую активность в отношении большого числа субстратов, эффективно окисляет ионы Fe^{2+} , аскорбиновую кислоту, фенолы, амины, катехолы, и является одновременно ферроксидазой, аскорбатоксидазой и аминоксидазой. Связывание супероксиданион-радикалов церулоплазмином происходит с участием пары ионов меди. При этом происходит четырехэлектронное восстановление кислорода до воды, а не до пероксида водорода, как это происходит при действии СОД. В отличие от СОД, защищающей внутриклеточные структуры, церулоплазмин функционирует в крови и перехватывает свободнорадикальные формы кислорода, предохраняя таким образом от их повреждающего действия липидосодержащие биоструктуры.

Однако эффективность церулоплазмينا в отношении связывания супероксиданиона примерно в 100 раз ниже, чем у СОД. Несмотря на это, в настоящее время церулоплазмин, количество которого в крови намного больше, чем СОД, рассматривается в качестве основного антиоксиданта плазмы крови. Особенностью этого белка является высокая стабильность к токсическому действию активных форм кислорода, что позволяет ему сохранять биологическую активность в условиях их интенсивной генерации.

Церулоплазмин проявляет как специфическую, так и неспецифическую антиоксидантную активность. Специфическая активность, связанная со снижением уровня активных метаболитов кислорода может протекать по следующим трем путям:

- церулоплазмин обладает ферроксидазной активностью, окисляя ионы Fe^{2+}

до Fe^{3+} . В результате этого снижается концентрация ионов двухвалентного железа, являющихся необходимым компонентом реакций свободнорадикального окисления на стадиях инициирования и разветвления цепи. Способность ЦП окислять Fe^{2+} по оксидазному механизму, а также ингибировать OH^\bullet , делает его наиболее эффективным сывороточным ингибитором реактивных метаболитов кислорода.

- он может вызывать дисмутацию O_2^\bullet , которая имеет не ферментативный, а стехиометрический характер, со способностью перехватывать O_2^\bullet связывают ингибирующее действие церулоплазмينا на процессы пероксидного окисления липидов в хиломикронах и липопротеинах;

- он способен инактивировать активные формы кислорода, генерируемые миелопероксидазой. Неспецифическая антиоксидантная активность церулоплазмينا обусловлена образованием прочных комплексных соединений с медью (до 95-96% всей меди плазмы).

Помимо антиокислительных функций церулоплазмин участвует в транспорте меди, мобилизации сывороточного железа для кроветворения, регуляции уровня биогенных аминов в сыворотке крови (окисление катехоламинов, оксиндолов). Он также является реактантом "острой фазы" при различных инфекционных заболеваниях, остром и хроническом воспалительных процессах, злокачественном росте, инфаркте миокарда и ряде других заболеваний.

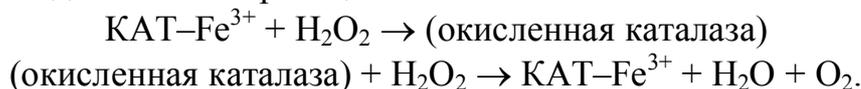
В зависимости от целей исследования для определения активности или содержания церулоплазмينا используют, в основном, две группы методов. Первая группа методов основана на антигенных свойствах церулоплазмينا как белка и позволяет определять иммунореактивный церулоплазмин. Вторая группа методов основана на оксидазных свойствах церулоплазмينا, как ферроксидазы и позволяет определять ферментативно активный церулоплазмин.

Образующая в результате реакции дисмутации супероксидных радикалов, катализируемой супероксиддисмутазой, а также другими путями, пероксид водорода является высокоактивным токсическим агентом. Если бы в клетке не было бы механизмов быстрого обезвреживания H_2O_2 , то она, реагируя с супероксиданионом, генерировала бы радикал гидроксила (OH^\bullet), который чрезвычайно активно окисляет органические молекулы практически всех типов, полностью снимая антиоксидантный эффект СОД и церулоплазмينا. Поэтому поддержание нормального уровня обмена H_2O_2 и предотвращений ее накопления в клетках и тканях имеет жизненно важное значение. Первоочередную роль в этом играют ферменты, которые избирательно катализируют разрушение ее молекул. В первую очередь это каталаза и различные пероксидазы, которые катализируют формально подобный тип реакции.

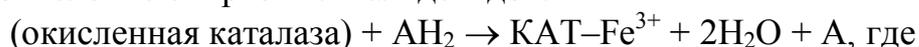
Каталаза (КФ 1.11.1.6) – гемсодержащий фермент с молекулярной массой около 250 кДа, разрушающий пероксид водорода без участия акцепторов кислорода, а донором электронов служит сам пероксид водорода. Она является

наиболее активным из известных ферментов. По структуре фермент является тетрамером, содержащим по одной прочно связанной гемовой простетической группе на субъединицу.

Согласно современным представлениям, каталаза препятствует избыточному накоплению в клетках пероксида водорода посредством его разложения в ходе двух последовательных реакций:



При этом в окисленном состоянии фермент может работать как пероксидаза, катализируя окисление спиртов или альдегидов:



АН_2 – донор электронов.

В физиологических условиях каталазная активность примерно в 10 тыс. раз выше, чем пероксидазная и одна молекула фермента в секунду способна разложить до 44000 молекул перекиси водорода (Прайор У., 1979).

Каталаза широко распространена в организме животных, причем наибольшая активность фермента обнаружена в печени, эритроцитах и почках. В эритроцитах каталаза находится в комплексе с НАДФН. Динуклеотид не является необходимым для проявления специфической активности фермента, но он предотвращает его инактивацию. В клетках до 80% каталазы локализовано в пероксисомах, где ее концентрация достигает 10^{-6} М.

Функцией фермента является предотвращение накопления в клетках пероксида водорода, образующейся, в частности, при дисмутации супероксидного аниона и при аэробном окислении восстановленных флавопротеидов. Каталаза относится к ферментам, которые наиболее длительно сохраняют свою высокую активность, почти не требует энергии активации, а скорость реакции, катализируемой этим ферментом, лимитирует лишь скорость диффузии субстрата к активному центру каталазы. Несмотря на столь высокую активность фермента, до сих пор нет чувствительного способа ее определения, доступного для широкого исследования в лабораторной практике. Применяемые титрационные методы имеют низкую чувствительность, к тому же они довольно сложны и трудоемки.

Кроме этого, существует еще ряд методов, например, с использованием кислородного электрода Кларка, полярографические методы, однако они требуют специальной аппаратуры. Наиболее приемлемыми с точки зрения чувствительности и техники исполнения являются спектрофотометрические методы, основанные на измерении концентрации H_2O_2 в инкубационной среде, либо по максимуму поглощения самой H_2O_2 , либо по поглощению ее окрашенных комплексов с солями некоторых металлов в ультрафиолетовой области спектра.

При низких концентрациях H_2O_2 разлагается группой ферментов – пероксидазами, которые отличаются друг от друга субстратами, которые используют

ся в качестве доноров водорода. Эти ферменты высоко специфичны только к пероксидазной группировке и в большинстве случаев мало специфичны по отношению к донору водорода. К этой группе ферментов относится НАДН – пероксидаза (КФ 1.11.1.1.), НАДФН-пероксидаза (КФ 1.11.1.2.), цитохромпероксидаза (КФ 1.11.1.5), классическая пероксидаза (КФ 1.11.1.7), глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) и другие пероксидазы.

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) в отличие от каталазы содержит всего одну гемовую группу на одну молекулу фермента. Также как и каталаза, пероксидаза восстанавливает H_2O_2 до воды, используя в качестве доноров водорода фенолы, амины, органические кислоты. На этом основано большинство методов определения активности пероксидазы, например, по изменению окраски при окислении бензидина пероксидью водорода.

В животных тканях пероксидаза распространена не так широко, как каталаза. Наибольшая активность пероксидаз выявлена в тонком и толстом кишечнике, селезенке и легких. Пероксидазная активность крови обусловлена, в основном, ее наличием в гранулоцитах. В тоже время пероксидазы, в частности, миелопероксидаза, адсорбируясь на мембранах фагоцитированных бактерий генерирует альдегиды, синглетный кислород (1O_2), другие свободные радикалы, которые повреждают клетки. Пероксидаза может окислять полиненасыщенные жирные кислоты с образованием гидропероксидей и малонового диальдегида. В связи с этим ее значение в системе антиоксидантной защиты организма остается пока неясным.

Ведущее место в ферментативном звене антиоксидантной защиты организма, обеспечивающим защиту от повреждающего действия пероксидей различной природы, принадлежит глутатионпероксидазе, являющейся одним из компонентов антипероксидного комплекса, включающего глутатион и глутатионредуктазу и осуществляющую восстановление окисленного глутатиона, образующегося в процессе функционирования глутатионзависимых антипероксидных систем.

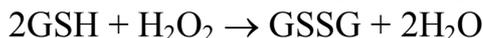
Глутатионпероксидаза – селеносодержащий фермент катализирующий превращение пероксида водорода и органических гидропероксидов до гидросоединений, которые в дальнейшем могут метаболизироваться клеточными системами. Фермент представляет собой тетрамер, состоящий из 4-х идентичных сферических субъединиц с молекулярной массой около 19 кДа. Каждая субъединица содержит по одному атому Se, входящему в состав селеноцистеиновых остатков и расположенному в активном центре каждой субъединицы. Фермент имеет 2 активных GSH-связывающих центра. Для инактивации пероксида водорода, разложения и детоксикации гидропероксидов и органических перекисей, прежде всего, липидных и фосфолипидных, в клетках высших животных суще-

ствует селенсодержащая глутатионпероксидаза (ГПО, КФ 1.11.1.9).

Глутатиопероксидаза катализирует реакцию восстановления глутатионом (GSH) нестойких органических гидропероксидов, включая гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), в стабильные соединения – оксикислоты (ROH):



Все изоферменты ГПО способны также утилизировать и H_2O_2 :



До 70% ГПО локализовано в цитозоле, и около 20-30% – в митохондриях всех клеток млекопитающих. Известны селеновые изоферменты: внеклеточная ГПО, обнаруженная в плазме и молоке, особый изофермент ГПО1, выделенный из цитозоля клеток печени и кишечника, ГПО гидроперекисей фосфолипидов. Кроме того, обнаружен также неселеновый изофермент (ГПО2), идентичный глутатион-S-трансферазе (КФ 2.5.1.18).

Согласно схеме циклического трех этапного механизма действия глутатионпероксидазы (ГПО 1), на первом этапе селенол E-SeH сначала восстанавливает гидропероксид ненасыщенной жирной кислоты ROOH в жирную гидроксикислоту ROH, которая подвергается β -окислению или взаимодействует с мультиферментным комплексом синтетазы жирных кислот. Сам селенол в активном центре фермента (E) окисляется в селениновую кислоту E-Se (O) OH. На втором этапе "окисленный" фермент образует с глутатионом (GSH) комплекс, реагирующий на последнем этапе со второй молекулой GSH с образованием глутатиондисульфида GSSG и исходной формы селенола в активном центре фермента. Помимо селеносодержащей глутатионпероксидазы (ГПО1) в организме животных обнаружена глутатионпероксидаза, не содержащая селена (ГПО2). Она имеет молекулярную массу 45000 и иные физико-химические и каталитические свойства. В отличие от ГПО1, активно катализирующей превращение H_2O_2 и органические гидропероксиды, ГПО2 обладает субстратной специфичностью только к органическим гидропероксидам. На этом отличие основано раздельное определение активности ГПО1 и ГПО2. В качестве субстрата для определения активности ГПО1 используется пероксид водорода, а для определения активности ГПО2 чаще всего используют гидропероксид изопропилбензола или кумола.

ГПО2 идентичная ферментам семейства глутатион-S-трансфераз, которые в большей степени связаны с детоксикацией продуктов ПОЛ, генерирующихся в эндоплазматическом ретикулуме при метаболизме ксенобиотиков. Кроме этого, глутатион-S-трансфераза может непосредственно катализировать детоксикацию ксенобиотиков посредством переноса на них атомов серы от глутатиона с последующим образованием меркаптидов – соединений серы с металлами, меркаптуровых кислот, а также глутатионпроизводных чужеродных веществ.

Видовые и органические особенности активности ГПО2, в частности, значительное превалирование ее активности в печени большинства животных над ГПО 1, указывает на явную антиоксидантную функцию ГПО2 и, по-видимому, объясняют относительную толерантность ряда видов животных к дефициту селена.

В целом антиоксидантный эффект ГПО1 и ГПО2 в цепи пероксидного окисления липидов, инициируемого свободными радикалами с участием активных форм кислорода заключается в следующем. Селеносодержащая глутатионпер-оксидаза (ГПО1) предотвращает продолжение процесса пероксидного окисления липидов, во-первых, обезвреживая уже образовавшиеся гидропероксиды жирных кислот и, во-вторых, предупреждает их образование, расщепляя H_2O_2 , которая, реагируя с супероксидным анион-радикалом, генерирует радикал гидроксила, чрезвычайно активно окисляющий органические молекулы всех типов.

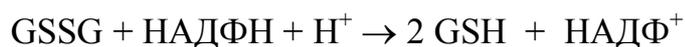
Поскольку селеннезависимая глутатионпероксидаза (ГПО2) не расщепляет H_2O_2 , она участвует в антиоксидантной защите мембранных липидов, взаимодействуя с гидропероксидами жирных кислот. ГПО2 сначала с помощью глутатиона (G-SH) катализирует превращение гидропероксида жирной кислоты в промежуточное соединение типа R-O-SG. Далее из второй молекулы GSH и остатка первой молекулы GSH, вошедшей в состав промежуточного соединения, образуется глутатиондисульфид (GSSG), представляющий окисленную форму глутатиона.

Восстановление окисленного глутатиона (GSSG), образующегося в глутатионпероксидазной реакции, осуществляется с участием глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.8.1.7) и систем восстановления НАДФ⁺, в частности, в процессе пентозофосфатного пути окисления глюкозо-6-фосфата. Поддержание достаточного уровня восстановленного глутатиона необходимо для поддержания функционирования глутатионзависимого звена антиоксидантной системы (рис.4):



Рис.4. Глутатионзависимое звено антиоксидантной системы

Глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2) имеет молекулярную массу около 44000 Да и локализована, в основном, там же, где и антипероксидные глутатионзависимые ферменты. В качестве доноров водорода для восстановления окисленного глутатиона, главным образом, используется НАДФН, но может использоваться и НАДФ.



Активность глутатионредуктазы существенным образом зависит от обеспеченности организма рибофлавином. Наибольшая активность фермента обнаружена в почках, тонком кишечнике, эритроцитах. В зависимости от задач исследования и наличия реактивов активность глутатионредуктазы определяют либо по убыли в среде инкубации восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДФН или НАДН) или по увеличению количества восстановленного глутатиона. Оба метода достаточно специфичны, дают воспроизводимые результаты, но отличаются друг от друга выражением единиц активности фермента.

Помимо описанной выше системы основных ферментов антиоксидантной системы организма, ограничивающих процесс пероксидного окисления липидов на разных его стадиях система антиоксидантной защиты включает в себя и ферментативное звено, состоящее из низкомолекулярных эндогенных антиоксидантов.

5.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы

Центральное место в неферментативном звене антиоксидантной системы организма животных занимают токоферолы. Они широко представлены в растительном и животном мире, однако, они не синтезируются в организме животных. В основе их химического строения лежит углеродный скелет, который называется токолом. Он включает двухциклическое кольцо хромана (бензоде-гидропирана) и углеводородную (изопреновую) боковую цепь из 16 атомов углерода. Весьма специфично для молекулы токоферолов наличие одной гидроксильной и одной-трех метальных групп, связанных с углеродными атомами ядра хромана. В зависимости от числа и пространственного расположения метальных групп принято рассматривать восемь токоферолов (α , β , γ и т.д.), из которых α -токоферол (5,7,8-триметилтокол) является наиболее биологически активным.

Витамин Е является основным эндогенным жирорастворимым антиоксидантом. Он представлен несколькими гомологами (α -, β -, γ -, δ - токоферолами) из которых наибольшей антиоксидантной активностью обладает α -токоферол. Свою антиоксидантную функцию α -токоферол может осуществлять тремя способами: создавая компактную мембранную архитектуру, предотвращающую атаку активных форм кислорода на ненасыщенные жирные кислоты мембранных фосфолипидов; локально разрушая образующиеся липидный пероксидные радикалы; разрушая кислородные радикалы в полярных участках мембран, где функционируют белки электротранспортной цепи. Витамин Е является эффективным "тушителем" синглетного кислорода, акцептором анионрадикала кислорода и "перехватчиком" свободных радикалов, непосредственно реагируя с ними на стадии обрыва цепей. Антиоксидантную активность витамина Е связывают, главным образом, с взаимодействием с пероксидными соединениями органической природы. Образующиеся фенольные радикалы токоферола стабильны и не взаимодействуют с ненасыщенными жирными кислотами, поэтому они не участвуют в продолжении цепных реакций ПОЛ.

С другой стороны, они могут осуществлять обрыв цепи при взаимодействии с пероксидными радикалами жирных кислот. Активно реагировать с пероксидными радикалами может только восстановленная (фенольная) форма витамина Е, имеющая свободную гидроксильную группу. Хинонная (окисленная) форма практически не реагирует с пероксидными радикалами. Переход витамина Е из одной формы в другую со значительной потерей антирадикальной активности можно рассматривать как способ регуляции интенсивности процессов пероксидного окисления липидов.

Вещества, способные восстанавливать хинонную форму в фенольную, регенерируют антирадикальную активность витамина Е и являются поэтому его синергистами. Как правило, роль синергистов выполняют вещества, имеющие

невысокий окислительно-восстановительный потенциал и легко переходящие из окисленной формы в восстановленную (например, аскорбиновая и лимонная кислоты). Поэтому антиоксидантные свойства α -токоферола в большой степени зависят от уровней других витаминов с антиоксидантными свойствами, в частности, аскорбиновой кислоты.

Выступающая в качестве донора протонов при восстановлении токоферолов **аскорбиновая кислота (витамина С)**, окисляется при этом до дегидроаскорбиновой. Кроме того, сама аскорбиновая кислота может непосредственно взаимодействовать с синглетным кислородом, гидроксильным радикалом и супероксидным анионрадикалом, а также разрушать пероксид водорода.

Антиоксидантное действие аскорбиновой кислоты связано, в основном, с разрушением водорастворимых пероксидных радикалов. При физиологических концентрациях (0,1-0,5 мМ в плазме) аскорбиновая кислота способна окисляться за счет иона гипохлорита $OSCl^-$, играя роль физиологической "ловушки" и защищая тем самым компоненты плазмы от инактивирующего его действия. Одноэлектронное окисление аскорбиновой кислоты при взаимодействии с окислителем приводит к образованию радикала семигидроаскорбиновой кислоты. Этот радикал не является химически активным и в дальнейшем его превращение связано с образованием молекулы аскорбата и дегидроаскорбата. Аскорбиновая кислота может использоваться в качестве косубстрата для восстановления пероксида водорода ферментом аскорбатпероксидазой. Однако, при низких концентрациях аскорбиновая кислота окисляясь может участвовать в реакциях восстановления металлов переменной валентности, в частности, железа, что способствует увеличению скорости образования гидроксильного радикала OH , т.е. оказывает прооксидантный эффект. Восстановление аскорбиновой кислоты осуществляется за счет восстановленного глутатиона в присутствии глутатиондегидрогеназы (КФ 1.8.5.1) или NADPH в присутствии дегидроаскорбатредуктазы (КФ 1.6.5.4). Таким образом аскорбиновая кислота является важным компонентом биологической неферментативной антиоксидантной системы, тесно взаимосвязанным с токоферолом и глутатионом, который помимо своей роли в глутатионзависимых ферментных антипероксидных системах, сам является достаточно эффективным эндогенным антиоксидантом.

Глутатион (гамма-L-глутамил-L-цистеинилглицин) – серусодержащий трипептид, образованный аминокислотами: цистеином, глутаминовой кислотой и глицином имеет почти универсальное распространение в тканях животных, растений и микроорганизмов. Глутатион присутствует в организме как в восстановленной (G-SH), так и в окисленной форме (G-SS-G) и представляет собою основной клеточный фонд мобильных сульфгидрильных групп, т.к. окисленная его форма (глутатиондисульфид) составляет всего 1-3% общего его количества. Глутатион участвует в транспорте аминокислот, обмене дисульфидов и поддер-

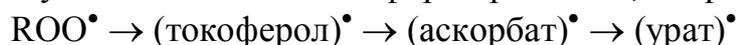
жании сульфгидрильных групп белков в восстановленном состоянии. Как тиоловое соединение глутатион может принимать участие в реакции с гидропероксидами без участия каких-либо ферментов или катализаторов. Он может ингибировать ПОЛ на уровне инициирования цепного процесса, способен реагировать со свободными радикалами так же активно, как α -токоферол.

Помимо глутатиона, антиоксидантными свойствами обладают и другие соединения содержащие сульфгидрильные группы. Это, в первую очередь, серусодержащие аминокислоты. Их SH-группировки, взаимодействуя с активными формами кислорода и пероксидными радикалами, восстанавливают последние до нетоксических продуктов. Акцептирование аминокислотами активных форм кислорода может быть связано не только с SH-, но и с аминогруппами. Антиоксидантная активность некоторых аминокислот может быть связана с их способностью образовывать комплексные соединения с медью, которые обладают способностью осуществлять неферментативную дисмутацию супероксиданионного радикала.

Восстановленные тиолы обладают высокой антиокислительной активностью, они имеют как антирадикальные, так и антиперекисные свойства, и способны защищать от повреждения белки (ферменты), нуклеиновые кислоты, липиды и другие биологически активные соединения.

Кроме указанных выше основных низкомолекулярных эндогенных антиоксидантов, подобные свойства обнаружены у витамина А и каротиноидов, витамина К, убихинона (коэнзим Q), билирубина, мочевой кислоты, эстрогенов, альбумина, ферритина, трансферрина, лактоферрина, гаптоглобина, гемопексина и других различных по химическому составу соединений.

Компоненты антиоксидантной системы (АОС) работают в комплексе: ферментативная АОС осуществляет обезвреживание O_2^{\bullet} и H_2O_2 ингибиторы органических радикалов также участвуют в цепочке взаимопревращений, в результате которых образуется менее активная форма радикала, например:



Целесообразность существования таких взаимопревращений заключается в более гибкой регуляции и надежности гомеостазирования свободнорадикальных процессов в клетке

Таким образом, в организме существует целый ряд взаимосвязанных антиоксидантных систем, основная цель которых заключается в поддержании ферментативных и неферментативных реакций на стационарном уровне. На каждом из этапов развития этих реакций существует своя специализированная система, осуществляющая эти функции. Часть этих систем строго специфична, например, супероксиддисмутаза, другие, такие как глутатионпероксидаза и токоферол обладают большей широтой действия и меньшей субстратной специфичностью.

Аддитивность взаимодействия ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем между собой обеспечивает устойчивое протекание свободнорадикальных цепных процессов, поддержание на стационарном уровне концентрации свободных радикалов и предупреждение избыточной активации процессов пероксидного окисления.

В связи с тем, что любая напряженная деятельность в ответ на действие различных экстремальных факторов физической, химической и биологической природы, требующая повышенного расхода энергетического и пластического потенциала, усиленного функционирования органов и систем, сопровождается соответствующим усилением процессов свободнорадикального окисления и риском развития дисбаланса про- и антиоксидантного равновесия интенсивности течения процессов пероксидного окисления, состояния системы антиоксидантной защиты организма является важным этапом раскрытия механизмов обеспечения резистентности организма, патогенеза различных заболеваний животных. Это также может оказаться весьма полезным при разработке средств и способов предупреждения и лечения многих заболеваний.

6. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

6.1. Метод определения субклеточной локализации генерации супероксиданиона в тканях

1. Принцип метода.

В основе определения продукции супероксиданиона лежит реакция восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) супероксиданионом в окрашенный диформаза, имеющий максимум поглощения в смеси хлороформ-диметилсульфоксид в пределах 515-565 нм. Данный метод позволяет оценить суммарный спонтанный уровень генерации $O_2^{\bullet-}$, а также потенциальную преимущественную генерацию супероксиданиона в митохондриальной или микросомальной электротранспортной цепи (ЭТЦ). В качестве индуктора генерации $O_2^{\bullet-}$ в митохондриальной ЭТЦ использовали НАДН, а в микросомальной ЭТЦ – НАДФН.

2. Реактивы.

- 2.1. 0,03 М фосфатный буфер (рН 7,4)
- 2.2. 3 % водный раствор НАДФН
- 2.3. 3 % водный раствор НАДН
- 2.4. 0,2 % раствор нитросинего тетразолия (НСТ) на 0,05М трис-НСl буфере (рН 7,4).
- 2.5. Смесь диметилсульфоксид-хлороформ (2:1)
- 2.6. 0,1Н водный раствор КОН
- 2.7. 10 мМ водный раствор аскорбиновой кислоты

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр

3.2. Водяная баня

3.3. Гомогенизатор Поттера

3.4. Центрифуга

3.5. Весы аналитические

4. Материал для исследования.

Образцы печени, почек, сердца и др. тканей.

5. Ход определения.

5.1. 0,3 г ткани гомогенизируют в 2,7 мл 0,03 М фосфатного буфера рН 7,4. По 0,05 мл гомогената помещают в 3 пробирки («а», «б» и «в»).

В пробу «А» добавляют 0,05 мл фосфатного буфера раствора (рН 7,4) для определения спонтанной генерации супероксиданиона.

В пробу «Б» приливают 0,05 мл 0,3% раствора НАДФН для определения преимущественной продукции супероксиданиона в микросомальной ЭТЦ.

В пробу «В» добавляют 0,05 мл раствора 0,3 % НАДН для определения преимущественной генерации супероксиданиона в митохондриальной ЭТЦ.

5.2. Содержимое всех проб перемешивают и преинкубируют при 37 °С в течение 30 мин для пробы «А», 10 мин для проб «Б» и «В». Затем добавляют по 0,05 мл 0,2 % раствора НСТ на трис-буфере (рН 7,4) в каждую пробирку, перемешивают и инкубируют при 37 °С пробу «А» в течение 30 мин, пробы «Б» и «В» 5 мин.

5.3. В каждую пробу приливают по 2,0 мл смеси диметилсульфоксид-хлороформ и взбалтывают в течение 1 мин. Затем пробы центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин. Отбирают окрашенный супернатант и определяют оптическую плотность каждой пробы при 540 нм.

5.4. В качестве контроля используют:

– при определении спонтанной генерации (проба «А») - 0,05 мл фосфатного буфера + 0,05 мл воды + 0,05 мл НСТ + 0,05 мл воды,

– при определении генерации супероксиданиона в микросомальной ЭТЦ (проба «Б») - 0,05 мл фосфатного буфера + 0,05 мл воды + 0,05 мл НСТ + 0,05 мл НАДФН,

– при определении генерации супероксиданиона в митохондриальной ЭТЦ (проба «В») - 0,05 мл фосфатного буфера + 0,05 мл воды + 0,05 мл НСТ + 0,05 мл НАДН.

Контрольные пробы инкубируют так же 10 и 30 мин, соответственно, при 37 °С и элюируют диформазаза смесь диметилсульфоксид-хлороформ.

6. Построение калибровочной кривой.

6.1. 0,2 г НСТ растворяют в 100 мл трис-буфера рН 7,4.

6.2. Для построения стандартного калибровочного графика в пробирки отмеряют по 0,01; 0,02; 0,05; 0,07; 0,1 и 0,2 мл 0,2 % раствора НСТ, добавляют по 0,1 мл

0,1N КОН и по 0,1 мл 10 мМ раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и инкубируют 10 мин при 37 °С. Затем в каждую пробу добавляют по 2,0 мл смеси диметилсульфоксид-хлороформ для элюирования диформаза, определяют оптическую плотность проб при 540 нм и строят калибровочный график.

7. Расчет результатов.

По графику находят количество супероксиданиона в нмоль $O_2^{\bullet-}$, содержащегося в пробе, а затем пересчитывают в нМоль на г ткани за секунду инкубации.

Расчет производят по формуле:

$$\text{ИПС (нМоль } O_2^{\bullet-} / \text{г} \times \text{сек)} = A \times K, \text{ где}$$

ИПС – интенсивность продукции супероксиданиона;

A – величина продукции $O_2^{\bullet-}$ в нМоль, найденная по калибровочному графику;

K – коэффициент пересчета на грамм в сек с учетом навески и времени инкубации. Для пробы «А» K=11,11, а для проб «Б» и «В» K=66,67.

6.2. Методы определения продуктов пероксидного окисления липидов

Метод определения диеновых конъюгатов и кетодиенов полиненасыщенных жирных кислот в крови

1. Принцип метода.

Процесс пероксидного окисления полиненасыщенных жирных кислот сопровождается перегруппировкой двойных связей и возникновением системы сопряженных диеновых структур, имеющих максимум поглощения при 232-234 нм с плечом в области 260-280 нм, соответствующим сопряженным кетодиенам.

2. Реактивы.

2.1. Экстрагирующая смесь гептан – изопропиловый спирт 1:1 (по объему).

2.2. Спирт этиловый, 96%.

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Баня водяная.

3.3. Центрифуга рефрижераторная.

3.4. Баллон с газообразным азотом.

3.5. Пипетки измерительные.

3.6. Пробирки химические и центрифужные.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1. В центрифужные пробирки вносят по 1 мл крови.

5.2. К пробам приливают по 7 мл экстрагирующей смеси, закрывают кор-

ковыми пробками (нельзя закрывать резиновыми пробками) и интенсивно встряхивают в течение 2 минут.

5.3. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин при 0-4°C.

5.4. 2 мл верхнего гептанового слоя переносят в чистые химические пробирки и выпаривают в токе азота на водяной бане при 40-50°C.

5.5. К сухому остатку на дне пробирки приливают 3 мл этилового спирта, пробирки интенсивно встряхивают, оставляют на 10-15 минут при комнатной температуре и перед измерением еще раз встряхивают.

5.5. Измеряют относительную плотность опытных проб при 232 и 273 нм против контрольной, содержащей этиловый спирт, в кюветах с ходом луча 10 мм.

5.6. В этих же пробах определяют содержание общих липидов сульфониловым методом.

6. Расчет результатов.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{ДК/КД}} = \frac{E_{232/273}}{A}, \text{ где}$$

С_{дк(кд)} – содержание диеновых конъюгатов (кетодиенов) в единицах оптической плотности на мг липидов;

E₂₃₂ – оптическая плотность пробы для диеновых конъюгатов;

E₂₇₃ – оптическая плотность пробы для кетодиенов;

A – содержание общих липидов в пробе.

7. Примечание.

Пробы гепаринизированной крови исследуют не позднее 2 часов после взятия при условии хранения не выше 10°C. При невозможности исследовать сразу после взятия можно хранить пробы в жидком азоте в течение неограниченного времени.

Метод определения малонового диальдегида в крови

1. Принцип метода.

При высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид (МДА) реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметипового комплекса (ТМК), имеющего максимум поглощения при 532 нм.

2. Реактивы.

2.1. 10% водный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

2.2. 0.8% водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (2-ТБК). Готовится при нагревании в кипящей водяной бане в день исследования.

2.3. Вода дистиллированная.

3. Оборудование и аппаратура.

- 3.1. Спектрофотометр.
- 3.2. Центрифуга лабораторная.
- 3.3. Водяная баня.
- 3.4. Весы аналитические.
- 3.5. Пробирки химические и центрифужные.
- 3.6. Колбы мерные.
- 3.7. Пипетки измерительные.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1. К 2,5 мл гепаринизированной крови, помещенной в центрифужную пробирку приливают 2,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты, хорошо перемешивают стеклянной палочкой.

5.2. Пробы центрифугируют: в течение 15 минут при 3000 об/мин.

5.3. 3,0 мл надосадочной жидкости переносят в чистые центрифужные пробирки и прибавляют 1,5 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и хорошо перемешивают.

5.4. Пробы помещают в кипящую водяную баню на 15 минут. В ходе реакции развивается розовое окрашивание.

5.5. Пробы вынимают из кипящей водяной бани и охлаждают под струей холодной водопроводной воды. После охлаждения их центрифугируют в течение 5 минут при 3000 об/мин.

5.6. Одновременно с опытными ставят контрольную пробу, содержащую 2,5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл 10% трихлоруксусной кислоты, 1,5 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и обрабатывают аналогично опытной пробе.

5.7. Полученный центрифугат осторожно, не встряхивая, переносят в химические пробирки и измеряют оптическую плотность опытных проб при 532 нм против контрольной пробы в 10 мм-вых кюветах

6. Расчет результатов.

Содержание малонового диальдегида рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{E \times 10^6 \times 3}{1,56 \times 10^5}, \text{ где}$$

C – концентрация малонового диальдегида, мкМ/л;

E – оптическая плотность пробы;

10^6 – коэффициент пересчета в мкМ;

$1,56 \times 10^5$ – коэффициент молярной экстинкции ТМК МДА с 2-ТБК;

3 – фактор разведения.

7. Примечания.

7.1. Время нагревания при 100°C по п. 5.4. не должно превышать

15 минут, т.к. при более длительном нагревании с 2-тиобарбитуровой кислотой реагируют другие химические соединения, содержащиеся в крови и дающие с 2-ТБК окрашенные компоненты, имеющие максимум поглощения в той области спектра, что и триметиновый комплекс малонового диальдегида с 2-ТБК.

Метод определения флуоресцирующих оснований Шиффа

1. Принцип метода.

Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции соединений типа Шиффовых оснований, извлекаемых липидными растворителями из биологического материала.

2. Реактивы.

2.1. Хлороформ.

2.2. Спирт метиловый.

2.3. Экстрагирующая смесь хлороформ-метанол 2:1 (по объему).

2.4. Серная кислота, 0,1 Н.

2.5. Стандартный раствор хинин-сульфата (10 мг хинин-сульфата растворяют в 10 мл 0,1 Н раствора серной кислоты). Раствор может храниться в холодильнике в посуде из темного стекла в течение месяца.

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофлуориметр любой модели.

3.2. Весы аналитические.

3.3. Холодильник бытовой.

3.4. Центрифуга лабораторная.

3.5. Баня водяная.

3.6. Пипетки измерительные.

3.7. Колбы мерные.

3.5. Пробирки химические и центрифужные.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

5. Ход определения.

5.1. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови и приливают по 4 мл смеси хлороформ-метанол. Пробу тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

5.2. Пробирки плотно закрывают корковыми пробками, помещают в водяную баню на 5 минут при температуре 30°C. Вынимают из бани и интенсивно встряхивают в течение 1 минуты.

5.3. Пробу центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин.

5.4. Верхний водно-спиртовой слой осторожно отсасывают. Осадок белка протыкают стеклянной палочкой. Нижний хлороформный экстракт фильтруют в чистые пробирки через смоченный хлороформом бумажный фильтр.

5.5. Измеряют флуоресценцию хлороформных экстрактов при λ возб.

360 нм и λ исп. 430 нм. Флуоресценцию стандартного раствора измеряют после его разведения в 1000 раз до концентрации 1 мкг/л. Также измеряют флуоресценцию чистого хлороформа.

6. Расчет результатов.

Содержание флуоресцирующих оснований Шиффа рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{E_o - E_{\text{хл}}}{E_{\text{ст}} - E_{\text{хл}}}, \text{ где}$$

A – содержание оснований Шиффа, отн. ед./мл сыворотки;

E_o – флуоресценция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ – флуоресценция стандартного раствора хинин-сульфата, принятая за 1 единицу;

$E_{\text{хл}}$ – флуоресценция чистого хлороформа.

7. Примечание.

7.1. Сыворотку можно хранить в холодильнике не более 1 суток.

7.2. Хлороформ перед использованием очищают перегонкой.

6.3. Методы определения пероксидного окисления белков

Метод определения карбонильных групп в белках

1. Принцип метода.

Метод оценки окислительной модификации белков основан на взаимодействии окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов.

2. Реактивы.

2.1. 10 мМ раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 2,5 М HCl (2,4-ДНФГ).

2.2. 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,4).

2.3. 10,0 мМ водный раствор перекиси водорода (H_2O_2).

2.4. 10 % водный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

2.5. Смесь этанол-этилацетат (1:1).

2.6. 8 М водный раствор мочевины.

2.7. Раствор, содержащий 1 мМ Fe^{2+} и 1 мМ ЭДТА- Na_2 (13,9 мг $FeSO_4 \times 7H_2O$ и 14,6 мг ЭДТА- Na_2 растворить в 50 мл дистиллированной воде).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Водяная баня.

3.3. Центрифуга.

3.4. Иономер (pH-метр)

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка, плазма крови, цереб-

роспинальная жидкость, а также белковые экстракты из тканей.

5. Ход определения.

5.1. Опытная проба 1. Для определения спонтанного образования карбонильных групп окисленных белков в центрифужные пробирки на 10 мл к 0,05-0,1 мл образца добавляют 100мМ фосфатный буфер рН 7,4 до конечного объема пробы 1 мл.

5.2. Опытная проба 2. Для определения металл-катализируемого образования карбонильных групп к 0,05-0,1 мл образца добавляют 0,1 мл раствора, содержащего 1мМ Fe^{2+} и 1мМ ЭДТА и 0,1 мл 10мМ H_2O_2 . Объем пробы доводят до 1 мл 100 мМ фосфатным буфером рН 7,4. и инкубируют при 37 °С в течение 15 минут.

5.3. Контрольная проба. В центрифужные пробирки на 10 мл к 0,05-0,1 мл образца (содержащего 0,5-2,5мг белка) добавлялся 100 мМ фосфатный буфер рН 7,4 до конечного объема пробы 1 мл.

В контрольную пробу добавляют 4 мл 2,5М HCl, в обе опытные пробы – 4 мл 10мМ 2,4-ДНФГ в 2,5М HCl.

5.4. Контрольную и опытные пробы выдерживают при комнатной температуре ($20 \pm 2^\circ C$) в течение 1 часа в темноте, с перемешиванием через каждые 15 минут. Затем в каждую пробу добавляют по 5 мл холодной 20% ТХУ для осаждения белка и помещают в холодильник на 15 минут. После этого пробы центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Супернатант удаляется. Осадки еще раз промывают 4 мл 10% ТХУ и центрифугируют.

5.5. Для экстракции липидов и удаления прореагировавшего с карбонильными группами окисленных белков 2,4-ДНФГ осадки механически разрушают, промывают 3 раза с 4 мл смеси этанол : этилацетат и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут.

5.6. Осадок белка растворяют в 2 мл 8М мочевины и оставляют при 37°С при периодическом перемешивании. Не растворившиеся частицы удаляют центрифугированием.

5.7. Содержание карбонильных групп регистрируют спектрофотометрически, измерением оптической плотности опытных проб при 370 нм относительно контрольной пробы (обработанной 2,5М HCl).

5.8. Содержание карбонильных групп (С) в опытной пробе 1 и опытной пробе 2 рассчитывают с использованием коэффициента молярной экстинкции ($\epsilon = 22\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$) и выражают в нмоль на мл.

5.9. Определяют содержание белка биуретовым методом. Количество белков рассчитывают по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов бычьего сывороточного альбумина в 8М мочевины в диапазоне концентраций 1-10 мг/мл.

6. Расчет результатов:

Концентрацию карбонильных групп в белке рассчитывают по формуле:

$$C_1 = E_{370} \times 45,45, \text{ где}$$

C_1 – концентрация карбонильных групп, нМ/мл

E_{370} – оптическая плотность образца при 370 нм

45,45 – коэффициент пересчета

Поскольку некоторое количество белка теряется на всех этапах промывания, для определения фактического уровня карбонильных групп проводится перерасчет в нМ/мг белка по формуле: $C = C_1/A$, где

C – концентрация карбонильных групп, нМ/мг белка

C_1 – концентрация карбонильных групп, нМ/мл

A – количество белка в пробе, мг

Метод определения битирозиновых сшивок в белках

1. Принцип метода.

Метод основан на измерении флуоресценции битирозина, образующегося в молекула белков под воздействием активных форм кислорода.

2. Реактивы:

2.1. 1/15 М фосфатный буфер, рН 7,4 (453,3 мг KH_2PO_4 растворяют в 100 мл воды, 760 мг K_2HPO_4 растворяют в 100 мл воды. Полученные растворы смешивают в пропорции 81 мл раствора KH_2PO_4 + 19 мл раствора K_2HPO_4 . Доводят рН до получения необходимого значения и доводят объём раствора до 200 мл дистиллированной водой).

2.2 1 мМ раствор ЭДТА-На (37,2 мг ЭДТА-На полностью растворяют в 50 мл воды и доводят объём раствора до 100 мл).

2.3 0,1 мМ раствор сульфата железа (II) (26,4 мг $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ растворяют в 10 мл воды, к 1 мл полученного раствора добавляют 99 мл воды).

2.4. 0,3 мМ раствор перекиси водорода (к 0,1 мл 35% раствора H_2O_2 добавляют 102,841 мл воды, к 3 мл полученного раствора добавляют 97 мл воды).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофлюориметр.

3.2. Баня водяная.

3.3. Весы аналитические.

3.4. рН-метр.

3.5. Пробирки центрифужные.

3.6 Холодильник бытовой.

3.7. Автоматические пипетки.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

5. Ход определения.

5.1. Опытная проба. В пробирку с опытной пробой прилить 0,85 мл буфера + 0,05 мл сыворотки + 0,05 мл смеси ($\text{ЭДТА-На} + \text{FeSO}_4$) + 0,05 мл H_2O_2 .

5.2. Контрольная проба. В пробирку с контрольной пробой прилить 0,95

мл буфера + 0,05 мл сыворотки.

5.3. Содержимое пробирок инкубировать 2 часа при 37°C. После этого в обе пробирки добавить по 4 мл бидистиллированной воды.

5.4. Измерить флюоресценцию контрольной (Fк.) и опытной (Fоп.) проб при длине волны возбуждения 325 нм, волны испускания – 415 нм.

6. Расчет результатов.

Содержание битирозиновых сшивок в белке выражается в единицах флюоресценции (ед. фл.)/мл сыворотки.

$$C = \frac{F_o - F_k}{V_o}, \text{ где}$$

C – содержание битирозиновых сшивок в белке, ед./мл;

Fo – флюоресценция опытной пробы, ед.;

Fк – флюоресценция контрольной пробы, ед.;

Vo – объем взятой на определение пробы сыворотки, мл.

6.4. Методы изучения состояния системы антиоксидантной защиты

Метод определения восстановленного глутатиона в крови

1. Принцип метода.

Сульфгидрильная группа восстановленного глутатиона вступает в реакцию с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана), в результате чего в эквимольных количествах образуется окрашенный в желтый цвет тио-нитрофенильный анион (ТНФА), имеющий максимум поглощения при 412 нм.

2. Реактивы.

2.1. 20% трихлоруксусная кислота (ТХУ).

2.2. 0,3 М фосфатный буфер, рН 8,0 (10,2 г KH_2PO_4 растворяют в 250 мл воды, 34,2 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ растворить в 500 мл воды. В раствор двузамещенного фосфорнокислого калия под контролем рН-метра приливают раствор однозамещенного фосфорнокислого калия до установления рН 8,0).

2.3. 0,01 М раствор реактива Элмана (39,6 мг 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10,0 мл абсолютного метанола).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Центрифуга рефрижераторная.

3.3. Весы аналитические.

3.4. Холодильник бытовой.

3.5. Пипетки измерительные.

3.6. Пробирки химические и центрифужные.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови, 3,5 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают для лучшего гемолиза.

5.2. 2,0 мл разведенной в 8 раз крови переносят в центрифужную пробирку 1 и приливают к ней 1,0 мл 20% ТХУ. Пробу тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 15-20 минут.

5.3. Пробы вынимают из холодильника и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин и 0-4°C.

5.4. В две химические пробирки наливают по 0,5 мл фосфатного буфера и в каждую добавляют по 1,0 мл надосадочной жидкости.

5.5. В опытную пробирку № 1 приливают 0,05 мл раствора реактива Эллмана, а в контрольную пробирку № 2 – 0,05 мл метанола. Содержимое пробирок хорошо перемешивают.

5.6. Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб против фосфатного буфера при 412 нм в кювете 10 мм.

6. Расчет результатов.

Концентрацию восстановленного глутатиона рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{E_{оп} - E_{к}}{13,1 \times 10^3} \times 72,6 \times 10^3, \text{ где}$$

C – содержание восстановленного глутатиона, мМ/л;

E_{оп} – оптическая плотность опытной пробы;

E_к – оптическая плотность контрольной пробы;

13,1×10³ – коэффициент молярной экстинкции ТНФА при 412 нм;

72,6 – фактор разведения.

7. Примечания.

7.1. Исследование необходимо проводить как можно быстрее после взятия крови. При необходимости транспортировки пробы обрабатываются по п. 5.1-5.2 и замораживаются.

7.2 Реактив Эллмана необходимо приливать к буферу как можно быстрее после внесения в него супернатанта (п. 5.4 и п. 5.5).

Метод определения α-токоферола (витамина Е) в сыворотке(плазме) крови

1. Принцип метода.

Метод основан на определении ионов двухвалентного железа, образующихся при взаимодействии α-токоферола с хлорным железом (Fe³⁺), в виде окрашенного комплекса Fe²⁺ с ортофенантролином (ОФ) или батофенантролином (БФ).

2. Реактивы.

2.1. Спирт этиловый, 96%.

2.2. Гексан, хч.

2.3. Бензол, перегнанный.

2.4. 0,025% раствор хлорного железа в эталоне (25 мг FeCl_3 растворяют в 10 мл этанола и этот раствор разводят этанолом еще в 10 раз). Раствор готовится в день проведения анализов. Годен в течение рабочего дня.

2.5. 0,05% раствор орто- или батофенантролина в этаноле (25 мг ОФ или БФ растворяют в 10 мл этанола и этот раствор разводят еще в 5 раз). Раствор готовится в день проведения анализов. Годен в течение рабочего дня.

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Весы аналитические.

3.3. Баня водяная.

3.4. Центрифуга.

3.5. Секундомер.

3.6. Баллон с газообразным азотом.

3.7. Пипетки измерительные.

3.8. Пробирки центрифужные и химические.

3.9. Пробирки с притертыми пробками.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

5. Ход определения.

5.1. В пробирки с притертыми пробками вносят по 1 мл сыворотки крови и приливают по 1 мл этилового спирта. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

5.2. К пробам добавляют 3 мл гексана и энергично встряхивают в течение 2-х минут.

5.3. Пробы после встряхивания переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 10 минут при 2500-3000 об/мин.

5.4. Из верхнего гексанового слоя отбирают по 2 мл, переносят в чистые химические пробирки и в них выпаривают гексан в токе азота на водяной бане при температуре не выше 50°C .

5.5. Сухой остаток растворяют в 1 мл бензола, прибавляют по 1 мл 0,025% раствора хлорного железа и выдерживают при комнатной температуре в течение 5 минут.

5.6. К пробам (по одной) приливают по 1 мл 0,05% раствора ортофенантролина (или батофенантролина) и ровно через 2 минуты (по секундомеру) измеряют оптическую плотность (E_{op}) при длине волны 510 нм (при использовании ортофенантролина) или при 535 нм (при использовании батофенантролина) против пробы, содержащей 1 мл бензола и 2 мл этилового спирта.

5.7. Одновременно с опытными ставят контрольную пробу, содержащую 1 мл бензола, 1 мл раствора хлорного железа, 1 мл раствора орто- или батофенантролина. Оптическую плотность контрольной пробы (E_k) измеряют также

через 2 минуты (по секундомеру) после добавления ОФ или БФ.

5.8. При определении витамина Е в сыворотке крови крупного рогатого скота, содержащей много каротина, после центрифугирования верхний гексановый слой по возможности максимально переносят в чистые химические пробирки и измеряют оптическую плотность проб при 462 нм против чистого гексана (E_{462}). Далее отбирают по 2 мл гексанового экстракта, переносят его в новые химические пробирки и далее продолжают согласно п. 5.4.

6. Построение калибровочного графика.

4,31 мг α -токоферола (фирмы Serva, Германия) растворяют в 100 мл бензола (концентрация полученного раствора – 100 мкМ/л). Из этого раствора готовят основной раствор с концентрацией α -токоферола – 40 мкМ/л. Из основного раствора путем разбавления бензолом готовят рабочие стандартные растворы в интервале концентраций от 1 до 30 мкМ/л.

Для построения калибровочной кривой берут по 1 мл каждого из стандартных рабочих растворов (в двух-трех повторностях) прибавляют по 1 мл 0,025% раствора хлорного железа и далее обрабатывают также как и опытные пробы согласно п. 5.6.

На миллиметровой бумаге по оси абсцисс откладывают значения концентраций стандартных растворов, а по оси ординат – соответствующие им значения оптических плотностей (E) равных разнице между оптической плотностью каждого стандартного раствора и оптической плотностью контрольной пробы.

7. Расчет результатов.

Количество α -токоферола (витамина Е), участвующего в реакции, определяют по калибровочной кривой, учитывая, что:

– для свиней, овец, птиц $E = E_{оп} - E_{к}$

– для крупного рогатого скота $E = (E_{оп} - E_{к}) - (E_{462} \times 0,217)$.

Концентрацию витамина Е в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{A \times 3}{2}, \text{ где}$$

C – содержание витамина Е в сыворотке, мкМ/л;

A – количество витамина Е, найденное по калибровочной кривой;

3 – общее количество гексанового экстракта;

2 – объем выпаренного гексанового экстракта

8. Примечание.

8.1. Сыворотка может храниться в холодильнике при 0-4°C не более двух недель.

8.2. Пробы при исследовании необходимо беречь от прямого попадания света.

Метод определения ферроксидазной активности церулоплазмينا в сыворотке крови

1. Принцип метода.

Метод основан на регистрации оптической плотности окрашенных продуктов, образующихся при ферментативном окисления церулоплазмином солянокислого пара-фенилендиамина при 530 нм.

2. Реактивы.

2.1. 0,4 М ацетатный буфер, рН 5,5 (54,4 г $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 900 мл дистиллированной воды, доводят рН до 5,5 под контролем рН метра концентрированной уксусной кислотой и объем доводят водой до 1 л. Хранится в холодильнике в течение нескольких месяцев.

2.2. Раствор роданистого калия, 1,5%.

2.3. Буферно-субстратная смесь (10 мг пара-фенилендиамин гидрохлорида растворяют в 20 мл ацетатного буфера рН 5,5). Готовят в день проведения анализов.

2.4. 10 мМ раствор бензохинона (10,8 мг бензохинона, высушенного до постоянной массы в эксикаторе, растворяют в 10 мл дистиллированной воды).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.

3.2. Баня водяная.

3.3. Секундомер.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Пипетки измерительные.

3.6. Пробирки химические.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

5. Ход определения.

5.1. В две химические пробирки вносят по 0,1 мл сыворотки крови, приливают по 1 мл буферно-субстратной смеси и инкубируют в водяной бане при 37°C в течение 5 минут.

5.2. Не вынимая пробирок из водяной бани, в одну из них (контрольную) приливают 2 мл охлажденного до $0-4^\circ\text{C}$ раствора роданида калия. Через 10 минут (по секундомеру) приливают 2 мл охлажденного раствора роданида калия во вторую (опытную) пробирку и обе пробирки вынимают из водяной бани.

5.3. Измеряют оптическую плотность опытной пробы (E) против контрольной в кюветах с ходом луча 10 мм на спектрофотометре при 530 нм или на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром.

6. Построение калибровочного графика.

Из свежеприготовленного раствора бензохинона с концентрацией 10 мМ/л

готовят разведения стандартных растворов в интервале концентраций от 0,5 до 5,0 мМ/л. Затем к 0,1 мл каждого стандартного раствора добавляют по 1 мл буферно-субстратной смеси оставляют при комнатной температуре на 10 минут. После этого в пробы добавляют по 2 мл раствора роданистого калия и измеряют оптическую плотность при 530 нм на спектрофотометре или зеленом светофильтре на фотоэлектроколориметре в кюветах с ходом луча 10 мм. В качестве раствора для сравнения используют смесь 0,1 мл воды, 1 мл ацетатного буфера и 2 мл раствора роданистого калия. На миллиметровой бумаге строят калибровочную кривую, откладывая по оси абсцисс значения концентраций стандартных растворов, а по оси ординат соответствующие им значения оптической плотности.

7. Расчет результатов.

Ферроксидазную активность церулоплазмينا рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{X}{t}, \text{ где}$$

A – активность церулоплазмينا, мкМ бензохинона/л× мин;

X – количество бензохинона, найденное по калибровочной кривой, мМ /л;

t – разница времени инкубации контрольной и опытной проб, мин. (для описанных выше условий t=10 мин).

8. Примечания.

8.1. Сыворотка должна быть без следов гемолиза.

8.2. Сыворотка может храниться при 0-4°C в течение недели.

Методы определения активности супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1.)

Метод 1.

1. Принцип метода.

Метод определения активности фермента основан на определении степени торможения супероксиддисмутазой восстановления бесцветных тетразолиевых солей супероксидными анионрадикалами при котором происходит их превращение в окрашенные соединения (формазаны).

2. Реактивы.

2.1. 0,2 мМ раствор ЭДТА-Na (37 мг ЭДТА-Na (трилона Б) растворяют в 500 мл дистиллированной воды).

2.2. 0,05 М раствор тетраметиленамина (ТЭМЭД (0,28 мл ТЭМЭД растворяют в 40 мл 0,2 мМ раствора ЭДТА-Na). Реактив годен для использования через 2 часа после приготовления в течение суток.

2.3. 0,034 мМ раствор рибофлавина (1,3 мг рибофлавина растворяют при перемешивании на магнитной мешалке в течение 20-30 минут в 100 мл дистиллированной воды). Раствор хранится в склянке из темного стекла и годен в течение рабочего дня.

2.4. 0,85 мМ раствор пара-нитротетразолия хлористого (п-НТХ) (32 мг п-НТХ растворяют в 100 мл дистиллированной воды). Реактив растворяется мед-

ленно, поэтому можно использовать магнитную мешалку и подогрев до 50°C. Хранится в склянке из темного стекла в течение 1 месяца.

2.5. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,8 (1,3616 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$, растворяют в 100 мл воды, 16,036 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или 32,313 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 900 мл воды. К одной части раствора фосфата калия добавляют 9 частей раствора фосфата натрия и проверяют рН на рН-метре.

2.6. 0,1 М фосфатный буфер, рН 9,85 (Половину приготовленного буфера рН 7,8 по п. 2.5 оставляют, а другую половину доводят под контролем рН-метра до 9,85 концентрированным раствором КОН).

2.7. 1% раствор йодистого калия.

2.8. 0,9% раствор хлористого натрия.

2.9. Смесь хлороформ-этанол в соотношении 5:3 (по объему).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.

3.2. Лампа дневного света мощностью 40 ватт, длина трубки 1 м и более.

3.3. Штатив для пробирок на 20-30 гнезд в один ряд, закрытый спереди и сзади черной бумагой.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Магнитная мешалка.

3.6. Секундомер.

3.7. Центрифуга рефрижераторная.

3.8. Холодильник бытовой.

3.9. Водяная баня.

3.10. Колбы мерные.

3.11. Пипетки измерительные.

3.12. Пробирки химические и центрифужные.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служат эритроциты, отмытые трижды от плазмы холодным 0,9% раствором хлористого натрия.

5. Ход исследования.

5.1. К эритроцитарной массе, полученной после отмытки от плазмы 0,5 мл гепаринизированной крови приливают 5 мл охлажденной до 1 - 4°C дистиллированной воды и оставляют в ледяной бане на 15 минут для более полного гемолиза.

5.2. 1,5 мл гемолизата переносят в центрифужные пробирки, прибавляют 0,5 мл смеси хлороформ-этанол, перемешивают и оставляют на 10-15 минут ледяной водяной бане.

5.3. Пробы центрифугируют при 0 - 4°C в течение 15 минут при 3000 об/мин.

5.4. Надосадочную жидкость (бесцветную или слегка желтоватую) разбавляют дистиллированной водой в 20 раз. Половину полученного биологического

материала оставляют в химических пробирках в ледяной водяной бане.

5.5. Другую половину биологического материала помещают в кипящую водяную баню на 10 минут (вода должна постоянно кипеть) для инактивации фермента.

5.6. Для каждой пробы берут три химические пробирки, ставят их в закрытый штатив и добавляют в них растворы реактивов и биологический материал в порядке и количествах, указанных в таблице 2.

5.7. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и штатив с ними устанавливают на расстоянии 20 см от лампы дневного света.

Таблица 2

Реактивы	Опыт	Контроль	Контроль на реактивы
0,1 М фосфатный буфер, рН 7,8	1,0 мл	1,0мл	-
0,1 М фосфатный буфер, рН 9,85	-	-	2,0мл
0,05 М раствор ТЭМЭДа	1,0 мл	1,0 мл	-
0,85 М раствор п-нитротетразолия	1,0мл	1,0 мл	1,0 мл
Вода дистиллированная	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл
Биологический материал по п. 5.4	0,2 мл	-	-
Биологический материал по п. 5.5	-	0,2 мл	0,2мл
0,034 мМ раствор рибофлавина	2,0 мл	2,0 мл	2,0мл

5.8. Включают лампу, прогревают ее в течение 10 минут. Открывают переднюю стенку штатива и облучают пробы в течение 5 минут (по секундомеру) и закрывают переднюю стенку штатива.

5.9. Во все пробирки добавляют (как можно быстрее) по 1 мл 1% раствора йодистого калия (для остановки реакции) и сразу интенсивно перемешивают.

5.10. Измеряют оптическую плотность каждой пробы на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре № 5 в кюветах с ходом луча 20 мм против дистиллированной воды.

5.11. Количество гемоглобина в гемолизатах по п. 5.1 определяют с помощью наборов для определения гемоглобина в крови любой фирмы.

6. Расчет результатов.

6.1. Находят процент торможения супероксиддисмутазой образования формазана п-НТХ по формуле:

$$T = \frac{E_k - E_{оп}}{E_k - E_{кр}} \times 100, \text{ где}$$

T – процент торможения реакции;

E_к – оптическая плотность контрольной пробы;

Е_{оп} – оптическая плотность опытной пробы;

Е_{кр} – оптическая плотность пробы контроля на реактивы.

Принято считать, что 50% ингибирования реакции соответствует одной относительной единице активности фермента.

6.2. Количество относительных единиц активности фермента, внесенного в пробу, рассчитывают по формуле:

$$M = 10^{(0,026 \times T \times 1,3)}, \text{ где}$$

M – количество относительных единиц активности в пробе;

T – процент торможения реакции.

6.3. Активность супероксиддисмутазы в пересчете на содержание гемоглобина рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{M \times E_{ст}}{0,1236 \times E_{гем}}, \text{ где}$$

A – активность супероксиддисмутазы, ед. акт./мг гемоглобина;

M – количество единиц фермента в пробе;

E_{ст} – оптическая плотность стандартного раствора, содержащего 59,75 мг гемоглобинцианида в 100 мл по п. 5.11;

E_{гем} – оптическая плотность опытной пробы гемолизата при определении гемоглобина по п. 5.11.

0,1236 – коэффициент пересчета.

7. Примечания.

7.1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при +4°C не более 1 суток или при –20°C в течение недели.

7.2. Химические пробирки, в которых ведется определение активности фермента должны иметь одинаковый диаметр, толщину стенок и цвет стекла.

7.3. В добавке биологического материала должна содержаться примерно 1 единица активности фермента (процент торможения должен составлять 35-55%).

7.4. При определении активности фермента в эритроцитах птиц отмытую эритроцитарную массу из 0,5 мл крови лизируют 2,5 мл холодной дистиллированной водой. Центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин для осаждения ядер эритроцитов. Берут 1,5 мл надосадочной жидкости и далее продолжают согласно п. 5.2.

Метод 2.

1. Принцип метода.

Метод определения активности фермента основан на способности супероксиддисмутазы ингибировать аутоокисление адреналина, которое инициируется супероксидными радикалами, возникающими при взаимодействии адреналина со следами металлов в щелочной среде.

2. Реактивы.

2.1. 0,1% (5,46 мМ) аптечный раствор адреналина гидрохлорида,

2.2. 0,2 М карбонатный буфер рН 10,65. рН устанавливали добавлением к 0,2 М раствору Na_2CO_3 сухого NaHCO_3 до необходимой величины рН. Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектроколориметр или спектрофотометр с термостатированной кюветой.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Магнитная мешалка.

3.6. Секундомер.

3.7. Центрифуга рефрижераторная.

3.8. Холодильник бытовой.

3.9. Водяная баня.

3.10. Колбы мерные.

3.11. Пипетки измерительные.

3.12. Пробирки химические и центрифужные.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служат эритроциты, которые отделяли от плазмы центрифугированием, осадок дважды промывали 1 мл 0,9% раствора NaCl , избегая грубых механических воздействий.

5. Ход исследования.

Исследования проводят в термостатированной кювете при $t = 30^\circ\text{C}$.

5.1. К 0,1 мл эритроцитарной массы приливают 1 мл бидистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 5-10 минут при комнатной температуре.

5.2. Определение D_k . К 2 мл карбонатного буфера рН 10,65 добавляют 100 мкл 0,1% раствора адреналина гидрохлорида, тщательно и быстро перемешивали, помещают в кювету спектрофотометра. Измерение величины оптической плотности проводят при длине волны 347 нм через каждые 60 секунд в течение 3 мин., считая от момента прибавления адреналина.

5.3. Определение D_0 . К 2 мл буфера добавляют 100 мкл исследуемого гемолизата и затем 100 мкл 0,1% раствора адреналина, перемешивают и измеряют оптическую плотность как описано в п.5.2.

6. Расчет результатов.

О величине активности СОД судят по степени ингибирования скорости аутоокисления адреналина.

Процент ингибирования вычисляют по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = [1 - (D_0 / D_k)] \times 100 \%, \text{ где}$$

D_0 – оптическая плотность в присутствии гемолизата,

D_k – оптическая плотность в отсутствии гемолизата.

Активность СОД рассчитывают в условных единицах активности. За 1 усл. ед. акт. принимали 50 % ингибирование реакции.

Метод определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6.) в крови

1. Принцип метода.

Метод основан на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм.

2. Реактивы.

2.1. 0,04412 Н раствор пероксида водорода (готовят примерно 0,08% раствор пероксида водорода и устанавливают точную концентрацию титрованием 0,01 Н раствором KMnO_4 . На титрование 5 мл 0,04412 Н раствора пероксида водорода должно идти 22,06 мл 0,01 Н раствора перманганата калия. По результатам титрования раствор пероксида водорода доводят до нужной концентрации дистиллированной водой).

2.2. 4,5% раствор аммония молибденовокислого (4,5 г молибдата аммония растворяют в 95,5 мл дистиллированной воды).

2.3. 0,1 М трис-НСI буфер, рН 7,4.

2.4. Буферно-субстратная смесь (10 мл трис-НСI буфера рН 7,4 смешивают с 30 мл 0,04412 Н раствора пероксида водорода).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Секундомер.

3.3. Баня водяная.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Бюретка.

3.6. Пипетки измерительные.

3.7. Пробирки химические.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1. К 0,5 мл гепаринизированной крови приливают 3,5 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 5-10 минут при комнатной температуре (основной гемолизат). К 0,2 мл основного гемолизата прибавляют 3,8 мл воды и тщательно перемешивают (рабочий гемолизат).

5.2. В две химические пробирки наливают по 2,0 мл буферно-субстратной смеси и преинкубируют в водяной бане при 37 °С в течение 10 минут.

5.3. В одну из пробирок (опытную) добавляют 0,1 мл рабочего гемолизата, тщательно перемешивают и инкубируют в водяной бане при 37°С в течение 3 минут (по секундомеру).

5.4. Реакцию останавливают добавлением в опытную пробу 2,0 мл молибдата аммония. Одновременно приливают в контрольную пробирку сначала 2,0 мл молибдата аммония, а затем 0,1 рабочего гемолизата.

5.5. Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб при 410 нм в кювете с ходом луча 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь, состоящую из 1 мл буфера, 3 мл дистиллированной воды и 0,1 мл рабочего гемолизата.

6. Расчет результатов.

Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_o) \times 4,1 \times 16 \times 10^5 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3}, \text{ где}$$

A	– активность фермента, М. Е. (мкМ Н ₂ О ₂ /л×мин)
E _k	– оптическая плотность контрольной пробы
E _o	– оптическая плотность опытной пробы
4,1	– конечный объем пробы
16×10 ⁵	– фактор разведения
10 ⁶	– коэффициент пересчета мМоль в мкМоль
22,2×10 ⁶	– коэффициент молярной экстинкции Н ₂ О ₂
3	– время инкубации, мин

7. Примечания.

7.1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при +4°С в течение суток.

Метод определения активности глутатионпероксидазы в крови

1. Принцип метода.

Метод определения активности фермента основан на определении величины убыли восстановленного глутатиона в среде инкубации при восстановлении гидроперекисей глутатионпероксидазой.

2. Реактивы.

2.1. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4 (6,8 г КН₂РО₄ растворяют в 500 мл воды, 11,4 г К₂НРО₄ × 3Н₂О растворяют в 500 мл воды. Полученные растворы смешивают под контролем рН-метра до получения необходимого значения рН).

2.2. 31,88 мМ раствор восстановленного глутатиона (24,3 мг восстановленного глутатиона, 14,5 мг азида натрия и 27,7 мг ЭДТА-На растворяют в 35 мл фосфатного буфера рН 7,4). Раствор готовится непосредственно перед проведением исследования).

2.3. 13,8 мМ раствор пероксида водорода (На титрацию 10 мл 13,8 мМ раствора пероксида водорода должно идти 6,96 мл 0,01 Н раствора КМпО₄. По результатам титрования раствор пероксида водорода доводится водой до необходимой концентрации).

2.4. 10% раствор трихлоруксусной кислоты (10 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды).

2.5. 0,3 М фосфатный буфер, рН 8,0 (10,2 г КН₂РО₄ растворяют в 250 мл

воды, 34,2 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ растворяют в 500 мл воды. Под контролем рН-метра растворы смешивают до получения необходимого значения рН).

2.6. 10,0 мМ раствор реактива Элмана (39,6 мг 5,5 дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Центрифуга рефрижераторная.

3.3. Баня водяная.

3.4. Секундомер.

3.5. Холодильник бытовой

3.6. Весы аналитические.

3.7. рН-метр

3.8. Пипетки измерительные.

3.9. Пробирки химические и центрифужные.

3.10. Колбы мерные

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови и добавляют 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 10-15 минут для более полного гемолиза.

5.2. В химическую пробирку приливают 1 мл раствора глутатиона и прибавляют 1 мл гемолизата.

5.3. Переносят по 0,5 мл смеси в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при $37^{\circ}C$ и инкубируют в течение 5 минут.

5.4. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора пероксида водорода, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане.

5.5. Ровно через 1 минуту с момента добавления раствора пероксида водорода (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 2 мл холодной 10% ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,1 мл раствора пероксида водорода.

5.6. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 минут в холодильник.

5.7. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин и $0-4^{\circ}C$.

5.8. По 0,5 мл надосадочной жидкости из контрольной и опытной пробирок переносят в химические пробирки и приливают по 10 мл фосфатного буфера, рН 8,0.

5.9. В обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Элмана и содержимое тщательно перемешивают.

5.10. Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

5.11. Для определения скорости неферментативного окисления восстановленного глутатиона проводят исследование проб по п. п. 5.2.-5.10. в которые вместо гемолизата прибавляют 1 мл воды.

6. Расчет результатов.

Активность глутатионпероксидазы крови рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E_0 - E_k) \times 10,55 \times 10^6 \times 166,4}{13100}, \text{ где}$$

A - активность фермента в мкМ восстановленного глутатиона / (л×мин);

E₀ - оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при ферментативном окислении глутатиона;

E_k - оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при неферментативном окислении глутатиона по п. 5.11;

10,55 - конечный объем пробы, мл;

166,4 - фактор разведения;

10⁶ - пересчет мМоль в мкМоль

13100 - коэффициент молярной экстинкции ТНФА

Метод определения активности глутатион-S-трансферазы

1. Принцип метода.

Метод определения активности фермента основан на определении скорости образования глутатион-S-конъюгатов с 1-хлор-2,4-динитробензолом. Водный раствор образующегося продукта имеет максимум поглощения при 340 нм.

2. Реактивы.

2.1. 0,1 М калий-фосфатный буфер, рН 6,5.

2.2. 15 мМ 1-хлор-2,4-нитробензол.

2.3. 300 мМ глутатион восстановленный (184,4 мг восстановленного глутатиона растворяют в 2,0 мл дистиллированной воды).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Холодильник бытовой.

3.3. Баня водяная.

3.4. Весы аналитические.

3.5. ИонOMET (рН-метр).

3.6. Пробирки центрифужные.

3.4. Пипетки измерительные.

3.5. Микропипетки на 10-100, 200, 1000 мкл

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит плазма и эритроциты.

5. Ход определения.

5.1. Гепаринизированную кровь центрифугируют 20 минут при 3000 об/мин. После центрифугирования убирают слой плазмы и тонкую белую лейкоцитарную пленку. Плазму отбирают отдельно и сохраняют. Оставшуюся после отбора плазмы эритроцитарную массу трижды отмывают физиологическим раствором (0,9%-ным NaCl) и центрифугируют по 15 минут при 3000 об/мин. (1700g). Супернатант отбрасывают. Последнее центрифугирование проводят в течение 20 минут для более плотной упаковки клеток.

Для получения осмотического гемолизата к одному объему эритроцитарной массы добавляют двадцать объемов дистиллированной воды, охлажденной до 0°C.

5.2. В 10 мм кювету с опытной пробой, содержащую 2,5 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 6,5) вносят 0,03 мл 300 мМ раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл плазмы или гемолизата.

5.3. В кювету с контрольной пробой содержащую 2,5 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 6,5) вносят 0,03 мл 300 мМ раствора восстановленного глутатиона и вместо плазмы или гемолизата вносят 0,1 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 6,5).

5.4. Реакцию инициируют внесением в обе кюветы по 0,2 мл 0,015М 1-хлор-2,4-нитробензола и через 3 минуты измеряют оптическую плотность при длине волны 340 нм опытной пробы против контроля.

6. Расчет результатов.

6.1. Активность фермента в плазме рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta E/t \times V_1 \times 10^3}{\varepsilon \times V_2}, \text{ где}$$

- A – активность фермента, мМоль/(мин×мл);
- ΔE – изменение оптической плотности;
- t – время измерения, мин;
- 9600 – коэффициент молярной экстинкции глутатион-S-конъюгатов;
- 10³ – коэффициент для пересчета активности фермента из Моль в мМоль;
- V₁ – общий объем реакционной смеси, мл
- V₂ – объем вносимой пробы плазмы, мл

6.2. Активность фермента в эритроцитах рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta E/t \times V_1 \times 21 \times 10^3}{9600 \times V_2 \times \text{Hb}}, \text{ где}$$

- A – активность фермента, мМоль/(мин×г Hb);
- ΔE – изменение оптической плотности;
- t – время измерения, мин;
- 21 – коэффициент разведения эритроцитов в пробе;

- 9600 – коэффициент молярной экстинкции глутатион-S-конъюгатов
 10^3 – коэффициент для пересчета активности фермента Моль в мМоль;
Hb – гемоглобин г/л;
 V_1 – общий объем реакционной смеси, мл
 V_2 – объем вносимой пробы плазмы, мл

7. Примечания.

7.1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение суток.

Метод определения активности глутатионредуктазы в крови

1. Принцип метода.

Метод определения активности фермента основан на том, что глутатионредуктаза, с участием восстановленных форм пиридиннуклеотидов, переводит окисленную форму глутатиона в восстановленную. По степени увеличения количества восстановленного глутатиона в среде инкубации рассчитывается активность фермента.

2. Реактивы.

2.1. 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4 (6,8 г KH_2PO_4 растворяют в 500 мл воды, 11,4 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 мл воды. Полученные растворы смешивают под контролем pH-метра до получения необходимого значения pH).

2.2. 4,0 мМ раствор окисленного глутатиона (134,8 мг окисленного глутатиона и 0,5 мг ЭДТА-Na растворяют в 55 мл фосфатного буфера pH 7,4). Раствор готовят в день проведения исследования.

2.3. 5,35 мМ раствор НАДФ-Н (11,2 мг НАДФН растворяют в 2,5 мл воды. Раствор готовят перед использованием).

2.4. 10% раствор трихлоруксусной кислоты (10,0 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды).

2.5. 0,3 М фосфатный буфер, pH 8,0 (10,2 г KH_2PO_4 растворяют в 250 мл воды, 34,2 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 мл воды. Под контролем pH-метра растворы смешивают до получения необходимого значения pH).

2.6. 10,0 мМ раствор реактива Элмана (39,6 мг 5,5-дитио бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта).

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Центрифуга рефрижераторная.

3.3. Баня водяная.

3.4. Секундомер.

3.5. Холодильник бытовой

3.6. Весы аналитические.

3.7. pH-метр

3.8. Пипетки измерительные.

3.9. Пробирки химические и центрифужные 3.10. Колбы мерные

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови и добавляют 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 10-15 минут для полного гемолиза.

5.2. В химическую пробирку приливают 2,0 мл раствора окисленного глутатиона, прибавляют 1 мл гемолизата и хорошо перемешивают.

5.3. Переносят по 1,0 мл смеси в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при 37°C и инкубируют в течение 5 минут.

5.4. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора НАДФН, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане.

5.5. Ровно через 10 минут (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 1 мл холодной 10% ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,1 мл раствора НАДФ-НГ

5.6. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 минут в холодильник.

5.7. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин и 0-4°C.

5.8. По 1 мл надосадочной жидкости из контрольной и опытной пробирок переносят в соответствующие химические пробирки и приливают по 5 мл фосфатного буфера, рН 8,0.

5.9. В обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Элмана и содержимое тщательно перемешивают.

5.10. Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

6. Расчет результатов.

Активность глутатионредуктазы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{E \times 6,05 \times 10^6 \times 84}{13100 \times 10 \times 2}, \text{ где}$$

A – активность фермента, М. Е. (мкМ окисленного глутатиона /л×мин);

E – экстинкция опытной пробы;

6,05 – конечный объем пробы;

10^6 – коэффициент пересчета в мкМ;

84 – фактор разведения крови;

10 – время инкубации, мин;

2 – коэффициент пересчета на окисленный глутатион;

13100 – коэффициент молярной экстинкции ТНФА

7. Примечания.

7.1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при +4°C в течение суток.

Метод определения антиокислительной активности плазмы (сыворотки) крови

Метод 1.

1. Принцип метода.

Метод основан на регистрации скорости окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола (2,6-ДХФИФ) кислородом, растворенным в реакционной среде. При этом бесцветная лейкоформа 2,6-ДХФИФ переходит в окрашенную форму, имеющую максимум поглощения при 600 нм.

2. Реактивы.

2.1. 0,25 М фосфатный буфер, pH 7,4 (7,8 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды – раствор №1; 11,4 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды – раствор №2. К 81 мл раствора №2 приливают 19 мл раствора № 1 и измеряют pH на pH-метре. Доводят объем до 200 мл дистиллированной водой).

2.2. 0,8 мМ водный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола в окисленной форме (11,6 мг 2,6-ДХФИФ растворяют в 50 мл дистиллированной воды). Раствор готовится за сутки до проведения анализов.

2.3. 3,2 мМ раствор закисного сернокислого железа (44,5 мг $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 50 мл дистиллированной воды). Раствор готовится непосредственно перед проведением анализов.

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр с термостатируемой кюветой или спектроколориметр "Спекол 20, 21, 220 или 221" с термостатируемой кюветой.

3.2. Ультратермостат.

3.3. Водяная баня.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Колбы мерные.

3.6. Пипетки измерительные.

3.7. Микропипетки или микрошприц на 10 и 20 мкл

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит плазма крови.

5. Ход определения.

5.1. В термостатируемую 10 мм микрокювету (37°C) последовательно добавляют 0,5 мл фосфатного буфера pH7,4; 0,15 мл раствора 2,6-ДХФИФ; 0,15 мл раствора закисного сернокислого железа и быстро перемешивают. Все растворы должны иметь температуру 37°C.

5.2. Сразу после перемешивания быстро добавляют 10 или 20 мкл плазмы крови, перемешивают и через каждые 30 сек (по секундомеру) после добавления плазмы на протяжении 5 мин измеряют оптическую плотность при 600 нм против воды ($D_{50п}$).

5.3. Определяют скорость окисления 2,6-ДХФИФ в реакционной среде по п. 5.1 и 5.2, но вместо плазмы крови добавляют такой же объем дистиллированной воды ($D_{5к}$).

5.4. Определяют оптическую плотность при 600 нм инкубационной среды, в которой 2,6-ДХФИФ окислен полностью. Для этого в кювету добавляют те же компоненты, но вместо раствора $FeSO_4$ и пробы, добавляют равные им объемы дистиллированной воды (D_{max}).

6. Расчет результатов.

Определяют значение констант скоростей окисления 2,6-ДХФИФ в контроле и опыте по формулам:

$$K_{\text{контр}} = \frac{\ln D_{\text{max}} - \ln(D_{\text{max}} - D_{\text{кк}})}{5};$$

$$K_{\text{оп}} = \frac{\ln D_{\text{max}} - \ln(D_{\text{max}} - D_{\text{о}})}{5}$$

Рассчитывают константу ингибирования ($K_{\text{и}}$) плазмой крови окисления 2,6-ДХФИФ, являющуюся показателем ее антиокислительной активности по формуле:

$$K_{\text{и}} = \frac{K_{\text{к}} - K_{\text{оп}}}{C}, \text{ где}$$

$K_{\text{и}}$ – антиокислительная активность плазмы крови, $л \times мл^{-1} \times мин^{-1}$;

$K_{\text{к}}$ – константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в контроле;

$K_{\text{оп}}$ – константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в опыте;

C – концентрация плазмы в инкубационной смеси, $мл/л$

7. Примечания.

7.1. Плазма крови должна быть без следов гемолиза.

7.2. Исследование должно проводиться не позднее 4 часов после взятия крови.

Метод 2.

1. Принцип метода.

Метод основан на регистрации торможения окисления О-дианизидина дихлоргидрата радикалом гидроксила (OH^*), образующегося в системе Фентона ($H_2O_2 + Fe^{2+}$) сывороткой крови.

2. Реактивы.

2.1. Раствор Кларка и Любса (75 мМ, рН 1,8) готовят следующим образом: 5,591 г KCl растворить в 1000 мл деминерализованной воды (заключительная концентрация 75 мМ). Растворить в 1000 мл 6,41 мл соляной кислоты (36, 5 %) (конечная концентрация, 75 мМ). 800 мл готового р-ра KCl раствор смешать с 200 мл раствора HCl под контролем рН-метра (до рН 1,8).

2.2. Реактив №1. О-дианизидин дихлоргидрат (3,17 г) растворить в 1000 мл раствора Кларка и Любса (конечная концентрация О-дианизидина дихлор-

гидрата 10,0 мМ). Затем растворить в нем 0,01764 г соли Мора - $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (конечная концентрация 45 мкМ). Этот реактив стабилен в течение 6 месяцев в 4 °С. При проведении исследования раствор все время должен стоять в ультратермостате при 25°С.

2.3. Реактив №2. Раствор перекиси водорода (7,5 мМ) готовят следующим образом: 0,641 мл 35 %-ой H_2O_2 растворить в 1000 мл раствора Кларк и Любса. Концентрация перекиси водорода определяется спектрофотометрически поглощением при 240 нм. Этот раствор стабилен в течение по 1 месяца в 4 °С. При проведении исследования раствор все время должен стоять в ультратермостате при 25°С.

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Ультратермостат.

3.3. Водяная баня.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Колбы мерные.

3.6. Пипетки измерительные.

3.7. Микропипетки на 5, 10 и 200 мкл

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

5. Ход определения.

5.1. К 3,0 мл № 1, находящегося в кювете 10 мм спектроколориметра прибавляют 200 мкл сыворотки и через 15 сек. определяют оптическую плотность при 444 нм (D_k).

3. Добавляют в эту же кювету 100 мкл реактива №2, тщательно перемешать и регистрируют оптическую плотность через 3 минуты при 444 нм (D_o).

6. Расчет результатов.

$$\text{АОА} = (1 - D_o / D_k) \times 100, \text{ где}$$

АОА, % - антиокислительная активность сыворотки

D_k – оптическая плотность без добавления реактива №2

D_o – оптическая плотность пробы через 3 мин после добавления реактива №2

6.5. Методы изучения системы оксида азота

Метод определения стабильных метаболитов оксида азота в плазме (сыворотке) крови

1. Принцип метода.

Метод определения суммы ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- = \text{NO}_x$) стабильных метаболитов оксида азота в биологическом материале основан на восстановлении NO_3^- до NO_2^- хлоридом ванадия (III) с последующим определением нитрата с помощью реактива Грисса.

2. Реактивы.

2.1. Насыщенный раствор ванадия хлорида (VCl_3) в 1,0 М HCl. Твердый избыток удаляют фильтрацией через мелкопористый стеклянный фильтр. Раствор хранят не более недели в темноте при 4 °С. Появление синего окрашивания указывает на окисление VCl_3 . Окрашенный раствор для анализа не пригоден.

2.2. 0,1 % раствор N-(1-нафтил)этилендиамина в H_2O (вес/объем). Раствор устойчив в течение нескольких месяцев при хранении в темноте при 4°С.

2.3. 2,0 % раствор сульфаниламида в 10 % HCl (объем/объем). Раствор устойчив в течение нескольких месяцев при хранении в темноте при 4°С. При появлении слабой розовой окраски растворы становятся непригодны для использования. Более предпочтительна подготовка составных компонентов реактива Грисса по отдельности.

2.4. Смесь для осаждения белка: метанол-диэтиловый эфир (3:1)

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр

3.2. Центрифуга

3.3. Водяная баня

3.4. Весы аналитические

3.5. Пипетки измерительные.

3.6. Микропипетки на 100, 200, 1000 мкл

4. Материал для исследования.

Сыворотка или плазма крови, стабилизированная ЭДТА- Na_2 (важно). При необходимости до проведения анализа образцы сыворотки или плазмы замораживают и хранят при – 20 °С в течение нескольких месяцев.

5. Ход определения.

5.1. Образцы депротеинизируют путем добавления к 0,2 мл плазмы (сыворотки) 0,4 мл смеси метанол-диэтиловый эфир (3:1) с последующим центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 минут.

5.2. К 200 мкл супернатанта добавляют 200 мкл насыщенного раствора VCl_3 , а затем последовательно компоненты реактива Грисса: 100 мкл 2,0 % раствора сульфаниламида и 100 мкл 0,1 % раствора N-(1-нафтил)-этилен-диамина.

5.3. Пробы помещают на водяную баню на 30 минут при температуре 37 °С. После инкубации измеряют оптическую плотность при 540 нм после их охлаждения до комнатной температуры.

Для каждого образца обязательно проведение определение фоновых значений оптической плотности проб без биологического материала, которые затем вычитали при расчете концентрации NOx.

6. Построение калибровочной кривой.

6.1 Для построения калибровочного графика используют соответствующие растворы $NaNO_3$ (осч) в бидистиллированной воде, которые готовят путем

последовательного разбавления основного раствора, содержащего 200 мкМ $\text{NO}_3^-/\text{л}$: (200, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5 мкМ $\text{NO}_3^-/\text{л}$).

6.2. К 200 мкл соответствующего стандартного раствора добавляют 200 мкл насыщенного раствора VCl_3 , а затем последовательно компоненты реактива Грисса: 100 мкл раствора сульфаниламида и 100 мкл раствора N-(1-нафтил) этилендиамина. Далее пробы помещают на водяную баню при температуре 37°C на 30 минут. Оптическую плотность образцов при 540 нм измеряют после их охлаждения до комнатной температуры.

Так как реакция восстановления нитрата до нитрита проводится в кислой среде и существует вероятность потерь из-за диффузии окислов азота из раствора, реактив Грисса должен добавляться в инкубационную среду сразу.

7. Расчет результатов.

Расчет производят по формуле:

$$C = A \times 3, \text{ где}$$

C – концентрация NO_x в плазме (сыворотке), мкМ/л

A – количество NO_x , найденное по калибровочному графику

Метод определения S-нитрозотиолов в плазме (сыворотке) крови

1. Принцип метода.

Метод основан на спектрофотометрическом измерении нитрита, присутствующего в образце до и после добавления Hg^{2+} , которая, действуя как специфический разрушитель S-N связи, катализирует высвобождение из S-нитрозированных тиолов оксида азота, который окисляясь до NO_2^- определяется с помощью реактива Грисса при 540 нм.

2. Реактивы.

2.1. 0,5 М раствор HCl

2.2. 1% раствор сульфаниламида в 0,5 М HCl , (вес/объем)

2.3. 0,2% раствор HgCl_2 в 1% растворе сульфаниламида, (вес/объем)

2.4. 0,2% раствор (вес/объем) N-(1-нафтил)этилендиамина в 0,5М HCl .

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр

3.2. Водяная баня

3.3. Центрифуга

3.4. Пипетки измерительные.

3.5. Микропипетки на 500, 1000 мкл

4. Материал для исследования.

Свежеполученная сыворотка и плазма крови, лимфа. При необходимости до проведения анализа образцы сыворотки или плазмы замораживают и хранят при -20°C в течение недели.

5. Ход определения.

5.1. К 0,5 мл исследуемого образца добавляют 0,5 мл 0,2% HgCl_2 в 1% растворе сульфаниламида (опыт).

5.2. К 0,5 мл исследуемого образца (сыворотка, плазма, лимфа) добавляют 0,5 мл 1% раствора сульфаниламида в 0,5 М HCl (контроль).

5.3. Обе пробы инкубируются в темноте при 37°C 10 мин. Затем в обе пробы добавляют по 0,5 мл 0,2% раствора N-(1-нафтил)-этилендиамин. После этого пробы инкубируют в течение 10 минут при 37°C в темноте.

5.4. Образцы центрифугируют при 10.000 g 10 минут для удаления осадка (при необходимости). Далее определяют оптическую плотность обоих образцов при 540 нм.

6. Расчет результатов

Расчет проводят по формуле:

$$C = (E_o - E_k) / 50000, \text{ где}$$

C – концентрация S-нитрозотиолов, мМ/л

E_o – экстинкция опытной пробы

E_k – экстинкция контрольной пробы

50000 – коэффициент пересчета.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Показатели пероксидного окисления липидов в крови у клинически здоровых животных

Показатели	Возраст животных				
	1 сут.	3 сут.	10-15 сут.	1 мес.	5-6 мес. и более
Крупный рогатый скот					
ДК, D ₂₃₂ /мг липидов	0,200-0,250	0,180-0,250	0,150-0,250	0,150-0,250	0,150-0,250
КД, D ₂₇₈ /мг липидов	0,050- 0,070	0,060-0,100	0,035-0,050	0,030-0,050	0,030-0,050
МДА, мкМ/л	1,9-2,5	1,6-2,5	0,8-1,3	0,8-1,2	0,8-1,2
ОШ, отн. ед./мл сыв.	0,12-0,18	0,18-0,24	0,10-0,20	0,10-0,20	0,10-0,20
Свиньи					
ДК, D ₂₃₂ /мг липидов	0,150-0,220	0,200-0,250	0,120-0,200	0,100-0,200	0,100-0,200
КД, D ₂₇₈ /мг липидов	0,040-0,060	0,050-0,080	0,030-0,050	0,030-0,050	0,030-0,050
МДА, мкМ/л	0,3 - 0,7	1,0 - 1,8	0,8 - 1,6	0,8 - 1,6	0,7 - 1,4
ОШ, отн. ед./мл сыв.	0,10-0,20	0,15-0,30	0,15-0,30	0,10-0,30	0,10-0,30
Овцы					
ДК, D ₂₃₂ /мг липидов	0,200-0,250	0,180-0,250	-	-	0,150-0,250

КД, D ₂₇₈ /мг липидов	0,050- 0,070	0,060-0,100	-	-	0,030-0,050
МДА, мкМ/л	1,9-2,5	1,6-2,5	-	-	0,8-1,2
ОШ, отн. ед./мл сыв.	0,12-0,18	0,18-0,24	-	-	0,10-0,20

Приложение 2

Показатели пероксидного окисления белков сыворотки крови у клинически здоровых животных

Показатели	Возраст животных				
	1 сут.	3 сут.	10-15 сут.	1 мес.	5-6 мес. и более
Крупный рогатый скот					
нМ карбонильных групп/мг белка	2,0-2,3	1,6-1,8	1,4-1,6	1,2-1,4	1,2-1,4
Битиразиновые сшивки, ед/мл	0,45-0,55	0,40-0,50	-	0,20-0,30	0,20-0,30
Свиньи					
нМ карбонильных групп /мг белка	2,1-2,4	2,0-2,2	1,5-1,7	1,2-1,4	1,2-1,4
Битиразиновые сшивки, ед/мл	0,50-0,60	-	-	0,20-0,30	0,20-0,30

Приложение 3

Показатели неферментативного звена системы антиоксидантной защиты у клинически здоровых животных

Показатели	Возраст животных			
	1 сут.	10-15 сут.	1 мес.	5-6 мес. и более
Крупный рогатый скот				
Восстановленный глутатион, мМ/л	0,75-1,30	0,75-0,95	0,50-0,70	0,50-0,70

Витамин Е, мкМ/л	2,0-6,0	10,0-20,0	15,0-25,0	15,0-30,0
Церулоплазмин, мкМ БХ/(л×мин)	70,0-130,0	180-230,0	240,0-320,0	240,0-320,0
Свиньи				
Восстановленный глутатион, мМ/л	0,7-1,0	-	0,50-0,70	0,50-0,70
Витамин Е, мкМ/л	2,0-5,0	-	10,0-15,0	10,0-15,0
Церулоплазмин, мкМ БХ/(л×мин)	300,0-400,0	-	600,0-900,0	800,0-1100,0

Приложение 4

Показатели ферментативного звена системы антиоксидантной защиты у клинически здоровых животных

Показатели	Возраст животных			
	1 сут.	10-15 сут.	1 мес.	5-6 мес. и более
Крупный рогатый скот				
Супероксиддисмутаза, ед. акт./мг гемоглобина*	5,0-7,0	3,0-5,0	1,5-3,0	1,5 - 3,0
Каталаза, мкМ Н ₂ О ₂ /л×мин×10 ³	45,0-55,0	35,0-45,0	30,0-40,0	30,0 - 40,0
Пероксидаза, ед. опт. пл./л×сек	-	-	-	40,0 - 60,0
Глутатионпероксидаза, мкМ G-SH/л× мин×10 ³ **	10,0-15,0	15,0-20,0	20,0-30,0	20,0 - 35,0
Глутатионредуктаза, мкМ G-SS-G/л×мин	350,0-450,0	400,0-500,0	200,0-350,0	200,0 - 350,0
Свиньи				
Супероксиддисмутаза, ед. акт./мг гемоглобина*	3,0-4,0	-	-	1,0 - 3,0
Каталаза, мкМ Н ₂ О ₂ /л×мин×10 ³	55,0-65,0			45,0 - 60,0
Пероксидаза, ед. опт. пл./л×сек	-	-	-	45,0 - 65,0
Глутатионпероксидаза, мкМ G-SH/л× мин×10 ³ **	5,0-7,0	10,0-20,0	25,0-30,0	15,0 - 25,0
Глутатионредуктаза, мкМ G-SS-G/л×мин	250,0-350,0	300,0-450,0	150,0-350,0	150,0 - 350,0

Примечание: *- определение СОД по методу 1; ** - селензависимая ГПО

Приложение 5

Антиокислительная активность плазмы крови клинически здоровых животных

Показатель	Возраст животных			
	1 сут.	10-15 сут.	1 мес.	5-6 мес. и более
Крупный рогатый скот				
АОА, л×мл ⁻¹ ×мин ⁻¹ (метод 1)	0,5-0,7	0,8-1,0	0,8-2,0	0,8-2,0
АОА, ед. (метод 2)	10,0-15,0	15,0-20,0	25,0-40,0	30,0-50,0
Свины				
АОА, л×мл ⁻¹ ×мин ⁻¹ (метод 1)	0,3-0,5	0,5-0,8	0,5-1,5	0,5-1,5
АОА, ед. (метод 2)	-	-	-	15,0-25,0

Приложение 6

Содержание стабильных метаболитов оксида азота в плазме (сыворотке) крови клинически здоровых животных (мкМ/л)

Показатели	Возраст животных				
	1 сут.	3 сут.	10-15 сут.	1 мес.	5-6 мес. и более
Крупный рогатый скот					
NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻	700-1100	400-600	200-300	40-120	40-120
Свины					
NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻	480-600	80-120	40-50	20-30	20-30
Овцы					
NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻	150-300	40-60	20-30	15-25	15-25

Приложение 7

Содержание S-нитрозотиолов в плазме (сыворотке) крови клинически здоровых животных

Возраст животных				
1 сут.	3 сут.	10-15 сут.	1 мес.	5-6 мес. и более
Крупный рогатый скот				
1500-2500	2500-3500	2500-3500	3000-4000	3500-4500
Свины				
500-1000	-	-	-	1500-2500

