

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Т. Н. Федорова¹

На модели Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции липопротеинов сыворотки крови *in vitro* проведен сравнительный анализ эффективности некоторых фармакологических веществ. По возрастанию защитного действия на окисляемость липопротеинов исследуемые вещества расположились в следующем порядке: тролокс > карнозин > эмоксипин > *L*-карнитин = милдронат. Показана перспективность использования хемилюминесцентного анализа для оценки антиоксидантной активности изучаемых фармакологических веществ.

Ключевые слова: антиоксиданты, хемилюминесценция, липопротеины крови

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс, возникающий при некомпенсируемом повышении уровня активных форм кислорода (АФК) и/или снижении активности систем антиоксидантной защиты, сопровождается разнообразными возрастными и патологическими процессами (цереброваскулярные, воспалительные, нейродегенеративные, злокачественные и др.). Избыточная генерация АФК и увеличение стационарного уровня высокотоксичных свободнорадикальных соединений приводит к повреждению нуклеиновых кислот, белков и липидов [1, 4, 10, 12]. В этих неблагоприятных условиях становится очевидной целесообразность использования природных или нетоксичных синтетических антиоксидантов — ингибиторов свободнорадикального окисления в качестве терапевтических средств. Однако лимитирующим фактором применения антиоксидантов в клинической практике является малый перечень используемых препаратов, недостаточно изученный механизм их действия, а также методические подходы, позволяющие оценить антиоксидантный потенциал веществ. Одним из наиболее перспективных методов исследования антиоксидантной активности различных биологических объектов является хемилюминесцентный (ХЛ) анализ [14]. Преимуществом ХЛ реакций является их более высокая чувствительность и специфичность по сравнению с традиционными биохимическими методами [5].

Цель настоящей работы — на модели Fe^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) липопротеиновых структур сыворотки крови человека изучить перспективность использования хемилюми-

несцентного анализа для сравнительной оценки антиоксидантной активности некоторых фармакологических препаратов в опытах *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кровь у здоровых доноров брали из локтевой вены утром натощак. К полученной сливной сыворотке добавляли 2 мл 0,28% раствора $CaCl_2$ и 40 мкл 1% раствора гепарина, выделяли суммарную фракцию липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛП), используя ее в качестве субстрата окисления. Для инициации этого процесса в пробу вводили $FeSO_4$ (в конечной концентрации 2,5 мМ) и регистрировали кинетические параметры хемилюминесценции (ХЛ) [7, 9] (рисунок): амплитуду быстрой вспышки ХЛ (h, mV), которая выявляется после добавления в пробу $FeSO_4$ и длится несколько секунд (она пропорциональна исходному содержанию преобразованных продуктов ПОЛ); максимальную интенсивность хемилюминесценции (H, mV), которая нарастает постепенно, затем выходит на максимум и через некоторое время начинает снижаться (ее величина отражает максимально возможную интенсивность ПОЛ); латентный период (τ) между быстрой вспышкой и максимальной интенсивностью ХЛ, длительность которого зависит от соотношения про- и антиоксидантов в изучаемой системе.

Метод Fe^{2+} -индуцированной ХЛ, предложенный Ю. А. Владимировым и соавт. [4], адаптирован нами в экспериментальных и клинических условиях применительно к прибору Люминометр-1251, ЛКВ, Швеция.

В работе исследовали следующие соединения: карнозин — гидрофильный антиоксидант, способный ингибировать процессы ПОЛ и предотвращать окислительные повреждения клеточных структур [2]; тролокс — гидрофильный синтетический аналог витамина Е, ингибирующий цепные реакции ПОЛ за счет нейтра-

¹ Лаборатория нейробиологии (зав. — проф. А. А. Болдырев) НИИ неврологии РАМН, Москва, 123367, Волоколамское шоссе, 80.

лизации пероксильного радикала [13]; эмоксипин — синтетический гидрофильный антиоксидант, эффективный “тушитель” липидных радикалов [6]; *L*-карнитин, основной физиологической функцией которого является обеспечение транспорта жирных кислот через митохондриальную мембрану; *L*-карнитин может действовать и как антиоксидант, предотвращая липидное переокисление и стабилизируя мембранные структуры [11]; милдронат — структурный аналог *L*-карнитина, обладающий кардиопротекторным и антигипоксическим свойствами [3, 8]. Растворы соединений (рН 7,45) вместе с компенсирующими объемами фосфатного буфера (60 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl) добавляли в исследуемую пробу за 30 с до введения FeSO_4 . Изменение изучаемых параметров кривой ХЛ выражали в процентах по отношению к контрольным значениям для проб, в которые добавляли соответствующие объемы буфера. Все исследуемые соединения использовали в концентрации 500 мкМ.

Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием *t*-критерия Стьюдента.

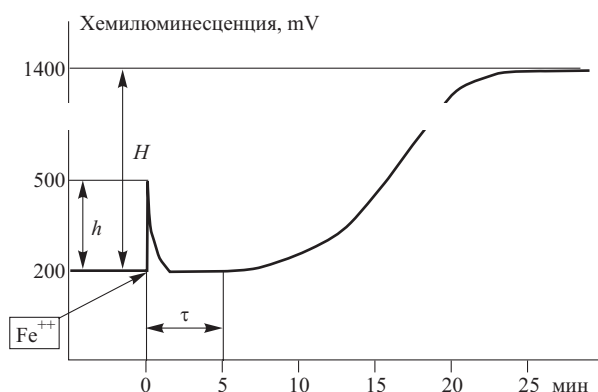
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые соединения не оказывали влияния на уровень спонтанного свечения проб. В то же время, изменение параметров, регистрируемых на кривой ХЛ после внесения FeSO_4 , указывали на то, что исследуемые соединения защищают липопротеины сыворотки крови от окислительного повреждения в разной степени. Результаты этого влияния представлены в таблице. Значительное ингибирующее действие на величину быстрой вспышки (проявляющееся приблизительно в одинаковой степени) оказывает тролокс (ингибирование на 43% по отношению к контролю), эмоксипин (на 46%) и карнозин (на 46%). *L*-карнитин и милдронат оказывали весьма слабое влияние (16 и 15% соответственно).

Наибольшее ингибирующее влияние на максимальную интенсивность ХЛ (*H*) оказывал тролокс (на 91,5%). Эмоксипин также значительно снижал величину этого параметра (на 73%). В меньшей степени действовал карнозин (на 15%). *L*-карнитин и милдронат не оказывали влияния на этот параметр.

Максимальное увеличение длительности латентного периода ХЛ (τ) вызывал тролокс (в 3, 9 раза). Карнозин и эмоксипин также существенно удлиняли его (в 3,2 и 2,7 раза соответственно). В меньшей степени действовали *L*-карнитин (в 1,4 раза) и милдронат (в 1,3 раза).

Таким образом, все гидрофильные антиоксиданты — тролокс, эмоксипин и карнозин значительно подавляли процессы ПОЛ в липопротеинах, что характерно для ингибиторов свободнорадикальных реакций. Способность этих соединений блокировать развитие быстрой вспышки ХЛ (*h*) свидетельствует, вероятно, о взаимодействии этих соединений с предобразованными гидроперекисями. Гидрофобные соединения *L*-кар-



Кривая Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции липопротеинов сыворотки крови здоровых доноров (объяснения — в тексте).

нитин и милдронат не взаимодействовали с этими водорастворимыми продуктами.

Максимальная интенсивность ХЛ (*H*) подавлялась исследуемыми соединениями также в разной степени: наиболее эффективны были тролокс и эмоксипин, наименее — *L*-карнитин и милдронат (карнозин занимал промежуточное положение).

Наиболее существенным представляется способность всех фармакологических препаратов увеличивать длительность латентного периода ХЛ (τ), что свидетельствует о повышении эффективности эндогенной антиоксидантной системы в исследуемых структурных элементах крови человека и подтверждает антиоксидантное действие изучаемых соединений. Ряд возрастающей антиоксидантной активности в данной модели оказался следующим: тролокс → карнозин → эмоксипин → *L*-карнитин = милдронат.

Таким образом, использование хемилюминесцентного метода в изучении антиоксидантной активности показало защитное действие различных соединений при Fe^{2+} -индуцированном окислении липопротеинов. Данное исследование подтвердило, что хемилюминесцентный анализ, наиболее специфичный и чувствительный по отношению к ПОЛ и относящийся к прямым методам изучения свободных радикалов [14], является

Влияние фармакологических препаратов (конечная концентрация 500 мкМ) на параметры Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции липопротеидов, выделенных из сливной сыворотки здоровых доноров (результаты представлены в процентах по отношению к контролю)

Исследуемое соединение	Параметры Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции		
	<i>h</i>	τ	<i>H</i>
Тролокс	57 ± 1*	390 ± 51*	9 ± 1*
Эмоксипин	54 ± 5*	270 ± 20*	27 ± 4*
Карнозин	54 ± 2*	320 ± 77*	85 ± 14
<i>L</i> -карнитин	84 ± 13	140 ± 15*	101 ± 3
Милдронат	85 ± 10	130 ± 16*	98 ± 3

перспективным методом для оценки антиоксидантной активности. Исследуемые соединения могут рассматриваться как регуляторы ПОЛ в липопротеинах сыворотки крови, особенно подверженных окислению.

ВЫВОДЫ

1. Fe^{2+} -индуцированная хемилюминесценция липопротеинов сыворотки крови человека является перспективным методом оценки антиоксидантной активности соединений в опытах *in vitro*.

2. По возрастанию антиоксидантной активности исследованные соединения располагаются в следующем порядке: тролокс > карнозин > эмоксипин > *L*-карнитин = милдронат.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Болдырев, М. Л. Куклей, *Нейрохимия*, **13**(4), 271 – 278 (1996)
2. А. А. Болдырев, Карнозин, *Биологическое значение и возможности применения в клинике*, МГУ, Москва (1998).
3. С. А. Бойцов, Ю. В. Овчинников, А. И. Захарова, *Прогресс и проблемы в лечении заболеваний сердца и сосудов: Материалы конф.*, Санкт-Петербург, (1997), с. 43.
4. Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*, Наука, Москва (1972).
5. Е. С. Дремина, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Москва (1992).
6. К. М. Дюмаев, Т. А. Воронина, Л. Д. Смирнов, *Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС*, Изд-во Института биомедицинской химии РАМН, Москва (1995).
7. Ю. М. Лопухин, Ю. А. Владимиров, М. Н. Молоденков, Г. И. Клебанов, *Бюл. экспер. биол.*, **95**(2), 61 – 63 (1983).
8. А. О. Недошивин, А. Э. Кутузова, Н. Б. Перепеч, *Клин. мед.*, № 3, 41 – 43 (1999).
9. Т. Н. Федорова, О. Ю. Реброва, Э. Г. Ларский, *Лаб. дело*, № 3, 37 – 39 (1991).
10. J. L. Cadet, *Trends Neurosci.*, **17**, 192 – 193 (1994).
11. G. Fiskum, B. Gamma, Y. Bogaert, and R. Rosenthal, *FASEB J.*, **6**, A 1062.
12. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, (1999), 135.
13. W. Stahl and H. Sies, *Diabetes*, **2**, S14 – S18 (1997).
14. Y. A. Vladimirov, Proc. Intern. Symp. On Natural Antioxidants. Molecular Mechanisms and Health Effects / L. Parcker, M.G. Traber, W. Xin (eds), AOCS Press, Champaign, Illinois.

Поступила 03.06.02

CHEMILUMINESCENT ANALYSIS USED FOR THE COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHARMACOLOGICAL COMPOUNDS

T. N. Fedorova

Department of Neurochemistry, Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Volokolamskoe sh. 80, Moscow, 123367 Russia

A comparative analysis of the antioxidant activity of a series of pharmacological compounds was performed *in vitro* using Fe^{2+} induced chemiluminescence of lipoproteins. With respect to the protective action against lipoprotein oxidation, the compounds studied can be arranged in the following order: trolox > carnosine > emoxypine > *L*-carnitine = mildronate. The results show good prospects for using the proposed chemiluminescent technique for evaluating the antioxidant activity of pharmaceuticals.