**Методические рекомендации к занятию № 11**

**по дисциплине «Клиническая (био)химия»**

**Тема: Клинико-биохимические критерии** систем ПОЛ и АОС

**Система свободнорадикального окисления**

Окислительно-восстановительные процессы в организме составляют важную часть любого звена метаболизма и необходимы как для обеспечения энергетических потребностей, так и для доставки и утилизации кислорода в тканях. Эти процессы в организме контролируются различными регуляторными системами с целью поддержания сбалансированного взаимодействия реакций образования продуктов оксидации, а также механизмов контроля, ведущих к их торможению при избыточной активности реакций антиоксидации. Помимо четырехэлектронного восстановления кислорода в ОВР происходит одно- и двухэлектронное его восстановление, в результате чего образуются активные формы кислорода (АФК) : супероксидный радикал, перекись водорода , гидроксильный радикал, синглетный кислород  .

АФК являются неотъемлимыми и жизненно необходимыми звеньями свободно-радикального окисления в организме человека и животных, и рассматривать промежуточные интермедиаты кислорода в отрыве от ПОЛ было бы неправильным. Процессы свободно-радикального окисления проис­ходят во всех мембранных структурах клетки, что приводит к образованию перекисных соединений липидов. Благоприятное влияние процессов ПОЛ на организм человека проявляется в обновлении состава и поддержании свойств биомембран, участии в энергетических процессах, клеточном делении, синтезе биологически активных веществ.

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 мембранносвязанных 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).

В нормально функционирующих клетках содержание продуктов свободнорадикального окисления находится на крайне низком уровне, несмотря на обилие субстратов ПОЛ. Это свидетельствует о достаточно мощной антиоксидантной защитной системе.

Однако кислородные радикалы при нарушении стационарного равновесия оказывают негативное действие. Эти частицы, имеющие свободные валентности, легко вступают во взаимодействие с биомолекулами, нарушая их структуру и, следовательно, функцию. Наиболее агрессивны гидроксильные радикалы и синглетный кислород. АФК воздействуют на некоторые аминокислоты, нарушая функции тех биологических образований в структуру которых они входят.

В связи с такими изменениями страдают все 4 структуры белка, а также гликопротеиды, ферменты, металлопротеины . Кроме того, повреждаются молекулы ДНК, РНК, что ведет к хромосомным аберрациям, повреждениям ядерного матрикса с появлением и накоплением мутаций, нарушению синтеза белка. АФК приводят к нарушениям окислительно-восстановительных процессов энергетического обмена посредством разобщения окислительного фосфорилирования. АФК отрицательно воздействуют на биологические структуры и посредством инициации и поддержания реакции неконтролируемого перекисного окисления липидов, что приводит к изменению структурной и функциональной организации клеточных мембран, их проницаемости и ионному  дисбалансу.

**СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И АНТИОКСИДАНТЫ. СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ**

Первичные радикалы образуются из молекул за счет реакций одноэлектронного окисления с участием металлов переменной валентности. Это компоненты дыхательной цепи, такие, как радикалы убихинона (коэнзима Q), супероксид и окись азота (NO). Вторичными радикалами мы назовем те, ко­торые образуются из перекиси водорода, липоперекисей и гипохлорита в присутствии ионов двухвалентного железа, потому что сами эти радикал-продуцирующие молекулы образуются, как правило, из первичных радикалов. К вторичным радикалам относятся прежде всего гидроксильный радикал и (с некоторыми оговорками) липидные радикалы, участвующие в реакциях цепного окисления ненасыщенных жирно-кислотных цепей липидов биологических мембран и липопротеинов плазмы крови. Наконец, в качестве третичных можно рассматривать радикалы, которые образуются при действии вторичных радикалов на молекулы антиоксидантов и других легко окисляющихся соединений.

Следует подчеркнуть принципиальную разницу в биологическом действии первичных и вторичных радикалов. Первичные радикалы специально вырабатываются нашим организмом и выполняют жизненно важные функции переноса электрона в дыхательной цепи (убихинон), защиты от микроорганизмов (супероксид) и регуляции кровяного давления (окись азота), тогда как вторичные радикалы оказывают цитотоксическое действие и, как правило, наносят организму большой вред. Многие болезни, как сейчас показано, развиваются именно вследствие поражающего действия вторичных радикалов. Роль третичных радикалов может быть разной.

**ЦЕПНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ**

В липидсодержаших системах, таких, как биологические мембраны и липопротеины крови, ионы двухвалентного железа образуют радикалы при взаимодействии с гидроперекисями ненасыщенных жирных кислот. Эти радикалы дают начало новым цепям окисления, и, таким образом, в присутствии ионов железа реакция цепного окисления становится разветвленной, а ее скорость многократно возрастает.

Реакции, в которых принимают участие вторичные радикалы гидроксила и липидов, оказывают разрушительное действие и приводят к развитию большого числа так называемых дегенеративных болезней, или болезней пожилого возраста, включая атеросклероз, диабет, гипертонию, рак, иммунные нарушения, катаракту, артриты и др. Естественно, что организм стремится предотвратить образование вторичных радикалов как в водной, так и в липидной фазе, используя систему защиты, включающую ферменты, соединения, связывающие железо, восстановители гидроперекисей и ловушки радикалов. Все эти соединения, тем или иным способом тормозящие накопление продуктов пероксидации, носят общее название «антиоксиданты».

**АНТИОКСИДАНТЫ**

Антиоксиданты - это соединения, которые препятствуют образованию свободных радикалов и, таким образом, предотвращают развитие болезней, вызываемых повреждением свободными радикалами структур клеток организма.

Антиоксидантами называют многие водорастворимые и гидрофобные соединения, действие которых в конце концов приводит к снижению скорости образования свободных радикалов и уменьшению концентрации продуктов реакций, протекающих с участием радикалов.

Первично образуемый супероксид способен восстанавливать ионы трехва­лентного железа из депо и различных комплексов (исключая гемовое железо) с образованием ионов Fe2+ . Последние могут реагировать с перекисью водорода или гипохлоритом с образованием гидроксильного радикала. Радикал гидроксила оказывает повреждающее действие на многие компоненты клетки и, в частности, способен инициировать цепное окисление (пероксидацию) липидов в биологических мембранах и липопротеинах.

СОД тормозит развитие этих событий, поскольку удаляет супероксидный радикал из системы с образованием перекиси водорода, которая в свою очередь удаляется благодаря активности каталазы и пероксидаз и в первую очередь глутатионпероксидазы. Экспериментально показано, что в очень многих системах комбинация СОД + каталаза снижает уровень продуктов пероксидации липидов и предотвращает другие последствия действия свободных радикалов.

В то же время торможение образования вторичных радикалов может быть достигнуто связыванием и удалением ионов железа.

Появление свободных радикалов в липидной фазе мембран приводит к инициированию цепной реакции, которая развивается благодаря чередующимся реакциям продолжения цепи. В присутствии двухвалентного железа происходит разложение гидроперекисей, сопровождающееся образованием радикалов, дающих начало новым цепям окисления. Наиболее радикальный способ торможения цепных реакций заключается в связывании ("захвате") радикалов, ведущих цепи окисления, которые способны осуществлять такие восстановители, как фенол и его производные. Синтезировано и изолировано из живых объектов множество подобных соединений, называемых ловушками радикалов, ингибиторами свободнорадикальных реакций, липидными антиоксидантами, которые резко тормозят реакции липидной пероксидации в весьма низких концентрациях.

**Первичные продукты пероксидного окисления липидов**

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 ИКспектро-фотометрия, ПМР-спетроскопия, массспектрометрия, высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография, изотопные методы.

**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, кетоны, 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.

В биохимических исследованиях получил широкое распространение метод определения карбонильных продуктов ПОЛ, в частности, малонового диальдегида по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК).

**Конечные продукты пероксидного окисления липидов**

Диальдегиды и ряд других вторичных продуктов ПОЛ, взаимодействуя с N-концевыми остатками аминокислот, белков и аминогруппами 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**.**

**СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ (ПЕРОКСИДНОЕ) ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ**

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 ОН\*-радикалом. Однако течение процесса окисления определяется доступностью О2 и О2\*, или его протонизированной формой (ОН2\*). 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 немодифицированный 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 (-C=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, а-аминоадепиновый семиальдегид из лизинового остатка. Эти производные химически стабильны.

Поэтому уровень степень окислительной модификации белков оценивают по содержанию карбонильных групп (реакция с 2,4-динтрофенилгидразином), 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.

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 цистенновую кислоту, соответственно, а также к изменению вязкости и спектра кругового дихроизма.

Показана инактивация ряда ключевых ферментов метаболизма при инкубации в системе металлкатализируемого окисления in vitro. Модификация препарата СОД гидропероксидом третбутила (t-BuOOH) или аутоокисленным метиллиноленатом в присутствии Fe3+ вызывала падение ее активности и фрагментацию белковой молекулы.

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.

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.

Использование определения уровня карбонильных групп в белках как маркеров оксидативного стресса может иметь некоторые преимущества по сравнению с определением продуктов пероксидного окисления липидов, поскольку образование белоксвязанных CO-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 карбонилов делает их пригодными объектами для лабораторного измерения. Их устойчивость при хранении 3 месяцев при -80 °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.

**ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ РЕАКЦИЙ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ**

Как всегда в биохимии, для изучения реакций образования и удаления веществ прежде всего нужно располагать прямыми методами количественного анализа этих веществ. К сожалению, свободные радикалы обладают столь высокой реакционной способностью, что их невозможно изолировать, исследовать и количественно определить обычными биохимическими методами. Пожалуй, методы оценки свободных радикалов можно разделить на косвенные, к которым относятся методы анализа продуктов реакций, протекавших с уча­стием свободных радикалов, и ингибиторный анализ, а также прямые, к которым можно отнести метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и (с некоторыми оговорками) метод хемилюминесценции.

**Непрямые биохимические методы**

Большинство исследователей, изучающих реакции свободных радикалов, используют косвенные методы, определяя первичные или вторичные продукты свободно радикальных реакций, такие, как конъюгированные диены или соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой.

Вторым широко распространенным методом исследования свободнорадикальных реакций, а точнее, роли свободных радикалов в том или ином процессе, является использование "перехватчиков" радикалов (в англоязычной литературе принят термин "scavenger"). Принцип такого ингибиторного анализа довольно прост: если какой-то процесс подавляется "перехватчиком", значит, перехватываемые радикалы участвовали в процессе. Наиболее плодотворным оказалось использование супероксиддисмутазы СОД (обычно в сочетании с каталазой), поскольку считается очевидным, что этот фермент удаляет супероксидные радикалы и только их.

Менее бесспорны выводы, сделанные на основе опытов с использованием "ловушек" липидных радикалов, таких, как токоферол, поскольку не столь очевидно, что перехват радикалов является единственным результатом действия этих веществ.

**Метод электронного парамагнитного резонанса**

Хотя польза исследований, основанных на изучении молекулярных продуктов свободнорадикальных реакций и ингибиторного анализа, сомнений не вызывает, не следует пренебрегать возможностью прямого обнаружения свободнорадикальных реакций и непосредственного изучения изменении концентрации свободных радикалов в ходе исследуемого процесса.

На сегодняшний день существуют два прямых метода обнаружения радикалов: ЭПР и хемилюминесценция (ХЛ). Попытки непосредственно обнаружить методом ЭПР радикалы кислорода или липидов в биологических системах оказались неудачными, поскольку стационарные концентрации большинства радикалов, таких, как радикалы кислорода или липидов, в биологических системах слишком малы. Успех пришел после разработки метода спиновых ловушек. Спиновые ловушки - это молекулы, которые при взаимодействии с нестабильными радикалами образуют стабильные гидроксильные радикалы, так называемые спиновые аддукты, сигналы ЭПР которых затем измеряются с целью качественного и количественного анализа соответствующих радикалов.

**Метод хемилюминесценции**

Довольно похожая ситуация сложилась и с применением ХЛ. Реакции рекомбинации радикалов супероксида, гидроксила и липидных радикалов сопровождаются очень слабым свечением. Изучение этой ХЛ внесло большой вклад в исследование процессов цепного (или перекисного) окисления липидов в биологических мембранах, но и в этом случае низкая интенсивность сигнала стала одним из существенных препятствий в применении данного метода. В связи с этим получили широкое применение так называемые активаторы ХЛ. Наиболее известны химические активаторы, вступающие с определенными радикалами в реакции, которые сопровождаются свечением: это люцигенин, дающий свечение с радикалами супероксида, и люминол, дающий мощное свечение в присутствии радикалов гидроксила. Для изучения свободнорадикалыных реакций при цепном окислении липидов  был предложен ряд физических активаторов ХЛ, таких, как краситель родамин Ж, комплекс европия с тетрациклином и некоторые лазерные красители, производные кумарина. Физические активаторы не вступают в реакцию с радикалами, но увеличивают квантовый выход ХЛ за счет переноса энергии электронного возбуждения от молекул продуктов реакции на активатор.

**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 возникниквением системы сопряженных диеновых структур, имеющих максимум поглощения при 232234 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 корковыми 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°С.

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

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 сульфованилиновым методом.

6. Расчет результатов.

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



где

Сдк(кд) - содержание диеновых конъюгатов (кетодиенов) в единицах оптической плотности на мг липидов;

E232 - оптическая плотность пробы для диеновых конъюгатов;

Е273 - оптическая плотность пробы для кетодиенов;

А- содержание общих липидов в пробе.

7. Примечание.

Пробы гепаринизированной крови исследуют не позднее 2 часов после взятия при условии хранения не выше 10°С. 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 центрифугирую: 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:



где

С - концентрация малонового диальдегида, мкМ/л;

Е - оптическая плотность пробы;

106 - коэффициент пересчета в мкМ;

1,56\*105 - коэффициент молярной экстинкции ТМК МДА с 2-ТБК;

3 - фактор разведения.

7. Примечания.

7.1. Время нагревания при 100°С 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 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, рН 7,4 (7,8 г NaH2P04 x2H20 растворяют в 100 мл дистиллированной воды - раствор №1; 11,4 г К2НРО4х3Н2О растворяют в 100 мл дистиллированной воды - раствор №2. К 81 мл раствора №2 приливают 19 мл раствора № 1 и измеряют рН на рН-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 FeS04 х7Н2О 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°С) последовательно добавляют 0,5 мл фосфатного буфера рН7,4; 0,15 мл раствора 2,6-ДХФИФ; 0,15 мл раствора закисного сернокислого железа и быстро перемешивают. Все растворы должны иметь температуру 37°С.

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 (Б5оп).

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 Б5к).

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 FeS04 и пробы, добавляют равные им объемы дистиллированной воды (Dmax).

6. Расчет результатов.

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



Рассчитывают константу ингибирования (Ки) плазмой крови окисления 2,6-ДХФИФ, являющуюся показателем ее антиокислительной активности по формуле:



где

Ки - антиокислительная активность плазмы крови, лхмл -1хмин -1; Кк - константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в контроле; Коп - константа скорости окисления

2,6-ДХФИФ в опыте; С - концентрация плазмы в инкубационной смеси, мл/л

7. Примечания.

7.1. Плазма крови должна быть без следов гемолиза.

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

**Метод 2.**

1. Принцип метода.

Метод основан на регистрации торможения окисления 0-дианизидина дихлоргидрата радикалом гидроксила (OH\*), образующегося в системе Фентона Щ2О2 + Fe ) сывороткой крови.

2. Реактивы.

2.1. Раствор Кларка и Любса (75 мМ, pH 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 pH-метра (до pH 1,8).

2.2. Реактив №1. O-дианизидин дихлоргидрат (3,17 г) растворить в 1000 мл раствора Кларка и Любса (конечная концентрация 0-дианизидина дихлоргидрата 10,0 мМ).

Затем растворить в нем 0,01764 г соли Мора - Fe(NH4)2 (S04)2x6H20 (конечная концентрация 45 мкМ). Этот реактив стабилен в течение 6 месяцев в 4 °C. При проведении исследования раствор все время должен стоять в ультратермостате при 25°C.

2.3. Реактив №2. Раствор перекиси водорода (7,5 мМ) готовят следующим образом: 0,641 мл 35 %-ой H202 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 °C. При проведении исследования раствор все время должен стоять в ультратермостате при 25°C.

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 (DE).

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

6. Расчет результатов.



где АОА,% - антиокислительная активность сыворотки

Dк - оптическая плотность без добавления реактива №2

Dо - оптическая плотность пробы через 3 мин после добавления реактива №2