

*І.Ф.Мещишен, В.П.Пішак, В.П.Польовий*

## МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ПЛАЗМИ (СИРОВАТКИ) КРОВІ

Кафедра медичної хімії (зав. – проф. І.Ф.Мещишен)  
Буковинського державного медичного університету, м.Чернівці

**Резюме.** Розроблено метод визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові. Він заснований на гальмуванні плазмою (сироваткою) крові пероксидного окиснення ліпідів головного мозку

щурів і характеризується простотою виконання, доступністю реактивів і доброю відтворюваністю.

**Ключові слова:** загальна антиоксидантна активність, плазма, сироватка крові, метод визначення.

**Вступ.** На сьогодні не викликає сумніву той факт, що виникнення і розвиток широкого кола захворювань людини і тварин супроводжується активацією вільнорадикальних реакцій пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків [1,2,3]. Основними механізмами активації таких реакцій є значне збільшення генерації радикалів кисню, так званих активних форм кисню

(АФК) – супероксидного аніонрадикалу ( $O_2^{\cdot-}$ ), гідроксильного радикалу ( $HO^{\cdot}$ ), синглетного кисню ( $^1O_2$ ), пероксиду водню ( $H_2O_2$ ), гіпохлоританіону ( $ClO^{\cdot}$ ) тощо, а також вивільнення іонів заліза ( $Fe^{2+}$ ) із його клітинних депо.

Процесові запуску і розвитку вільнорадикальних реакцій протидіють антиоксиданти. Основні антиоксиданти плазми крові та механізм їх дії

Таблиця 1

## Основні антиоксиданти плазми (сироватки) крові та механізм їх дії

Антиоксиданти	Механізм дії
Жиророзчинні:	
Вітамін E	$O_2^{\cdot -}$ , HO $\cdot$ , $O_2$ , ROO $\cdot$ , R $\cdot$
Вітамін A і каротиноїди	$O_2$ , ROO $\cdot$ , R $\cdot$
Стероїдні гормони	ROO $\cdot$ , R $\cdot$
Білірубін	ROO $\cdot$ , R $\cdot$ , $O_2$
Водорозчинні:	
Церулоплазмін	$O_2^{\cdot -}$ , OCl, Fe $^{2+}$ у Fe $^{3+}$
Трансферин	зв'язує Fe $^{3+}$
Альбумін	$O_2^{\cdot -}$ , OCl
Вітамін C	ROO $\cdot$ , R $\cdot$ , $O_2^{\cdot -}$ , відновлює вітамін E – радикал до вітаміну E
Мелатонін	$O_2^{\cdot -}$ , HO $\cdot$ , ROO $\cdot$ , R $\cdot$
HS-групи білків і глутатіону	ROO $\cdot$ , R $\cdot$
Сечова кислота	HO $\cdot$ , $O_2$ , ROO $\cdot$ , зв'язує Fe $^{2+}$ і Fe $^{3+}$
Супероксиддисмутаза	$O_2^{\cdot -}$

Примітка. R $\cdot$  і ROO $\cdot$  – ліпідний і ліпопероксидний радикали відповідно

Таблиця 2

Вплив часу інкубації (хвилини) на величину антиоксидантної дії (% гальмування) плазми крові щурів (M $\pm$ m; n=5)

Умови досліджу	Час інкубації, хв							
	30		60		90		120	
	E	% гальмування	E	% гальмування	E	% гальмування	E	% гальмування
Дослід	0,139 $\pm$ 0,004	36,2 $\pm$ 1,22	0,121 $\pm$ 0,006	47,4 $\pm$ 1,45	0,138 $\pm$ 0,004	43,2 $\pm$ 1,48	0,142 $\pm$ 0,005	42,5 $\pm$ 1,52
Контроль	0,218 $\pm$ 0,006		0,230 $\pm$ 0,008		0,240 $\pm$ 0,006		0,250 $\pm$ 0,008	

Примітка. E – оптична густина продуктів ПОЛ, що взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою – ТБК-активні продукти

подано в табл. 1 [2,4] з подальшим нашим доповненням.

Антиоксидантні компоненти плазми (сироватки) крові теоретично можуть бути визначені шляхом вимірювання їх кількості чи активності (для ферментів). Однак на практиці це виявилось неможливим із-за трудомістких аналізів і синергізму дії різних антиоксидантів. У зв'язку з цим впродовж останніх 35-40 років розробляються методики для визначення сумарної антиоксидантної активності інгібіторів вільнорадикальних реакцій, які присутні в біологічних рідинах (сироватка крові, слина, сльози, ліквор тощо), гомогенатах органів і тканин, суспензіях мембран і ліпопротеїнів.

Будь-яка методика визначення антиоксидантної активності (АОА) в біологічних рідинах заснована на використанні модельної системи, яка містить щонайменше два компоненти: механізм утворення (генерації) певного виду вільних ради-

калів і систему їх виявлення (детекції) безпосередньо чи продуктів їх дії на ліпіди, білки і нуклеїнові кислоти.

Безпосереднє визначення АФК вимагає складної і досить вартісної апаратури (хемілюмінесценція, електрохемілюмінесценція, флуоресценція, полярографія, циклічна вольтметрія, манометрія, спектрофотометрія). Нами розроблений метод визначення сумарної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові, який характеризується простотою виконання, доступністю реактивів і доброю відтворюваністю.

**Принцип методу.** Гомогенати головного мозку щурів, які характеризуються найбільшим вмістом ліпідів, піддаються спонтанному пероксидному окисненню з утворенням одного із кінцевих продуктів – малонового альдегіду (МА). За кількістю утвореного МА судили про загальну (сумарну) антиоксидантну активність плазми (сироватки) крові.



**Хід виконання.** На льоду готується 5% гомогенат головного мозку щура (у дослідях використовували тварин масою  $180 \pm 15$  г) на трис-НСІ-буфері, рН 7,4 (500 мг мозку гомогенізували у 9,5 мл буфера), центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Одержаний центрифугат (2 мл) вносили в центрифужні пробірки об'ємом 10 мл. У дослідні проби добавляли 0,1 мл сироватки (плазми) крові, а в контрольні – 0,1 мл буфера. Проби інкубували 60 хв у водяному термостаті при  $37^\circ\text{C}$ , після чого реакцію зупиняли, вносячи в проби по 2 мл охолодженої 10% трихлороцтової кислоти. Проби центрифугували (10 хв при 3000 об/хв) і в одержаному центрифугаті визначали вміст МА. Для цього в хімічні пробірки вносили 3 мл центрифугату, 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти і ставили в кип'ячу водяну баню на 15 хв. Після охолодження вимірювали оптичну густину контрольних і дослідних проб на спектрофотометрі СФ-46 при 532 нм в 10 мм кварцових кюветах.

Загальну антиоксидантну активність (ЗАОА) виражали у відсотках і розраховували за формулою:

$$\text{ЗАОА} (\%) = \frac{D_k - D_d}{D_k} \cdot 100,$$

де  $D_k$  – оптична густина контрольної проби;  
 $D_d$  – оптична густина дослідної проби.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Проведні дослідження показали, що максимальна антиоксидантна дія має місце при використанні 0,1 мл сироватки (плазми) крові. Нами вивчено вплив часу (тривалості) інкубації на величину антиоксидантної дії (табл. 2).

Як видно з даних табл. 2 максимальна антиоксидантна активність плазми крові щурів, вираженої у відсотках гальмування спонтанного пероксидного окиснення ендogenous ліпідів головного мозку, спостерігається на 60 хв інкубації.

#### Висновок

Розроблено метод визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові. Він заснований на гальмуванні плазмою (сироваткою) крові пероксидного окиснення ліпідів головного мозку щурів і характеризується простотою виконання, доступністю реактивів і доброю відтворюваністю.

**Перспективи подальших досліджень.** Вивчення стану загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові при різноманітних захворюваннях, а також проведення скринінгових досліджень оригінальних речовин з метою виявлення серед них антиоксидантів.

#### Література

1. Каримов І.З. Окисна модифікація білків і перекисне окиснення ліпідів у розвитку метаболічної інтоксикації при патології // Лаб. діагност.-2005. – № 1(31).- С. 7-13.
2. Мешишен І.Ф., Пішак В.П., Григор'єва Н.П. Основи обміну речовин та енергії. Навчальний посібник. - Чернівці: Медуніверситет, 2005.- 192с.
3. Мешишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окиснювальної модифікації білків // Бук. мед. вісник.- 1999.- Т.3, № 1.-С. 196-205.
4. Colleen S., Marks A.D., Lieberman M. Basic Medical Biochemistry. A clinical approach.- Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2005.- 977 p.

### МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ (СЫВОРОТКИ) КРОВИ

*И.Ф.Мешишен, В.П.Пшак, В.П.Полюви*

**Резюме.** Разработан метод определения общей антиоксидантной активности плазмы (сыворотки) крови. Он основан на торможении плазмой (сывороткой) крови пероксидного окисления липидов головного мозга крыс и характеризуется простотой исполнения, доступностью реактивов, хорошей воспроизводимостью.

**Ключевые слова:** общая антиоксидантная активность, плазма, сыворотка крови, метод определения.

### A METHOD OF DETERMINING THE TOTAL BLOOD PLASMA (SERUM) ANTIOXIDANT ACTIVITY

*I.F.Meshchyshen, V.P.Pishak, V.P.Poliiovyi*

**Abstract.** A method of determining the total blood plasma (serum) antioxidant activity has been developed. It is based on the inhibition of the rat brain lipids peroxidation by the blood plasma (serum) and is characterized by performance simplicity, reagents availability and good reproducibility.

**Key words:** total antioxidant activity, blood plasma, blood serum, method of determination.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Buk. Med. Herald. – 2007. – Vol.11, №3.- P.165-167

Надійшла до редакції 21.08.2007 року

Рецензент – проф. В.Ф.Мислицький